

PREVALÊNCIA DE CARBAPENEMASES EM ENTEROBACTÉRIAS
RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS EM QUATRO HOSPITAIS
TERCIÁRIOS DE PORTO ALEGRE

*PREVALENCE OF CARBAPENEMASES IN CARBAPENEM-RESISTANT
ENTEROBACTERIACEAE IN FOUR TERTIARY CARE HOSPITALS IN
PORTO ALEGRE*

Fábio de Moura Pinto¹, Daniele Moraes Simas¹,
Camila Pereira Baldin¹, Ivan Inacio Limberger¹,
Renato Cassol Ferreira da Silva¹, Laura Czekster Antochewis²,
Fabiane Jamono Vieira², Vanessa Bley Ribeiro²,
Cibele Massotti Magagnin², Franciéli Pedrotti Rozales²,
Diego Rodrigues Falci¹

Clin Biomed Res. 2014;34(1):47-52

1 Serviço de Controle de Infecção
Hospitalar, Hospital Nossa Senhora da
Conceição– Porto Alegre (RS), Brasil.

2 Laboratório de Resistência Bacteriana,
Centro de Pesquisa Experimental,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre –
Porto Alegre (RS), Brasil.

Autor correspondente:

Diego Rodrigues Falci
dfalci@ghc.com.br
Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: A disseminação de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) no Brasil e a recente detecção de bactérias produtoras de New Delhi metalo-β-lactamase (NDM-1) em hospital terciário do sul do Brasil indicam a necessidade da avaliação da presença destas enzimas em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC).

OBJETIVO: Avaliar prevalência de carbapenemases nas ERC em quatro hospitais terciários de Porto Alegre, por meio de PCR multiplex em tempo real.

MÉTODOS: Estudo descritivo, período de abril a dezembro de 2013. Isolados bacterianos de pacientes internados foram identificados pelo sistema automatizado VITEK 2, com realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Amostras com isolados de ERC foram encaminhadas ao laboratório de referência para análise por PCR em tempo real para identificação de carbapenemases.

RESULTADOS: Total de 701 isolados. As ERC predominantes foram *K. pneumoniae* (47% das amostras positivas) e *Enterobacter cloacae* (18%). As carbapenemases mais frequentes foram KPC (48%), OXA-48-like (3%) e NDM (2%). Em 47% das amostras não foi identificado o mecanismo de resistência. Isolados originados de culturas de vigilância foram associados com maior positividade para carbapenemases do que isolados de amostras clínicas ($p < 0,0001$). Isolados de ERC pertencentes ao grupo Proteae (*Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp.) foram associados a menor positividade para carbapenemase do que isolados de outras ERC ($p < 0,0001$).

CONCLUSÃO: KPC foi a carbapenemase mais frequentemente detectada. A circulação de uma enzima OXA-48-like foi demonstrada, um achado novo e preocupante. O achado da carbapenemase NDM também é preocupante devido ao seu potencial de disseminação. Esses dados e outros estudos poderão contribuir para um entendimento maior da epidemiologia das ERC.

Palavras-chave: Beta-lactamases; carbapenemases; enterobactérias resistentes a carbapenêmicos; Enterobacteriaceae, carbapenêmicos.

ABSTRACT

BACKGROUND: The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in Brazil and the recent detection of bacteria producing New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) in a tertiary care hospital in Porto Alegre indicate the need to evaluate the presence of these enzymes in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE).

AIM: To evaluate the prevalence of carbapenemases in CRE in four tertiary care hospitals in Porto Alegre using multiplex real-time PCR.

METHODS: Descriptive study from April to December 2013. Bacterial isolates from hospitalized patients were identified by VITEK 2 automated system, with antimicrobial susceptibility testing. Samples with CRE isolates were sent to the reference laboratory for analysis using real-time PCR for identification of carbapenemases.

RESULTS: Total of 701 isolates. The predominant CRE were *K. pneumoniae* (46% of positive samples) and *Enterobacter cloacae* (18%). The most frequent carbapenemases were KPC (48%), OXA-48-like (3%), and NDM-1 (2%). In 47% of the samples no carbapenemase was identified. Isolates originated from surveillance cultures were associated with higher positivity for carbapenemases than isolates from clinical samples ($p < 0.0001$). CRE isolates belonging to the Proteae group (*Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp.) were associated with less positivity for carbapenemase than isolates of other CRE ($p < 0.0001$).

CONCLUSION: KPC was the most frequently detected carbapenemase. The movement of an OXA-48-like enzyme was demonstrated, a novel and worrisome finding. The finding of carbapenemase NDM is also worrisome due to its dissemination potential. These data and further studies may contribute to a better understanding of the epidemiology of CRE.

Keywords: *Beta-lactamases; carbapenemase; Enterobacteriaceae; carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; carbapenem.*

Os carbapenêmicos foram historicamente drogas de último recurso para o tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas (1). Entretanto, recentemente têm sido descritos vários mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, entre estes a produção de enzimas que degradam os carbapenêmicos — as carbapenemases. As carbapenemases são usualmente capazes de hidrolisar não só carbapenêmicos, mas também outros beta-lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (2). Duas grandes classes de carbapenemases são mais comumente encontradas em enterobactérias atualmente: as metalo-betalactamases (sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentes), e as serino-carbapenemases (incluindo como mais comuns as do tipo KPC e as OXA-carbapenemases) (2,3).

Os genes codificadores de carbapenemases podem estar localizados em um elemento genético móvel, como um plasmídeo, o que facilita

a transferência da resistência entre isolados bacterianos (2). Do ponto de vista epidemiológico, são de extrema relevância as carbapenemases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial após suas descrições iniciais (1). As OXA-carbapenemases, até o momento, estão menos globalmente disseminadas, com circulação mais restrita ao Oriente Médio e alguns países europeus. No Brasil, os primeiros relatos de bactérias produtoras de KPC surgiram em 2009, a partir de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2, nas cidades de Recife (4) e Rio de Janeiro (5). Em relação à NDM, o primeiro relato no Brasil foi no ano de 2013 em Porto Alegre, no Hospital Nossa Senhora Conceição, pertencente ao Grupo Hospitalar Conceição (GHC), tendo sido a NDM-1 identificada em um isolado de *Providencia rettgeri* (6).

Considerando o aumento crescente das infecções por enterobactérias, a elevada mortalidade dessas infecções, a rápida propagação e a facilidade de transmissão e a escassez de alternativas terapêuticas, as carbapenemases apresentam-se como um grave problema de saúde pública. Por esse motivo, adquire fundamental importância a detecção dessas enzimas em isolados de pacientes hospitalizados. Com este fim, o Grupo Hospitalar Conceição passou a enviar sistematicamente para laboratório de referência em resistência bacteriana (LABRESIS-HCPA) os isolados resistentes a carbapenêmicos, para avaliação de carbapenemases através de PCR *multiplex* em tempo real (7). No presente trabalho, objetivou-se estudar a prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC), provenientes de pacientes hospitalizados no Grupo Hospitalar Conceição.

MÉTODOS

Estudo descritivo, com análise de amostras de isolados de ERC coletadas no período de abril a dezembro de 2013. A população analisada foi de isolados bacterianos provenientes de pacientes internados no Grupo Hospitalar Conceição (GHC) – em todos seus hospitais, a saber: Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC), Hospital da Criança Conceição (HCC), Hospital Cristo Redentor (HCR) e Hospital Fêmeina (HF).

Critérios de inclusão: isolados bacterianos com diminuição de sensibilidade a qualquer carbapenêmico (imipenem, meropenem ou ertapenem), detectado por meio de método automatizado (VITEK 2) no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição. A identificação da espécie bacteriana foi de acordo com o resultado do método automatizado referido anteriormente. Os critérios para resistência bacteriana aos carbapenêmicos utilizados foram em consonância com a Nota Técnica ANVISA 01/2013 e CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) 2013 (8). Esses isolados foram encaminhados ao laboratório de referência (LABRESIS-HCPA) para a pesquisa de carbapenemases. Os isolados cuja análise não foi possível realizar devido a dificuldades técnicas foram excluídos do estudo.

No laboratório LABRESIS as amostras foram analisadas por um método de PCR em tempo real *multiplex*, capaz de identificar em uma única reação múltiplas carbapenemases

(KPC, GES, OXA-48-like, IMP, VIM e NDM) em isolados de *Enterobacteriaceae*. Este método proporciona rápida detecção e identificação das carbapenemases. O ensaio completo, incluindo a extração de DNA, preparação da amostra, execução PCR *multiplex* e análise dos resultados pode ser realizado em três horas (7).

Foi realizada análise descritiva de todas as amostras enviadas ao LABRESIS, apresentando dados sobre as carbapenemases mais prevalentes, o gênero e espécie das principais bactérias, o tipo de espécime e a frequência dos isolados e sua positividade para as carbapenemases. Foi utilizada estatística descritiva; para comparações entre subgrupos foi utilizado o teste do qui-quadrado de diferenças entre proporções. Para a análise dos dados foi empregado o programa JMP versão 9 (SAS Inc., Cary, USA).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição, número protocolo CAAE 19214513.2.0000.5530, número do parecer: 462.588. O mesmo é reconhecido como IRB (Institutional Review Board) pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS).

RESULTADOS

Foram coletadas 701 amostras de isolados de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos, no período do estudo; esses isolados são referentes a 485 pacientes.

As amostras isoladas de ERC no Grupo Hospitalar Conceição tiveram como principal origem o Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) - correspondente a 89,8% do total, seguido pelo Hospital Cristo Redentor (HCR) – com 6,3%, Hospital da Criança Conceição (HCC) – 2% e Hospital Fêmeina (HF) – 1,7%. Houve positividade para alguma carbapenemase em 53% das amostras dos isolados.

A frequência dos materiais biológicos que deram origem aos isolados analisados, e a positividade para carbapenemase estão descritos na Tabela 1. Em relação ao material analisado, o *swab* retal obtido dentro da estratégia de culturas de vigilância em unidades de alto risco, totalizou a maior parcela (51,9%) do total de isolados. A carbapenemase mais prevalente entre os isolados de *swab* retal foi KPC (48,5% dos casos), seguido pela OXA-48-like (3%) e NDM (2%). Comparando-se o grupo de isolados de amostras clínicas (todos materiais

clínicos exceto *swab* retal) versus o grupo de isolados de culturas de vigilância (somente *swab* retal), encontramos uma positividade para carbapenemases maior nos isolados de vigilância (66,9%) do que nos isolados de material clínico (38,9%). Essa diferença entre esses dois grupos é estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

O germe mais frequentemente identificado foi a *K. pneumoniae*, totalizando 47% das amostras. Os demais microrganismos identificados, suas frequências e a positividade para as carbapenemases estão descritos na Tabela 2. Salienta-se que em *K. pneumoniae*,

em *Escherichia coli* e em *Serratia marcescens* predomina a presença de KPC (em 68, 54 e 96%, dos isolados, respectivamente); em *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* e *Providencia stuartii*, a maioria das amostras foram negativas (54, 95, 98, 56 e 96% respectivamente). Considerando somente as amostras positivas para carbapenemases, houve predomínio de KPC em ampla maioria dos microrganismos. O grupo Proteae, que inclui os gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia*, compreendeu 141 isolados (20,1% da amostra). Neste grupo, em apenas cinco isolados (3,5%)

Tabela 1: Quantidade de isolados obtidos para cada tipo de material biológico, e positividade para diferentes carbapenemases.

| Material | Isolados, n (%) | Positividade para carbapenemases, n (%) | | | | |
|----------------------|-----------------|---|-----------|-------------|----------|-------------|
| | | NDM | OXA | KPC | GES | Negativo |
| Swab retal | 363 (51,9%) | 11 (3,0%) | 16 (4,4%) | 215 (59,2%) | 1 (0,3%) | 120 (33,1%) |
| Urina | 147 (21%) | 0 | 1 (0,7%) | 60 (40,8%) | 0 | 86 (58,5%) |
| Amostra respiratória | 51 (7,3%) | 0 | 1 (2,0%) | 21 (41,2%) | 0 | 29 (56,9%) |
| Sangue | 29 (4,1%) | 0 | 0 | 9 (31,0%) | 0 | 20 (69,0%) |
| Partes moles | 53 (7,6%) | 1 (1,9%) | 0 | 8 (15,1%) | 0 | 44 (83,0%) |
| Líquido peritoneal | 26 (3,7%) | 0 | 3 (11,5%) | 14 (53,8%) | 0 | 9 (34,6%) |
| Líquido pleural | 5 (0,7%) | 0 | 0 | 4 (80%) | 0 | 1 (20%) |
| Outros | 16 (2,3%) | 0 | 0 | 5 (31,2%) | 0 | 11 (68,7%) |
| TOTAL | 701 (100%) | 12 (1,7%) | 21 (3,0%) | 340 (48,5%) | 1 (0,1%) | 327 (46,6%) |

Tabela 2: Prevalência das diferentes espécies de enterobactérias na amostra e positividade para KPC, NDM e OXA-48-like.

| Microrganismo | Isolados, n (%) | Positividade para carbapenemases, n (%) | | | | |
|-------------------------------|-----------------|---|-----------|------------|----------|------------|
| | | NDM | OXA | KPC | GES | Negativo |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 326 (46,5%) | 0 | 12 (3,7%) | 223 (68%) | 0 | 91 (27,9%) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 125 (17,8%) | 9 (7,2%) | 6 (4,8%) | 46 (36,8%) | 0 | 86 (58,5%) |
| <i>Providencia stuartii</i> | 23 (3,3%) | 0 | 0 | 1 (4,3%) | 0 | 22 (95,6%) |
| <i>Morganella morganii</i> | 66 (9,4%) | 1 (1,5%) | 0 | 2 (3,0%) | 0 | 63 (95,4%) |
| <i>Escherichia coli</i> | 26 (3,7%) | 1 (1,5%) | 0 | 14 (53,8%) | 0 | 10 (38,5%) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 25 (3,5%) | 0 | 0 | 11 (44,0%) | 0 | 14 (56,0%) |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 15 (2,1%) | 1 (6,7%) | 1 (6,7%) | 12 (80%) | 0 | 1 (20%) |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 45 (6,4%) | 0 | 0 | 1 (2,2%) | 0 | 44 (97,8%) |
| <i>Serratia</i> spp. | 26 (3,7%) | 0 | 0 | 23 (88,5%) | 1 (3,8%) | 2 (7,7%) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 6 (0,9%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 (100%) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 7 (1,0%) | 0 | 1 (14,3%) | 5 (71,4%) | 0 | 1 (14,3%) |
| Outros* | 11 (1,6%) | 0 | 0 | 2 (18,2%) | 0 | 9 (81,8%) |

*Outros microrganismos, com frequência igual ou menor que cinco isolados, foram agrupados: *Pantoea agglomerans* (5), *Raoultella ornithinolytica* (2), *Achromobacter xylosoxidans* (1), *Aeromonas sobria* (1), *Proteus* spp. (1), *Providencia rettgeri* (1).

houve positividade para carbapenemase, com diferença significativa ($p < 0,0001$) para as bactérias não pertencentes a este grupo, onde a positividade ocorreu em 369 isolados (65,9%).

A *K. pneumoniae* foi o microrganismo mais frequente com presença de KPC, contribuindo com 66% das amostras positivas para essa carbapenemase. Os isolados de *K. pneumoniae* também compreenderam a maior parcela de amostras positivas para OXA-48-like. Quanto a carbapenemase NDM, *E. cloacae* foi o microrganismo mais frequente, com 75% dos casos. GES foi encontrada somente em uma amostra de *Serratia spp.*

DISCUSSÃO

Houve ampla predominância da KPC como carbapenemase mais prevalente, principalmente às custas dos isolados de *K. pneumoniae*. Tal fato corrobora, em nível local, a preocupante disseminação tanto em nível nacional (9) quanto global dessa carbapenemase e o papel de destaque da *K. pneumoniae*, com sua predisposição a causar infecções nosocomiais e habilidade de acumular e transferir mecanismos de resistência (3). Surpreendentemente, OXA-48-like foi a segunda carbapenemase mais prevalente. O achado de OXA-48-like circulante em nosso meio é inusitado e foi motivo de investigação complementar. O sequenciamento dessa enzima demonstrou uma diferença de 2 aminoácidos em relação à OXA-48 original e uma atividade fraca de hidrólise de carbapenêmicos, o que sugere uma associação com outro mecanismo de resistência em nossos isolados (dados não publicados). A NDM foi a terceira carbapenemase mais prevalente, e encontrada quase exclusivamente em *E. cloacae*. A circulação de NDM em nosso meio (6) constitui agravo importante e merece atenção — já está em andamento plano de ação, coordenado entre a Vigilância em Saúde do Município de Porto Alegre, e estas e outras unidades hospitalares, para controle de sua disseminação.

A maioria das amostras (51,7%) com ERC foi obtida a partir de swabs retais de vigilância, confirmando a importância epidemiológica desse método na avaliação dos microrganismos resistentes. Reforça-se a importância com a constatação de que a positividade para carbapenemase foi significativamente maior nas amostras de culturas de vigilância do que em amostras de material clínico, o que é condizente

com observações prévias de que o grande reservatório da resistência bacteriana transmissível por elementos genéticos móveis é o contingente de pacientes colonizados (10,11).

Salienta-se que no grupo Proteae (gêneros *Proteus spp.*, *Morganella spp.* e *Providencia spp.*), o número de amostras negativas para as carbapenemases pesquisadas foi significativamente maior do que em bactérias não pertencentes ao grupo: isso provavelmente se deve ao encaminhamento de isolados com resistência isolada ao imipenem, fenômeno que pode ocorrer nessas espécies sem significar a presença de carbapenemase (8). Da mesma forma, a resistência aos carbapenêmicos em isolados de outras espécies bacterianas, em que também não foi identificado nenhuma carbapenemase, pode dever-se a ocorrência de mecanismos não enzimáticos.

Este é o primeiro estudo a analisar a prevalência de carbapenemases em ERC em hospitais de Porto Alegre. Entretanto, considerando a metodologia utilizada, o estudo apresenta algumas limitações. Trata-se de estudo descritivo, que se restringiu às amostras de ERC, não sendo possível determinar a prevalência das ERC como um todo, e sim apenas das carbapenemases dentro dos isolados de ERC. Como outra limitação é possível mencionar a ausência de coleta de dados epidemiológicos dos pacientes, o que poderia proporcionar, por exemplo, a análise de fatores de risco associados às carbapenemases ou, ainda, impacto clínico em tempo de hospitalização ou mortalidade.

A carbapenemase KPC foi a mais prevalente no estudo, o que aponta para uma ampla disseminação em hospitais terciários da cidade de Porto Alegre. Houve detecção de carbapenemases anteriormente não descritas, como a OXA-48-like, o que novamente chama a atenção para a emergência de novos mecanismos de resistência no meio hospitalar local. A circulação recorrente da carbapenemase NDM também é motivo para extrema preocupação dentro do sistema de saúde. A importância das culturas da vigilância realizadas em unidades de alto risco para ERC foi enaltecida com o achado de uma positividade maior para carbapenemases em isolados provenientes dessa estratégia. Com esses dados e estudos futuros, será possível conhecer com mais detalhes a epidemiologia das ERC, favorecendo a programação de medidas de controle de infecção adequadas ao perfil dinâmico de propagação de germes hospitalares multirresistentes.

REFERÊNCIAS

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2001;17:1791-8.
2. Queenan AM, Bush K. carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.
3. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:228-36.
4. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:333-4.
5. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:265-8.
6. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2956-7.
7. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:906-9.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing; 23th Informational Supplement; Approved document M100-S23, vol. 33, Wayne, PA.
9. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011;52:1138-43.
10. Gijon D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Canton R. Fecal carriage of carbapenemase-producing enterobacteriaceae: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1558-63.
11. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Bartzavali C, Anastassiou ED, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2976-81.

Recebido: 29/12/2013

Aceito: 24/01/2014