
DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Daniele Moreira de Souza,

Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto - SP

Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” em Microbiologia Clínica – 5º Turma

Junho de 2013

Introdução

O aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos pode ser considerado como uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente. A capacidade de adquirir resistência adquirida é propriedade bastante variável entre bactérias, algumas raramente adquirem resistência e outras o fazem com grande frequência. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrência de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente. As alterações genéticas podem ser originadas de mutações cromossômicas ou pela aquisição de plasmídios de resistência ou por transposons. A substituição das amostras sensíveis por amostras resistentes, na gênese de muitas infecções bacterianas, tem sido um fator constante de diminuição do valor terapêutico de muitos antimicrobianos.

A realização e a interpretação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos é uma das principais e desafiadoras tarefas do laboratório de microbiologia, seja pelas limitações dos testes utilizados ou seja pela detecção cada vez maior de novos mecanismos de resistência. Um dos principais motivos para a detecção de um mecanismo de resistência específico é para o controle e a investigação epidemiológica.

O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública.

1. *Staphylococcus* spp.

1.1 Detecção de resistência a Oxacilina/ Meticilina resistentes

A resistência às penicilinas (por exemplo, metilina e oxacilina) tem sido referido como "resistência à metilina", e as siglas "MRSA" (para resistente à metilina *S.aureus*) ou "MRS" (por estafilococos resistentes à metilina) ainda são comumente utilizado, embora metilina já

não é o agente de escolha para o teste ou tratamento. MRSA são todas as cepas de *S. aureus* que expressam o gene *mecA*, o qual dirige a produção de uma proteína de ligação à penicilina suplementar, PBP2a.

S. aureus e *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à oxacilina são resistentes a todos os agentes β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, combinações de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamase, carbapênicos e monobactâmicos.

Deteção de resistência à oxacilina testes para *mec-A*, deteção genética de cepas MRSA ou para proteínas expressa por *mec-A*, a penicilina-binding protein 2^a (PBP 2a) são os métodos mais acurados para prever a resistência à oxacilina. Usa-se o método de difusão com disco de cefoxitima 30 μ g. Reportar os resultados do disco de cefotaxina como oxacilina resistente ou sensível.

Outra metodologia utilizada é a semeadura das amostras em ágar Mueller Hinton suplementado com NaCl a 4% + 6 μ g/ml de oxacilina. Preparar o inóculo pelo método direto, ajustado na escala 0,5 de McFarland, introduzir o swab no inóculo e semear com movimento circular em uma pequena área da placa. Deixar secar, incubar por 24 horas de 33 a 35° C o crescimento maior de 1 colônia significa que a cepa é resistente à oxacilina. Métodos de deteção molecular para deteção do gene *mecA* ou PBP2a, são os métodos mais precisos para resistência à oxacilina.

Estafilococos oxacilina-resistentes são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos.

1.2 Deteção de sensibilidade reduzida à vancomicina

Desde o ano de 2009, o CLSI não recomenda que o teste de susceptibilidade a vancomicina seja realizado pelo método de disco difusão, e sim pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo aumento do número de casos de *S.aureus* vancomicina intermediário (VISA) e vancomicina resistente (VRSA). Os testes de sensibilidade a vancomicina podem ser realizados em placas prontas de BHI contendo 2 μ g/mL de vancomicina, assim as cepas que não crescerem podem ser consideradas sensíveis.

2. *Streptococcus pneumoniae* e outros *Streptococcus* spp.

2.1 Deteção de resistência à penicilina ou ampicilina

Os antimicrobianos betalactâmicos agem inibindo a síntese da parede celular por meio da ligação com as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). As PBPs são um grupo de enzimas que atuam na reação de transpeptidação que é o principal componente da parede celular bacteriana. A resistência às penicilinas e a outros betalactâmicos ocorre após mutações cromossômicas

seqüenciais e cumulativas em pelo menos três ou quatro genes dos cinco que codificam as PBPs de alto peso molecular.

A resistência é verificada utilizando o disco de oxacilina de 1µg. Halos maior ou igual a 20 mm a cepa é sensível à penicilina e a outros betalactâmicos que não precisam ser testados. Halos menores ou iguais a 19 deve -se realizar CIM para penicilina, meropenem e ceftriaxona ou cefotaxima.

2.2 Detecção de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas

Cepas de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes a macrolídeos podem apresentar resistência constitutiva ou induzida a Clindamicina ou podem ser resistentes apenas aos macrolídeos dependendo do mecanismo envolvido. No antibiograma de *Staphylococcus* spp ou *Streptococcus* beta-hemolíticos é preciso verificar se a resistência aos macrolídeos e lincosamina é devido aos genes *erm* ou *mrsA*, que são genes que codificam a resistência a essas drogas. Os isolados que apresentam a enzima MLS₁(induzível) expressam a resistência a clindamicina, já quando isolado apresenta a enzima MLS_C (constitutiva), ambas as drogas são resistentes. Para observar a presença desses genes faz-se necessário realizar o teste da indução utilizando as drogas eritromicina e clindamicina (Fig.01). A resistência induzida a clindamicina pode ser detectada através do D-teste ou teste da zona D.

A metodologia consiste em colocar os discos de eritromicina e clindamicina próximos para *Staphylococcus* spp. e para *Streptococcus* beta-hemolíticos. Se houver achatamento do halo de clindamicina, indica a presença do gene *erm*. Reportar resistência para ambos os antimicrobianos, se não houver achatamento do halo de clindamicina reportar o resultado como foi lido.

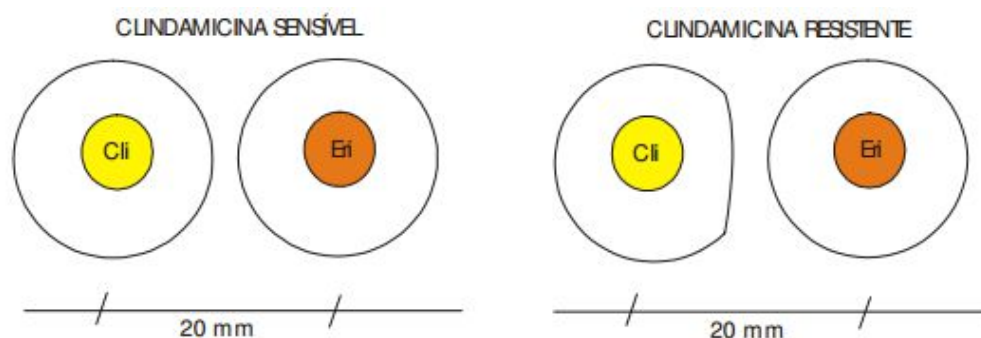


Figura 01- Teste de indução com eritromicina e clindamicina

3. *Enterococcus* spp

3.1 Detecção de resistência à penicilina ou ampicilina

Os enterococos podem ser resistentes à penicilina e ampicilina é rara a resistência devido à produção de betalactamase, mas nestas situações realizar o teste da betalactamase com disco de nitrocefina. Esse tipo de resistência não é detectado por método da difusão do disco de ou por método de diluição.

3.2 Detecção de resistência à vancomicina

A detecção precisa de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) é feita pelo teste de diluição em ágar, microdiluição e Etest.

Diluição em Ágar – meio de BHI Ágar com 6µg/ml de vancomicina, ajustar o inóculo na escala 0,5 de McFarland, depositar 10µl na superfície do meio e deixar o inóculo absorver, incubar a 35°C por 24 horas, se houver crescimento maior que 1 colônia, é suspeito de ser uma cepa resistente, tendo que ser confirmado realizando o teste de CIM;

3.3 Detecção de resistência a aminoglicosídeos

A resistência deve ser verificada utilizando discos de altas concentrações de gentamicina e estreptomicina devido ao alto nível de resistência. Outros aminoglicosídeos não devem ser testados, já que sua atividade contra o enterococo não é superior à gentamicina e à estreptomicina

4. Bacilos de Gram-negativos

4.1 Detecção de Betalactamase de espectro ampliado (ESBL)

O principal mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos β- lactâmicos em bacilos gram-negativos é a produção da enzima β-lactamase.

ESBLs podem conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e aztreonam.

As betalactamases de espectro ampliado são enzimas que inativam as penicilinas, as cefalosporinas de 1ª a 4ª gerações e os monobactâmicos em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. mirabilis*, e outros gêneros da família Enterobacteriaceae.

A detecção de ESBL baseia-se na inibição de betalactamases por ácido clavulânico preservando a ação de cefalosporinas de espectro ampliado. Esse método é vastamente aplicado, em disco-difusão, sistemas automatizados ou Etest e pode ser utilizado com confiança em espécies que tradicionalmente não produzem AmpC cromossômico como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P. mirabilis*. Entretanto, esse método torna-se ineficaz quando utilizado diante das espécies que naturalmente produzem betalactamases cromossômicas do

tipo AmpC, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Aeromonas spp.*, *M. morgani*, *C. freundii*, *Hafnia* e *P. aeruginosa*.

Elevada quantidade de enzimas AmpC pode dificultar a detecção e ESBL nessas espécies. O ácido clavulânico, em vez de servir como inibidor de betalacmase, pode frequentemente induzir produção elevada de AmpC e conseqüentemente produzir cepas altamente resistentes, é “mascarar” a presença de ESBL.

- **Testes confirmatórios para ESBL**

Entre as metodologias para confirmar se o isolado é produtor de ESBL, podemos citar Etest, disco aproximação, disco combinado e métodos automatizados (fig.02).

- (1) **Disco combinado** - esse método consiste na utilização de discos de cefoxima e ceftazidima associados ao ácido clavulânico. O teste pode ser realizado por disco-difusão ou diluição. Realizar o teste pela metodologia da difusão do disco com inóculo devidamente ajustado na escala 0,5 de McFarland, incubar por 18 a 20 horas, de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Medir os halos de inibição dos discos. Diferenças $\geq 5\text{mm}$ entre os halos de inibição obtidas com o disco da cefalosporina e o disco combinado a ácido clavulânico são consideradas positivas para ESBL.
- (2) **Etest ESBL (bioMérieux)** – consiste de uma fita plástica que combina um gradiente exponencial para ceftazidima, cefotaxima ou cefepima em uma das extremidades e, na outra, um gradiente da droga combinada com ácido clavulânico.
- (3) **Disco-aproximação** – também conhecido como *Double-disc synergism*, pode ser realizado de rotina nos antibiogramas para bacilos gram-negativos. É prática de baixo custo e tem com desvantagem a inexistência de uma distância-padrão ideal para ser aplicada entre os discos.

Ao realizar o antibiograma de rotina, colocar no centro da placa de Mueller-Hinton o disco de amoxicilina/ácido clavulânico e, ao redor deste, os antimicrobianos marcadores na distância entre 25 a 30 mm de centro a centro em relação ao disco central. Os demais antimicrobianos são colocados nas bordas da placa conforme os procedimentos do método da difusão.

Após incubação por 18 a 20 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, proceder à leitura. A formação de uma zona fantasma entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico é positiva para ESBL. A vantagem desse método é que pode ser realizado em conjunto com o antibiograma de rotina economizando tempo na liberação do resultado.

A dificuldade dessa metodologia consiste em encontrarmos uma distância ideal para a colocação dos discos, que pode variar de acordo com a amostra. Se não houver formação da zona fantasma de um dos antimicrobianos marcadores apresentem halos dentro dos padrões considerados sugestivos de ESBL utilizar outra das metodologias.

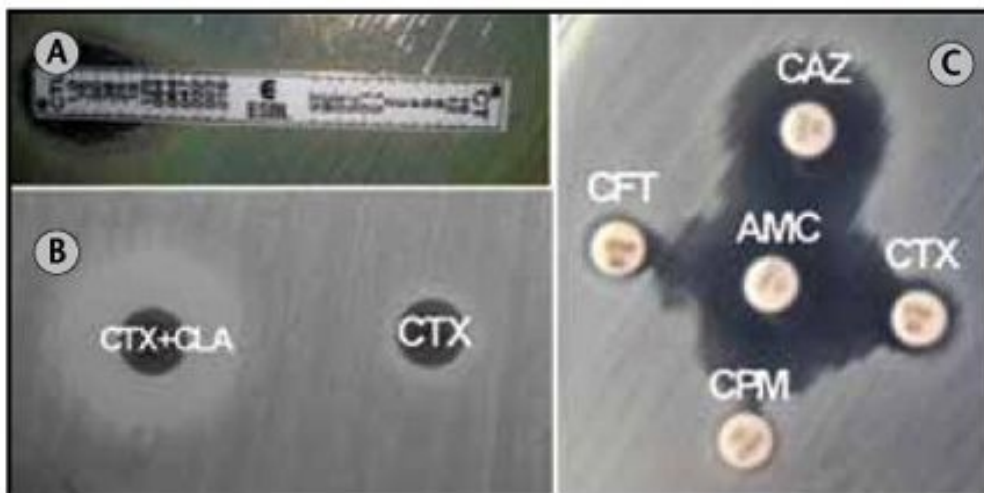


Figura 02 - Testes fenotípicos para identificação de ESBL

(A) ESBL E-test; (B) teste do disco combinado; (C) teste da aproximação dos discos.

ESBL: betalactamases de espectro estendido; **CTX:** cefotaxima; **CLA:** ácido clavulânico; **CAZ:** ceftazidima; **CFT:** ceftiofur; **AMC:** amoxicilina + ácido clavulânico; **CPM:** cefepima.

4.2 Detecção de Betalactamase do tipo AmpC

4.2.1 Betalactamase do tipo AmpC (cromossômica e plasmidial)

As β -lactamases AmpC tem um perfil de susceptibilidade antimicrobiana semelhante aquelas que produzem ESBLs, no que eles mostram susceptibilidade reduzida às penicilinas, cefalosporinas e aztreonam. No entanto em contraste com ESBLs, as AmpC podem ser resistentes a carbapenens.

A diferença fundamental entre AmpC cromossômica e plasmidial é que a AmpC de origem plasmidial é adquirida e/ou disseminada por meio de plasmídeos, enquanto a cromossômica faz-se por mutação genética.

Os microrganismos do grupo CESP (*C. freundii*, *Enterobacter spp.*, *S. marcescens*, *Providencia spp.*) e demais (*Hafnia alvei*, *Aeromonas spp.*, *M. morgani*, *P. aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*) podem expressar um gene cromossômico AmpC constitutivamente em baixos níveis, no entanto, quando induzido por betalactâmicos, desreprimem o gene, produzindo grande quantidade de betalactamase tipo AmpC. Na medida em que o indutor é retirado, a produção betalactamase volta ao nível basal, porém, algumas células continuam a produzir a enzima em concentrações elevadas de forma constante mesmo na ausência do indutor.

Habitualmente, as cepas do grupo CESP e demais apresentam-se resistentes ou com sensibilidade intermediária à cefoxitina, amoxicilina/clavulanato e cefalotina ao antibiograma e não requerem testes especiais para a detecção, uma vez que a enzima é produzida de forma

constitutiva em concentrações basais suficientes para expressar essa resistência no método de difusão.

- **Método de detecção de AmpC cromossômicas induzíveis (CESP e demais)**

Existem alguns testes descritos para a detecção de AmpC cromossômicas induzíveis:

- (1) Colocar um disco de cefoxitina (indutor) próximo ao disco de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima ou aztreonam distante 20 mm borda-a-borda. Se houver a produção induzida desta enzima, observa-se achatamento nos halos de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima ou aztreonam.
- (2) Utilizar outros indutores mais potentes de AmpC como imipenem, com consequente antagonismo à ceftazidima. Igualmente, observa-se achatamento no halo.

4.3 Detecção de carbapenemases

Enterobactérias produtoras de carbapemase usualmente se apresentam dentro da categoria intermediária ou resistentes a um ou mais carbapenêmicos. Além da alta resistência a uma ou mais cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona), a diminuição de sensibilidade ao ertapenem é o indicador mais sensível para a produção de carbapenemase. O teste confirmatório considerado “padrão-ouro” é por técnicas de biologia molecular.

Há dois motivos principais para se determinar o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias. O primeiro é epidemiológico e relaciona-se com a utilização de medidas de barreira e isolamento na assistência de portadores de **KCP**, **MBL** ou **NDM**. O segundo está relacionado ao direcionamento do tratamento antimicrobiano com carbapenêmicos contra amostras bacterianas produtoras de carbapenemases.

4.3.1 Metalobetalactamases e Nova Delhi metalobetalactamase (NDM)

Ambos são metalobetalactamases com sítio ativo dependente de zinco (classe B de amber). No grupo das metalobetalactamases temos uma infinidade de enzimas descritas, mas uma em especial vem chamando atenção por seu potencial de disseminação, a MDM.

Alguns autores demonstram que o uso de meropenem e imipenem associados ao EDTA é um método adequado para a detecção fenotípica de MBL (fig.03 e 04). Outra metodologia possível é o Etest MBL.

- **Detecção de Metalobetalactamases**

Entre as metodologias fenotípicas desenvolvidas, o teste de disco-aproximação pode apresentar boas sensibilidade e especificidade, porém esses resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato e o agente quelante utilizado. A metodologia de disco-aproximação consiste da inoculação do espécime clínico em uma placa de Muller Hinton

Agar, tal quais as recomendações preconizadas pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) para a realização de antibiograma. Em seguida, discos contendo substratos, como ceftazidima (30 μ g) e imipenem (10 μ g), são posicionados na placa, ao lado de um disco estéril de papel de filtro adicionado de uma solução de agente quelante. Em amostras produtoras de M β L observam-se uma distorção e a ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria teste na região do Agar onde houve a difusão do agente quelante. Já em testes negativos não se observa a alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria teste.

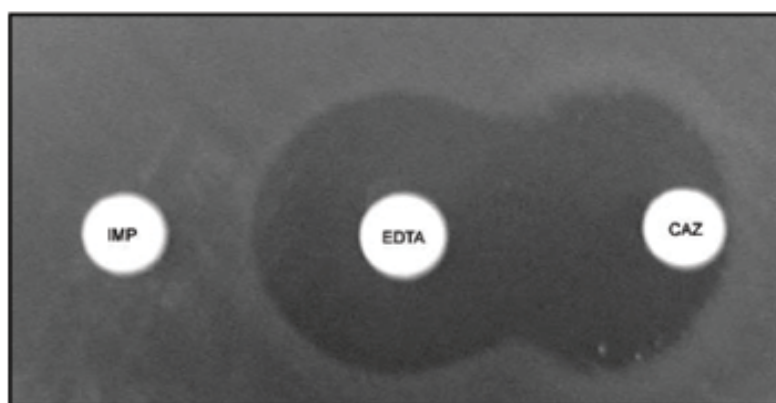


Figura 03- Amostra clínica apresentando teste fenotípico positivo para a produção de M β L. O teste demonstra a distorção e a ampliação do halo de inibição do crescimento da bactéria testada na região do ágar onde houve a difusão do agente quelante (EDTA).

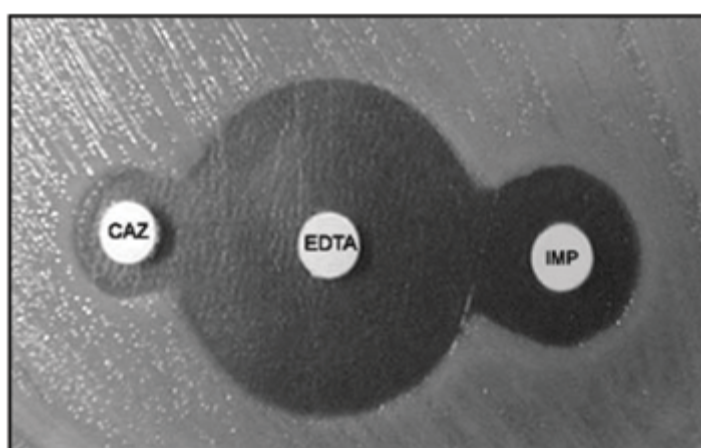


Figura 04 - Amostra clínica apresentando teste fenotípico negativo para a produção de M β L. O teste não evidencia alteração no halo de inibição do crescimento da bactéria testada na região do ágar onde houve a difusão do agente quelante (EDTA).

Com base no mesmo princípio da difusão em ágar, desenvolveu-se uma fita de Etest, a qual é incorporada de imipenem em uma das extremidades e imipenem associado ao EDTA na outra (fig.05). Essa metodologia é bastante simples e apresenta custo mais elevado. Para essa metodologia considera-se amostra produtora de M β L, porém apresentar uma concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem associado ao EDTA três diluições menor ou inferior àquela demonstrada pela amostra frente ao imipenem.

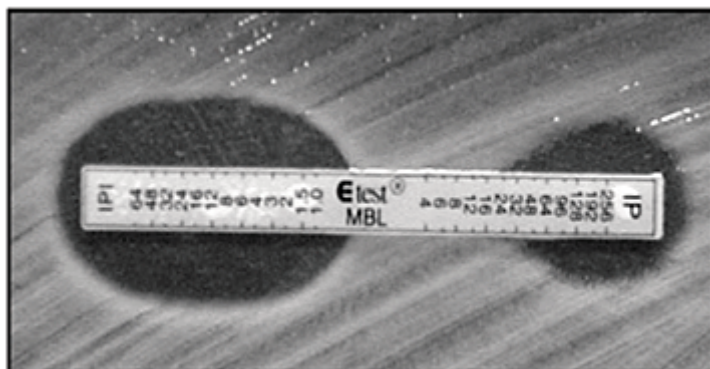


Figura 05.- Amostra clínica apresentando teste fenotípico positivo para a produção de M β L por meio da metodologia de Etest. A CIM observada pela amostra-teste na extremidade da fita contendo somente imipenem (IP) é de 4 μ g/ml, ao passo que, na outra extremidade, a amostra testada demonstrou uma CIM \leq 1 μ g/ml contra imipenem associado ao EDTA. Uma diferença na CIM superior a três diluições.

4.3.2 Detecção de KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é uma enzima produzida por bactérias Gram-negativas (enterobactérias), e sua detecção em isolado bacteriano confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Atualmente estão sendo relatados carreando também determinantes de resistência a aminoglicosídeos. É importante salientar que os carbapenens compreendem uma classe amplamente utilizada no tratamento de infecções envolvendo Enterobacteriaceae multirresistente.

Atualmente, KPC constitui importante mecanismo de resistência no contexto hospitalar mundial. Sua pesquisa é relevante a fim de limitar sua disseminação, contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas, em que é imprescindível a vigilância microbiológica, juntamente com ação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

As metodologias usadas para rastreamento de KPC são diversificadas: focalização isoeétrica, discodifusão, E-test e teste de Hodge modificado (fig.06 e 07). Pode-se ainda pesquisar o gene bla_{KPC} por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou ribotipagem. Já foi dito

que sistemas de automação usados para teste de suscetibilidade podem não identificar com precisão os isolados KPC positivos.

Assim, a triagem fenotípica se dá preferencialmente por meio de antibiograma com discos de cefalosporinas subclasse III (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona) e imipenem (IPM), meropenem (MEM) e ertapenem (ETP), além do teste de Hodge modificado (MHT). Para a confirmação o mais amplamente utilizado é o teste de Hodge modificado que quando positivo indica a produção da enzima ainda que nem todos os isolados produtores de carbapenemase sejam MHT positivos

- **Teste de Hodge Modificado**

Preparar uma suspensão de *E. coli* na escala 0,5 McFarland, em solução salina ou caldo e fazer uma diluição 1:10. Semear na superfície do ágar Mueller- Hinton. Deixar o inóculo secar por 3 a 10 minutos. Colocar o disco de ertapenem ou meropenem no ágar semeado com a *E. coli*. Com auxílio de alça ou swab, tocar na superfície de 3 a 5 colônias do microrganismo a ser testado ou da cepa para o CQ de uma cultura de 18 a 20 horas e inocular em linha reta, iniciando da borda do disco. O traçado deverá ter 20 a 25 mm de comprimento.

Após a incubação, examinar a placa para verificar um aumento de crescimento ao redor do traçado feito com o isolado ou do controle positivo e negativo na intersecção entre o traçado e o halo de inibição.

Crescimento aumentado, positivo para produção de carbapenemase, ausência no aumento do crescimento negativo para produção de carbapenemase. Reportar como teste de Hodge positivo.

Um resultado positivo no MHT indica a necessidade de realização de técnicas moleculares para confirmação do gene KPC.

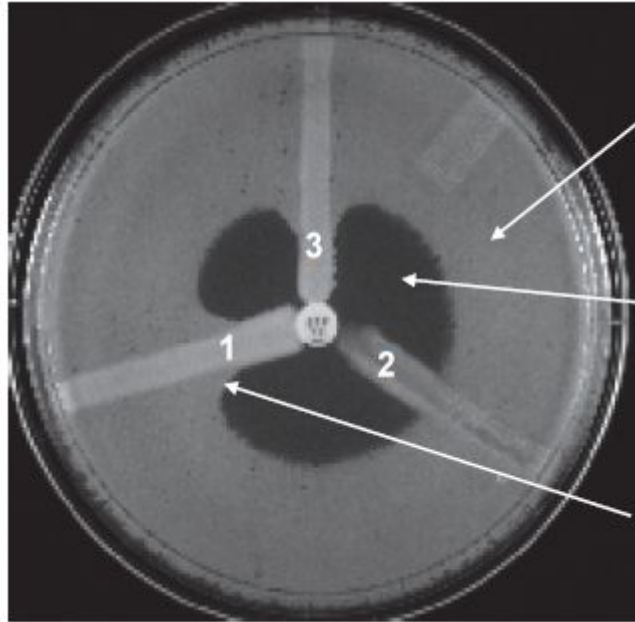


Figura 06- Teste de Hodge Modificado

- (1) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705, resultado positivo
- (2) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, resultado negativo
- (3) Isolado clínico, resultado positivo

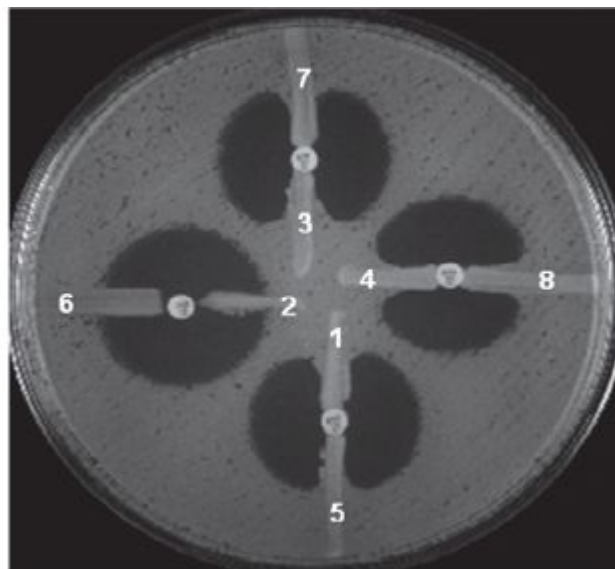


Fig 07 – Teste de Hodge Modificado

- (1) *K. pneumoniae* ATCC BAA- 1705, resultado positivo
- (2) *K. pneumoniae* ATCC BAA- 1706, resultado negativo
- (6) *K. pneumoniae*, resultado negativo
- (3,4,5,7 e 8) resultado positivo

Referências Bibliográficas

- CLSI publication M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2012.
- CLSI publication M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2013.
- OLPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3.ed. Sarvier: São Paulo, 2010.
- MENDES, C. M.F.; OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C.M.; SINTO, I. S. Microbiologia Clínica: Coleção 156 perguntas e respostas. 1. ed. Sarvier: São Paulo, 2005.
- OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; BARBERINO, M. G. M. de A. Microbiologia Clínica: Coleção 156 perguntas e respostas. 2. ed. Sarvier: São Paulo, 2012.
- TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, 5.ed. Atheneu: São Paulo, 2008.