

## DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASES EM ENTEROBACTERIALES ISOLADAS DE CULTURAS DE VIGILÂNCIA

Amanda Dias Pedro (PIBIC-AF-IS/UEM), Pedro Henrique Rodrigues do Amaral, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Regiane Bertin de Lima Scodro, Rubia Andrea Falleiros de Pádua, Vera Lúcia Dias Siqueira (Orientadora), e-mail: vldsiqueira@uem.br.

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

**Ciências Biológicas / Microbiologia Médica**

**Palavras-chave:** resistência bacteriana, carbapenemases, PCR

### Resumo:

*Enterobacteriales* produtoras de carbapenemase surgiram nas últimas décadas como uma ameaça significativa à saúde humana, causando infecções praticamente intratáveis e com altas taxas de mortalidade. Vigilância clínica e genômica integradas são fundamentais para gerenciar efetivamente essa ameaça. Com o objetivo de facilitar a pesquisa molecular dos principais genes codificadores de carbapenemases em *Enterobacteriales* isoladas de culturas de vigilância, um teste de PCR-multiplex foi padronizado. Dados relacionados à espécie de *Enterobacteriales* testada, seu perfil de resposta aos carbapenêmicos e aos inibidores enzimáticos de carbapenemases foram anotados das fichas laboratoriais. O DNA bacteriano foi extraído e os genes codificadores das carbapenemases tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) e OXA-48 (OXA-carbapenemases) foram pesquisados por reação em cadeia da polimerase (PCR) tipo *multiplex*. O teste molecular detectou genes codificadores de KPC e NDM em 10 e 2 dos isolados bacterianos testados, respectivamente. Os resultados do teste molecular foram correspondentes aos do teste fenotípico em todos os isolados testados. OXA-48 não foi detectada em nenhum isolado além do controle. Os resultados deste estudo mostraram que o teste PCR-*multiplex* foi capaz de detectar os genes das principais carbapenemases presentes em *Enterobacteriales* isoladas de culturas de vigilância.

### Introdução

Bactérias da ordem *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemase (EPC) estão sendo cada vez mais relatadas em hospitais brasileiros. Vigilância clínica e genômica integradas são fundamentais para gerenciar efetivamente essa ameaça (GARCIA-BETANCUR et al., 2021). As carbapenemases mais comumente detectadas em *Enterobacteriales* são as do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) e OXA-48 (OXA carbapenemases), todas codificadas por genes *bla*, localizados em plasmídeos (BRINK, 2019). Um dos desafios para o controle dessas bactérias é o transporte

assintomático gastrointestinal por pacientes hospitalizados, que precede e aumenta significativamente o risco de desenvolver infecções causadas por esses patógenos (BRINK, 2019).

Desde 2013, detectar EPC em culturas de vigilância, vem sendo uma recomendação da ANVISA para o controle da disseminação deste tipo de resistência antimicrobiana (ANVISA, 2013). Entretanto, os testes recomendados estão baseados em detecção fenotípica e não são capazes de detectar as principais carbapenemases produzidas por EPC. A detecção molecular tem sido considerada padrão-ouro para identificação de genes de carbapenemases. Embora diversos métodos tenham sido desenvolvidos, PCR multiplex tem se concretizado como um método de bom custo-benefício.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi identificar genes codificadores das principais carbapenemases, através de PCR multiplex, em *Enterobacterales* isoladas de culturas de vigilância.

## Materiais e métodos

Foram selecionadas espécies de *Enterobacterales* isoladas a partir de culturas de vigilância, realizadas rotineiramente pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá. Os resultados dos testes fenotípicos para carbapenemases e o perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos foram coletados das fichas laboratoriais dos isolados. Isolados apresentando os genes  $bla_{KPC}$  (*Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705™),  $bla_{NDM}$  (*Escherichia coli*/LACEN) e  $bla_{OXA-48}$  (*Acinetobacter baumannii*/LEMC-UNIFESP) foram empregados como controles. O DNA total dos 20 isolados bacterianos selecionados foi extraído pelo método de fervura e a PCR realizada segundo Poirel et al. (2011), com modificações. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladora (*Veriti® 96-Well Thermal Cycler*, Foster City, CA, EUA) com as seguintes condições: 10' a 94 °C; seguidas por 36 ciclos de 30s a 94 °C, 40s a 52 °C e 50s a 72 °C e uma extensão de 5' a 72 °C. A sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizada foi previamente definida na literatura (POIREL et al, 2011). A visualização do produto final foi realizada em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio após submissão à corrida eletroforética a 100 V. Os fragmentos amplificados foram então fotografados em um fotodocumentador para posterior interpretação.

## Resultados e Discussão

O teste molecular de PCR-*multiplex* detectou genes codificadores de KPC e NDM em 10 e 2 dos isolados bacterianos testados, respectivamente. Os resultados do teste molecular foram totalmente correspondentes aos resultados do teste fenotípico, realizado rotineiramente no LEPAC e, no caso de NDM, confirmado genotipicamente pelo LACEN - PR (Tabela 1). O gene  $bla_{OXA-48}$  não foi detectado em nenhum isolado além do controle. Isolados de *Enterobacterales* com concentração inibitória mínima aumentada (>0,12 µg/ml) ou halo de inibição diminuído (<25 mm) para carbapenêmicos (meropenem ou ertapenem), embora ainda possam ser considerados sensíveis (BrCAST, 2021) a esses antimicrobianos, podem produzir carbapenemases e devem ser testados para isso (ANVISA, 2013).

Isolados não testados podem favorecer a disseminação silenciosa das carbapenemases e dificultar ainda mais o controle de infecções por esses microrganismos (GARCIA-BETANCUR et al., 2021). Os testes fenotípicos para detecção de carbapenemases, em sua maioria são trabalhosos, tempo consumíveis e de alto custo (BRINK, 2019). O PCR multiplex testado foi capaz de detectar os genes codificadores das carbapenemases mais comumente encontradas em EPC na nossa região, ou seja, KPC e NDM (GARCIA-BETANCUR et al., 2021).

**Tabela 1** – Perfil de resistência aos carbapenêmicos, detecção fenotípica de carbapenemases e gene de carbapenemase em *Enterobacterales* isoladas de culturas de vigilância

Espécie/Isolado	Perfil de resistência aos carbapenêmicos	Teste fenotípico carbapenemase	Gene detectado
<i>KpC controle</i> ( <i>Kp</i> ATCC BAA-1705)	ERT R MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>NDM controle</i> ( <i>Ec/LACEN</i> )	ERT R MEM R, IMI R	NDM	<i>Bla<sub>NDM</sub></i>
<i>OXA-48 controle</i> ( <i>Ab/LEMC-UNIFESP</i> )	ERT R MEM R, IMI R	Sem KPC ou MBL	<i>Bla<sub>OXA-48</sub></i>
<i>Kp1625</i>	ERT R MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp7784</i>	ERT R, MEM I, IMI I	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Ec3697</i>	ERT R, MEM R, IMI R	MBL LACEN - NDM	<i>Bla<sub>NDM</sub></i>
<i>Ec5597</i>	ERT R, MEM R, IMI R	MBL LACEN - NDM	<i>Bla<sub>NDM</sub></i>
<i>Kp7268</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp6075</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp1375</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp7602</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp6703</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp7599</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp1340</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp7276</i>	ERT R, MEM R, IMI R	KPC	<i>Bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Kp8160</i>	ERT I, MEM S, IMI S	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp7432</i>	ERT R, MEM S, IMI S	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp3655 (A)</i>	NT	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp3655 (B)</i>	NT	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp6913</i>	ERT R, MEM S, IMI S	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp6840</i>	NT	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp0403</i>	ERT R, MEM I, IMI R	Sem KPC ou MBL	Negativo
<i>Kp0438</i>	NT	Sem KPC ou MBL	Negativo

.Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Ec *Escherichia coli*, KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, NDM: *New Delhi* metalo-beta-lactamase, MBL: metalo-beta-lactamase. IMI: imipenem, MEM: meropenem, ERT: ertapenem, NT: não testado. R: resistente, I: intermediário, S: sensível

## Conclusões

Com os resultados deste estudo foi possível concluir que o teste molecular PCR-*multiplex* foi eficaz para detecção rápida dos principais genes codificadores de carbapenemases em *Enterobacterales* isoladas de amostras de culturas de vigilância.

## Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária e ao laboratório de Bacteriologia Médica da UEM. Agradeço também a minha orientadora por me auxiliar e me incentivar.

## Referências

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 01/2013: medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**. Brasília, DF, 2013.

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, disponível em: <http://brcast.org.br/documentos>. Acesso em 29.08.2021.

BRINK, A. J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. **Current Opinion in Infectious Diseases**., Hagerstown, v. 32, n. 6, p. 609-616, 2019.

GARCIA-BETANCUR, J. C. *et al.* Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Abingdon, v. 19, n. 2, p. 197-213, 2021.

POIREL, L. *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 70, n. 1, p. 119-123, 2011.