

**ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES COMO
COLONIZANTES EM UM HOSPITAL DA REGIÃO CENTRAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

Ana Paula Becker¹, Huander Felipe Andreolla²

¹ Docente do curso de Biomedicina Atitus Educação

² Profissional biomédico ISCMPA

Não houve fonte financiadora.

Não há conflito de interesses.

CAAE: 98895018.9.0000.5306

RESUMO:

Introdução: No Brasil mais de 70% das bactérias que causam infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos utilizados frequentemente para o tratamento dos pacientes. A resistência à carbapenêmicos envolve aquisição de enzimas que hidrolisam o antimicrobiano, mas pode envolver a perda de porinas reduzindo a entrada do fármaco. **Objetivo:** Detectar enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em superfícies e/ou colonizando funcionários de um hospital. **Metodologia:** Foram coletados swab's de das superfícies inanimadas e interdigitais dos funcionários de um hospital de médio porte situado na cidade de Santa Maria, inoculadas em 10ml de meio líquido contendo um disco de imipenem (10 µg) e após incubação repicadas para ágar MacConkey e realizados os testes e identificação e resistência (de acordo com CLSI e BrCAST). **Resultados:** Foram 38 coletas de interdigital dos profissionais do hospital e 17 coletas de superfícies, obtivemos dois resultados positivos para presença de enterobactéria resistente aos

carbapenêmicos, ambas em superfícies. Ambos os isolados foram identificados como *Enterobacter asburiae* e o teste de bloqueio enzimático mostrou não se tratar de resistência mediada por enzimas. *E. asburiae* é uma espécie nova no gênero *Enterobacter*, um patógeno oportunista e causa diferentes doenças humanas. A cepa isolada nesse estudo apresentou ainda resistência também aos carbapenêmicos complicando ainda mais o tratamento. **Conclusão:** Enterobactérias que causam infecções em humanos com menor frequência podem ser isoladas a partir de superfícies, podendo explicar a infecções através da contaminação cruzada no hospital.

Palavras chave: resistência bacteriana, carbapenêmicos, *Enterobacter asburiae*

INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil mais de 70% das bactérias que causam infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos utilizados frequentemente para o tratamento dos pacientes. Tratando-se de bacilos gram-negativos os problemas parecem ser mais importantes no Brasil e em outros países da América Latina quando comparados a outras regiões do mundo como Europa e Estados Unidos ^{1,2}.

O grande aumento da prevalência de enterobactérias resistentes a cefalosporinas levou ao uso direto dos únicos β -lactâmicos disponíveis no mercado que se apresentam estáveis às enzimas ESBL's (do inglês: *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) e AMPc: os carbapenêmicos ³.

Por cerca de 20 anos depois da introdução do Imipenem, os carbapenêmicos ainda mantiveram sua ação contra as enterobactérias, mas atualmente sua resistência é crescente. A resistência à carbapenêmicos envolve principalmente a hidrólise do fármaco por uma enzima, mas pode envolver também a perda de porinas reduzindo a

entrada do fármaco nas cepas que carregam grandes níveis de AMPc ou de alguma ESBL. Dados divulgados pela ANVISA afirmam que no Brasil os índices de resistência aos carbapenêmicos no gênero *Enterobacteriaceae* é de 80,7% ^{4,5}.

Com a limitação do uso das cefalosporinas e a resistência aos carbapenêmicos, um fármaco antigo foi reintroduzido na prática: as polimixinas. Mas por apresentarem altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade com o uso prolongado, foram gradativamente sendo substituídas por cefalosporinas de amplo espectro e aminoglicosídeos, porém com menos taxa de toxicidade ^{6,7}.

E uma das alternativas para evitar a disseminação de bactérias multirresistentes nos hospitais, por transmissão cruzada, é a realização de culturas de vigilância ⁸. As culturas de vigilância possibilitam a obtenção das taxas de colonização das bactérias resistentes nos pacientes internados, permitindo a detecção da epidemiologia das bactérias resistentes de maior relevância, identificação de surtos antes da sua propagação, determinação de áreas e situações de maior risco ^{9,10}. No ambiente hospitalar, a presença de microrganismos no ar, piso, paredes é frequente, estes que de forma oportunista podem infectar pacientes. A equipe multiprofissional pode atuar como importante reservatório de enterobactérias, a despeito das boas práticas de higiene. A presença em mãos de cuidadores, local onde é possível que a bactéria sobreviva por longos períodos, é relacionada a surtos de infecções hospitalares ¹¹.

O objetivo do presente estudo é avaliar a presença de resistência aos carbapenêmicos como colonizantes em funcionários e superfícies e com base nos resultados elaborar um sistema de vigilância de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, iniciando pela triagem desse mecanismo.

METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação ao Comitê de Ética, para análise e aprovado com CAAE número: 98895018.9.0000.5306.

Como padronizado pela ANVISA, as amostras a serem utilizadas para avaliação de colonização por enterobactérias produtoras de carbapenemases são: material coletado com swab. Inicialmente foram coletados swab's das superfícies inanimadas (tais como: equipo do paciente, bandeja de medicamentos e lateral da cama do paciente). Após a aprovação no Comitê de Ética da Universidade Franciscana, foram coletados também swab's dos funcionários.

Após o esclarecimento do projeto, aceitação dos funcionários a participarem da pesquisa e assinatura do TCLE, foram coletadas amostras biológicas da pele no espaço interdigital de ambas as mãos.

Salientamos que somente foi identificado o sítio de onde o material foi coletado (por exemplo: interdigital), não sendo identificados os swab's com o nome dos funcionários, pois em caso de o resultado do swab ser positivo para os mecanismos de resistência buscados, não há implicação nenhuma ao participante, visto que pessoas com sistema imune eficaz, não desenvolvem infecção por colonizantes com mecanismos de resistência. O intuito é identificar os mecanismos para conscientizar os funcionários que durante o manejo dos pacientes eles podem estar transmitindo por transmissão cruzada aos pacientes com imunidade baixa.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS

As amostras foram coletadas em swab com meio de transporte Stuart® e enviadas ao laboratório de microbiologia imediatamente apesar das enterobactérias terem estabilidade mínima de 4 horas em temperatura ambiente e 72 horas sob

refrigeração. No laboratório as amostras foram inoculadas em meio líquido (caldo BHI) contendo um disco de imipenem (10 µg) a 10 ml de caldo imediatamente antes do uso. A seguir as culturas foram incubadas por 12 a 18 horas a 36 °C antes do repique para meio sólido. Após, subcultivadas em ágar MacConkey por esgotamento (Adaptado de ANVISA, 2013).

Todas as colônias distintas no ágar MacConkey foram submetidas à identificação por série bioquímica através do sistema API 32E Biomerieux® e submetidas ao teste de bloqueio enzimático descrito abaixo⁸.

De acordo com a nota técnica 01/2013 da ANVISA, as enterobactérias com diâmetro de halo de inibição igual ou menor que 22mm para imipenem e/ou meropenem, e isolados com diâmetro do halo de inibição menor ou igual a 24mm para ertapenem em Muller Hinton devem ser submetidas ao teste fenotípico da detecção de KPC, NDM ou OXA (teste de bloqueio enzimático), que consiste na realização do antibiograma com a adição de substratos inibidores da enzima aos discos de carbapenêmicos. Isolados com diferença de diâmetro ≥ 5 mm para o carbapenêmico (imipenem ou meropenem) com EDTA em relação ao carbapenêmico sem EDTA devem ser consideradas potenciais produtoras de metalo-betalactamase (IMP, VIM, NDM). Isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm apenas com ácido fenilborônico (AFB), para qualquer um dos substratos (imipenem ou meropenem), devem ser considerados produtores de KPC. Isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm com AFB e cloxacilina (CLOXA), para qualquer um dos substratos, deverão ser considerados produtores de AmpC plasmidial e deficientes em porinas.

RESULTADOS

A partir de 38 coletas de interdígital dos profissionais do hospital e 17 coletas de superfícies inanimadas, obtivemos dois resultados positivos para presença de enterobactéria resistente aos carbapenêmicos, ambas em superfícies.

Os dois isolados que se apresentaram turvos incubados em caldo foram semeados em MacConkey e posteriormente foi confirmada a resistência aos carbapenêmicos por meio de antibiograma. Foi realizada a identificação por meio do sistema API 32E da Biomerriex®. O teste de bloqueio enzimático foi realizado para detecção de KPC, metalo-beta lactase ou outra forma de resistência não mediada por essas enzimas.

Ambos os isolados foram identificados como *Enterobacter asburiae* (*E. asburiae*) e o teste de bloqueio enzimático mostrou não se tratar de resistência mediada por enzimas visto que os testes com AFB, CLOXA e EDTA não mostraram aumento superior a 5mm comparados aos discos sem aditivo. De acordo com a Nota Técnica da ANVISA 01/2013: a negatividade dos testes fenotípicos para KPC (AFB), metalo-betalactamases (EDTA) e AmpC (CLOXA + AFB), mas resistência a carbapenêmicos podem indicar a presença da carbapenemase OXA-48 ou perda de porinas.

DISCUSSÃO

Enterobacter asburiae (*E. asburiae*) é uma bactéria motora, anaeróbia facultativa, forma de bastonete gram-negativa, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. É uma espécie nova no gênero *Enterobacter* que anteriormente era chamada de Grupo Entérico 17. *E. asburiae* é um patógeno oportunista e causa diferentes doenças humanas, como pneumonia adquirida, infecções de tecidos moles, infecção de feridas e outras infecções e produz a enzima β -lactamase constitutivamente em níveis elevados, o que faz com que esta bactéria seja resistente à maioria dos

antibióticos β -lactâmicos ¹². A cepa isolada no presente estudo apresentou ainda resistência também aos carbapenêmicos complicando ainda mais, caso o tratamento se fizesse necessário.

Acerca da resistência detectada nesse estudo, as bactérias gram-negativas consistem em seu envelope, três camadas principais: membrana externa, parede celular de peptidoglicano e membrana interna ou citoplasmática. A proteção da célula contra agentes externos, como, metais pesados e detergentes, é a membrana externa que contém proteínas específicas, chamadas porinas. As porinas formam canais que permitem a passagem seletiva de nutrientes essenciais e outros compostos, como antimicrobianos, para o seu sítio ativo ¹³.

A perda de porinas desempenha um papel importante na resistência aos carbapenêmicos, a alteração no número ou na atividade dessas porinas bacterianas, incluindo uma modificação na expressão das porinas, pode ter efeito sobre a resistência a essa classe de antimicrobianos ^{13,14}.

A baixa regulação na expressão de porinas ou uma alteração favorecendo a expressão dos pequenos canais como resposta à antibioticoterapia, resultando na reduzida permeabilidade da membrana que limita severamente o acúmulo intracelular do antimicrobiano, permitindo a evolução ou aquisição de outros mecanismos de resistência, isso inclui: mutações no alvo, produção enzimática, entre outros ^{15,16}.

A resistência aos antibióticos carbapenêmicos por perda ou redução da expressão das porinas tem sido relatada em diversas partes do mundo e em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, principalmente em *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *E. coli* ¹⁴.

Enterobactérias que causam infecções em humanos com menor frequência (como *E. asburiae*) tem tido seus relatos aumentados e nosso estudo demonstra que

cepas podem ser isoladas a partir de superfície, podendo no futuro explicar a infecções através da contaminação cruzada. Além disso, nosso estudo detectou um mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em um isolado intrinsecamente resistente à β -lactâmicos e mediado por perda porinas. Tal achado pode ajudar no planejamento futuro de medidas de bloqueio para minimizar disseminação bacteriana e principalmente conscientização da equipe de funcionários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. James, F. & Dantas, M. Resistência à polimixina B em bactérias gram-negativas carbapenemos resistentes isoladas em hospitais do Rio Grande do Norte. *Programa De Pós-graduação em Ciências Biológicas* (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017).
2. ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. *Segurança do Paciente e Qual. em Serviços Saúde* **16**, 82 (2015).
3. Armand-Lefèvre, L., Andremont, A. & Ruppé, E. Voyages et acquisition d'entérobactéries multirésistantes. *Med. Mal. Infect.* (2018). doi:10.1016/j.medmal.2018.02.005
4. Livermore, D. M. *et al.* Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1569–1577 (2012).
5. Lenhard, J. R. *et al.* Comparative pharmacodynamics of four different carbapenems in combination with polymyxin B against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **48**, 719–724 (2016).
6. Gales, A. C., Mendes, R. E., Rodrigue, J. & Sader, H. S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem / cilastatina : o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **38**, 13–20 (2002).
7. Girardello, R. & Gales, A. C. Resistência às Polimixinas : velhos antibióticos , últimas opções terapêuticas Polymyxins resistance : old antimicrobials , last therapeutic options. *Rev Epidemiol Control Infect* **2**, 66–69 (2012).

8. ANVISA. Nota Técnica N 01/2013. *Câmara Técnica Resist. Microbiana Em Serviços Saúde* 1–22 (2013).
9. O'Brien, T. F. & Stelling, J. Integrated multilevel surveillance of the world's infecting microbes and their resistance to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 281–295 (2011).
10. FRANCO, M. M. B. Etiologia e Resistência Bacteriana em Unidades de Terapia Intensiva Através de Culturas de Vigilância. 98 (2017).
11. Tude, G. *et al.* Detecção de Enterobactérias em superfícies de uma Unidade Mista de Saúde, no município de São Luís, Maranhão, Brasil. (2014).
12. Mardaneh, J. & Dallal, M. M. S. Isolation and identification enterobacter asburiae from consumed powdered infant formula milk (PIF) in the neonatal intensive care unit (NICU). *Acta Med. Iran.* **54**, 39–43 (2016).
13. Dalmolin, T. V. RESISTÊNCIA ASSOCIADOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS RESISTÊNCIA ASSOCIADOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS. 60 (2015).
14. Jaskulski, M. da R. Avaliação da presença de ESBL, carbapenemase do tipo KPC e porinas como mecanismo de resistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* *Tese doutorado* 1–132 (2013).
15. Pagès, J. M., James, C. E. & Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 893–903 (2008).
16. Davin-Regli, A. *et al.* Membrane Permeability and Regulation of Drug Influx and Efflux; in Enterobacterial Pathogens. *Curr. Drug Targets* **9**, 750–759 (2008).

