

DETECÇÃO E FREQUÊNCIA DO GENE *bla*_{NDM} EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE UM HOSPITAL ENSINO

Ihorrana Wencz Afllen (PIBIC-AF-IS/CNPq//Uem), Sílvia Maria dos Santos Saalfeld, Elaine Cristina Birssi, Rúbia Pazzetto, Cecília Saori Mtsugui, Sheila Alexandra Belini Nishiyama, Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientadora),
e-mail: mcbtognim@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR

Microbiologia, Microbiologia Médica

Palavras-chave: bactérias Gram-negativas, beta-lactamases, resistência microbiana a medicamentos.

Resumo:

A enzima New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) pertence à classe das metallo-beta-lactamases, que foram assim denominadas pois precisam de um metal (Zn^{++}) como cofator. Sua atividade hidrolítica é ampla e confere resistência a múltiplos antibacterianos incluindo os carbapenêmicos. Depois de sua detecção na Índia em isolados de enterobactérias, se disseminou facilmente por todo o mundo. Diante desse contexto, o presente projeto teve objetivo avaliar a frequência do gene *bla*_{NDM} em bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes hospitalizados no Hospital ensino da Universidade Estadual de Maringá, as quais foram inicialmente caracterizadas por fenotípicos como produtoras de carbapenemases. O estudo ainda se propôs a avaliar a acurácia dos testes fenotípicos na detecção desta enzima. Os dados moleculares (detecção do gene *bla*_{NDM}) demonstrou que a partir do primeiro isolado positivo em 2017, tivemos um importante aumento chegando a 22 isolados carreadores do gene *bla*_{NDM} até 2019. Os resultados do Teste de Hodge Modificado não foram satisfatórios, apresentaram alta sensibilidade apenas para *E. cloacae*. O Teste de Triton Hodge, mCIM, eCIM e o teste com inibidor de MBL demonstraram boa acurácia, além de serem de fácil execução e interpretação. Com o aumento na frequência de NDM em nosso hospital e considerando a dificuldade de realização dos testes moleculares a presença de bons testes fenotípicos são importantes para direcionar o uso de antimicrobianos, buscando uma terapia mais adequada e colaborando com o controle da resistência bacteriana.

Introdução

A enzima New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) foi reportada pela primeira vez por Young e colaboradores (2009). Foi denominada de NDM por ter sido descrita na cidade de Nova Delhi na Índia, sendo identificada em um isolado urinário de *Klebsiella pneumoniae* e um isolado de fezes de

Escherichia coli recuperados do mesmo paciente. Trata-se de uma metalo-beta-lactamase (MBL) com potencial para hidrolisar todos os beta-lactâmicos, exceto os monobactâmicos.

A triagem de carbapenemases tem sido indicada na rotina, diante da importância das MBLs e da crescente preocupação com o aumento de isolados clínicos produtores de NDM-1. Sabe-se que os genes codificadores de MBLs estão localizados em elementos genéticos móveis, podendo ser *integrans* e/ou plasmídeos, elevando assim a capacidade de disseminação da resistência (Rosa et al., 2017). O Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (LMM) tem realizado um projeto contínuo de vigilância de genes de resistência, incluindo *bla*_{NDM}. Dessa forma, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a frequência de *bla*_{NDM} em bactérias Gram-negativas suspeitas de terem MBL, realizando testes genotípicos e fenotípicos complementares.

Materiais e métodos

Seleção de isolados bacterianos

Foram selecionados 22 isolados de bactérias Gram-negativas depositadas no banco de amostras do LMM. Para confirmar a presença de carbapenemases, foi realizada a pesquisa de genes de resistência por meio de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo *multiplex*, padronizada pelo LMM. Essa PCR-multiplex contempla a pesquisa dos genes *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} e a oxacilinase *bla*_{OXA-48}. Todos os isolados selecionados para os estudos foram *bla*_{NDM} positivos.

Teste de Hodge Modificado e Teste Triton Hodge

O teste de Hodge Modificado foi realizado utilizando a *Escherichia coli* (ATCC 25922), sendo o seu inóculo ajustado para o padrão de turbidez de 0,5 da Escala de McFarland e semeado em placas contendo ágar Mueller-Hinton (MHA). Discos de ertapenem (10 µg) foram colocados no centro das placas e em seguida, três a cinco colônias do isolado teste foram semeadas em uma linha reta a partir da borda do disco. Para o teste Triton Hodge as placas de MHA foram suplementadas com TritonX-100, adicionado durante a preparação do meio de cultura, sendo as demais etapas iguais ao Teste de Hodge Modificado, conforme descrito por (Pasteran et al., 2016).

Testes mCIM, eCIM e teste com inibidor de MBL

Os testes mCIM e eCIM foram realizados e interpretados conforme as recomendações do comitê *Clinical and Laboratory Standards Institute*. O teste com inibidor de MBL foi feito com discos de imipenem e meropenem com EDTA, conforme estabelecido pela nota técnica 01/2013 da ANVISA.

Resultados e Discussão

Observou-se o aumento gradativo da frequência de NDM em nosso hospital. Em 2017, identificamos a primeira NDM e no final de 2019 contabilizamos um total de 22 isolados *bla*_{NDM} positivos. Além da detecção molecular, realizamos 5 testes fenotípicos, sendo 3 para detecção de carbapenemases em geral (Teste de Hodge Modificado, Teste de Triton Hodge e mCIM) e 2 para detecção específica de MBL (eCIM e teste com inibidor de MBL). Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes genotípicos e fenotípicos para detecção de carbapenemases.

Isolado	Data de isolamento	Espécie	PCR	HODGE	HODGE-T	mCIM	eCIM	EDTA
KPC 1392	23/03/2017	<i>R. planticola</i>	NDM+/KPC+	INC	+	+	-	+
KPC 1508	21/09/2017	<i>R. planticola</i>	NDM+/KPC+	INC	+	+	-	+
KPC 1421	12/06/2017	<i>E. cloacae</i>	NDM+	+	+	+	+	+
VIGI 73	17/05/2018	<i>E. cloacae</i>	NDM+	+	+	+	+	+
VIGI 78	18/05/2018	<i>E. cloacae</i>	NDM+	+	+	-	x	+
VIGI 232	04/01/2019	<i>E. cloacae</i>	NDM+	+	+	+	+	+
URO 243	28/02/2019	<i>E. cloacae</i>	NDM+	+	+	+	+	+
KPC 1445	22/07/2017	<i>E. coli</i>	NDM+	-	INC	+	+	+
KPC 1628	17/01/2018	<i>E. coli</i>	NDM+	INC	+	+	+	+
VIGI 117	13/07/2018	<i>E. coli</i>	NDM+	+	+	+	+	+
VIGI 317	27/04/2019	<i>E. coli</i>	NDM+	+	INC.	+	-	+
VIGI 389	18/08/2019	<i>E. coli</i>	NDM+	-	+	+	+	+
KPC 1629	17/01/2018	<i>C. freundii</i>	NDM+	INC	+	+	+	+
VIGI 374	19/07/2019	<i>C. amalonaticus</i>	NDM+	-	+	+	+	+
VIGI 392	29/08/2019	<i>K. oxytoca</i>	NDM+	-	+	+	+	+
VIGI 398	05/09/2019	<i>K. oxytoca</i>	NDM+	-	+	+	+	+
VIGI 230	04/01/2019	<i>K. pneumoniae</i>	NDM+	INC	+	+	+	+
VIGI 231	04/01/2019	<i>K. pneumoniae</i>	NDM+	INC	+	+	+	+
VIGI 229	05/01/2019	<i>K. pneumoniae</i>	NDM+	INC	INC	+	+	+
VIGI 353	06/06/2019	<i>K. pneumoniae</i>	NDM+	-	+	-	x	+
VIGI 383	15/08/2019	<i>K. pneumoniae</i>	NDM+	-	+	+	+	+
VIGI 388	18/08/2019	<i>K. pneumoniae</i>	NDM+	-	-	+	+	+

Legenda: INC: resultado inconclusivo; MHT: teste de Hodge modificado; THT: teste de Triton Hodge; mCIM: teste de inativação de carbapenem modificado; eCIM: teste de inativação de carbapenem modificado com EDTA; EDTA: teste com inibidor de MBL- ácido etilenodiamino tetra-acético.

No teste de Hodge Modificado, apenas 31% dos isolados foram positivos, demonstrando a baixa acurácia do teste para detectar os isolados *bla*_{NDM} positivos. Por outro lado, observamos que 100% dos isolados de *E. cloacae* foram positivos para MBL, sugerindo a possibilidade da utilização deste teste para essa espécie de enterobactéria.

O teste de Triton Hodge apresentou 81% dos isolados com resultado positivo. A partir desse achado, é possível verificar que a sensibilidade do método pode aumentar consideravelmente pela adição de Triton X-100. Esse surfactante não iônico parece ser capaz de liberar a NDM da

membrana das bactérias, preservando a atividade da beta-lactamase (Pasteran et al., 2016).

Para o teste mCIM, 20 (91%) isolados mostraram resultados positivos. Já o eCIM apresentou 17 (77%) resultados positivos. O resultado do eCIM está interligado ao resultado do mCIM, de forma que quando o mCIM apresenta um resultado negativo, não é possível realizar a leitura do e-CIM. Sendo assim, 2 resultados do eCIM ficaram inconclusivos. Uma limitação verificada nos testes mCIM e eCIM é a incapacidade de diferenciar a produção de serina carbapenemases e MBL em isolados que abrigam os dois tipos de enzima (Sfeir et al., 2019). Isso pode ser observado nos 2 isolados de *R. planticola* testados neste estudo, ambos são produtores de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, no entanto, houve positividade apenas no mCIM. Esse achado sugere que, nesses casos, o resultado dos testes indicariam ser uma serina carbapenemase, com um falso negativo para presença de MBL.

Por fim, no teste com inibidor de MBL (EDTA), todos os isolados mostraram um resultado positivo, demonstrando ser um método prático e eficaz na rotina laboratorial para detectar isolados produtores de MBL.

Conclusões

O presente estudo demonstra um aumento substancial na frequência de isolados carreando o gene *bla_{NDM}*. Esse gene tem grande facilidade de disseminação, especialmente mediado pelas enterobactérias. O Teste de Triton Hodge, mCIM, eCIM e o teste com inibidor de MBL demonstraram boa acurácia, fácil execução e interpretação. Nossos resultados demonstram que os testes fenotípicos podem ser ferramentas importantes para direcionar o uso de antibacterianos, buscando uma terapia mais adequada ao paciente e colaborando com o controle da resistência bacteriana.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio ao desenvolvimento científico.

Referências

PASTERAN, F. et. al. Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n.3, 2016.

ROSA, T. J.; BIEGELMEYER, S. et. al. New Delhi, metalobetalactamase (NDM): uma revisão. **RBAC**, v. 49, n.1, p.36-4, 2017.

SFEIR, M. M.; HAYDEN, J. A.; FAUNTLEROY, K. A. et. al. EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.57, n.5, p. e01757-18, 2019.



YONG, D. et. al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p.5046–5054, 2009.