

NAYARA RIBEIRO GOMES

METALOBETALACTAMASES: UMA REALIDADE EM HOSPITAIS
BRASILEIROS

Academia de Ciência e Tecnologia AC&T

Setembro/2015

NAYARA RIBEIRO GOMES

METALOBETALACTAMASES: UMA REALIDADE EM HOSPITAIS
BRASILEIROS

Trabalho apresentado à Academia de Ciência de
Tecnologia AC&T para a obtenção de título de pós
graduação em Microbiologia Clínica sob a
orientação da professora Dra Margarete Teresa
Gottardo de Almeida

Academia de Ciência e Tecnologia AC&T

Setembro/2015

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu a oportunidade de chegar onde cheguei, por ter estado ao meu lado para superar cada obstáculo que a vida me proporcionou. A meus pais Antonio e Claudina por acima de tudo ter me ensinado a nunca desistir de meus objetivos, por todo amor e carinho. Amo vocês. A minha irmã Thaina e meu esposo Cleiton por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força maior, presente em todos os momentos de minha vida, por me guardar e iluminar sempre.

Aos meus pais que sempre me apoiaram em situações difíceis e me ensinaram a nunca desistir.

Agradeço minha irmã por todo carinho e amor.

A meu esposo por todo amor e paciência e companheirismo.

“...que em todas as ocasiões em que lidar com meu próximo, eu possa levar-lhe não só os remédios, as análises, e pesquisa, mas profundamente meu Senhor muito, muito amor...”

(Oração do farmacêutico)

Resumo

A resistência a carbapenêmicos é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada taxa de mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas. Dentre os mecanismos de resistências aos carbapenêmicos a produção de carbapemenases, seja por sua eficiência hidrolítica, pela sua codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons, ou pela sua rápida disseminação em âmbito mundial vem tendo um impacto significativo na saúde humana e no Brasil não tem sido diferente.

As metalobetalactamases são carbapemenases pertencente a classe B de Ambler. Essas enzimas conferem, às bactérias resistência as cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos mas não ao monobactam aztreonam. Atualmente são conhecidas dez subclasses de metalobetalactamases (IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, AIM, DIM, KHM e TMB) .

As metalobetalactamases são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes* *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* e *Aeromonas spp.*. Entretanto desde o início da década de 1990, genes que codificam metalobetalactamases têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, que não produzem naturalmente tais enzimas, como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp* e gêneros da família *Enterobacteriaceae*.

A partir de 2002, diversos estudos foram realizados no Brasil buscando identificar subclasses de MBL em isolados de bacilos gram negativos não fermentadores e em enterobactérias.

A detecção desses casos aponta uma oportunidade para controle da disseminação desse tipo de mecanismo de resistência no Brasil. Esse controle só poderá ser alcançado com um grande esforço multidisciplinar, que inclui, além de outras medidas detecção precoce de pacientes colonizados, implementação de precauções de contato e de tratamento adequado.

Palavras chaves: Metalobetalactamases, carbapemenases, NDM, IMP, VIM .

Abstract

Resistance to carbapenems is a serious public health problem world-wide, particularly the high mortality rate and the small number of therapeutic options. Among the mechanisms of resistance to carbapenems production carbapemenases either on his hydrolytic efficiency by their coding genes located on mobile genetic elements such as plasmids and transposons, or its rapid spread worldwide has had a significant impact on human health and in Brazil it has been no different.

The metalobetalactamases are carbapemenases belonging to Class B Ambler. These enzymes confer resistance to bacteria cephalosporins, penicillins and carbapenems but not to the monobactam aztreonam. Currently there are ten known subclasses of metalobetalactamases (IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, AIM, DIM, KHM and TMB).

The metalobetalactamases are intrinsically produced by certain microorganisms, such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes* *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* and *Aeromonas* spp .. However since the beginning of the 1990s, genes encoding metalobetalactamases have been reported in clinical pathogens important, that do not naturally produce such enzymes such as *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp and genera of the family Enterobacteriaceae.

Since 2002, several studies were conducted in Brazil seeking to identify subclasses of MBL in isolates of gram negative bacilli and non-fermenting enterobacteria.

The detection of these cases points to an opportunity to control the spread of this type of resistance mechanism in Brazil. This control can only be achieved with a large multidisciplinary effort, which includes, among other early detection measures of colonized patients, implementation of contact precautions and appropriate treatment.

Key words: Metalobetalactamases, carbapemenases, NDM, IMP, VIM .

Lista de abreviaturas

- BGNNF– Bacilo gram negativo não fermentador
- DIM – Dutsch imipenemase
- GIM – German imipenemase
- IMP – BGNNF Imipenemase
- IRAS – Infecções relacionadas `a assistência à saúde
- KHM – Kyorin imipenemase
- KPC – Klebsiella produtora de carbapemenase
- MBL- Metalobetalactamase
- NDM- New Deli imipenemase
- OXA- Oxapenicilinase
- PBPs- Proteínas ligadoras de penicilinas
- PCR- Reação em cadeia de polimerase
- SPM- São Paulo imipenemase
- TMB- Tripoli metalobetalactamase
- SIM- Verona imipenemase

SUMÁRIO

1- RESUMO.....	5
2- ABSTRACT.....	6
3- LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
4- INTRODUÇÃO.....	9
5- MATERIAIS E METODOS.....	12
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
7- CONCLUSÃO.....	15
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

INTRODUÇÃO

Os betalactâmicos representam hoje a classe de antibióticos mais utilizados em casos de infecções associadas à assistência relacionada à saúde (IRAS) por patógenos oportunistas, fato este propício ao surgimento de bactérias capazes de desenvolver genes de resistência para determinado grupo.

Basicamente três mecanismos de resistência têm sido descritos sendo:

- Alteração no sítio de ligação da droga (Proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)) sendo este o principal mecanismo de resistência de betalactâmicos em cocos gram positivos;
- Alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana: A perda das proteínas de membrana externa, porinas, que constituem o canal de entrada dos betalactâmicos e a presença de bombas de efluxo são classificados como mecanismos de resistência relacionados à alteração da permeabilidade da membrana externa. Enquanto a perda de porinas constitui um mecanismo exclusivo de bactérias Gram-negativas, porque somente essas possuem membrana externa, a presença de bombas de efluxo pode estar presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estes mecanismos geralmente encontram-se associados a outros mecanismos de resistência bacteriana, como, principalmente, a produção de betalactamases.
- Degradação da droga através da produção de betalactamases: Sendo este o principal mecanismo de resistência de bactérias gram negativas aos betalactâmicos.

As betalactamases são enzimas capazes de hidrolisar os antibióticos betalactâmicos através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel betalactâmico, gerando compostos sem atividade antimicrobiana (BUSH, 2001). Vários sistemas de classificação para as betalactamases foram propostos, mas atualmente utiliza-se a combinação das características estruturais e funcionais das betalactamases: a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1991) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995). A classificação molecular de Ambler baseia-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, e reconhece quatro classes, designadas de A a D. As enzimas das classes A, C e D contém serina em seu sítio ativo; as enzimas da classe B são representadas pelas metaloenzimas, contendo zinco no sítio ativo. A classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das beta-lactamases, e é dividida em

diferentes subgrupos. As carbapenemases, enzimas que degradam os betalactâmicos da classe dos carbapenêmicos, fazem parte de um grupo heterogêneo de betalactamases; sendo conhecidas as enzimas da classe A de Ambler (subgrupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros), classe B de Ambler (subgrupos 3a, 3b e 3c de Bush-Jacoby-Medeiros) e classe D de Ambler (grupo 2 de de Bush-Jacoby-Medeiros).

Na classe B de Ambler estão as metalobetalactamases (MβLs), carbapenemases que possuem atividade hidrolítica dependente da interação da droga com o íon zinco no sítio ativo da enzima (NORDMANN & POIREL, 2002; QUEENAN & BUSH, 2007). As MβLs constituem o grupo de carbapenemases de maior importância clínica por apresentarem atividade hidrolítica não somente sobre os carbapenêmicos, mas também sobre penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e oxacefamicinas e não serem inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam (BUSH, 1998; LARAKI et al., 1999). Atualmente são conhecidas dez subclasses de MβL adquiridas: IMP (imipenemase) (OSANO et al., 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et al., 1999), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al., 2005), AIM (Australian imipenemase) (YONG et al., 2007), KHM (Kyorin University Hospital imipenemase) (SEKIGUCHI et al., 2008), NDM (Nova Deli imipenemase) (YONG et al., 2009), DIM (Dutsch imipenemase) (POIREL et al., 2009) e TMB (Tripoli metalo-betalactamase) (SALABI et al., dados não publicados). A primeira MβL descrita foi IMP-1, encontrada em uma cepa de *Serratia marcescens* no Japão (OSANO et al., 1994), onde estas enzimas apresentam uma alta prevalência. Atualmente, as MβLs tipo IMP são encontradas em outros países da Ásia, na Austrália, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Itália, Portugal e Brasil, em diversas espécies de enterobactérias e BGNNF (MALTEZOU et al., 2008).

Os genes que codificam essas enzimas são carregados por plasmídeos que além de determinarem a resistência aos antimicrobianos, podem também transmitir genes de virulência. Devido às características de transmissão de um plasmídeo, os genes de resistência são também facilmente disseminados entre gêneros e espécies diferentes, resultando em surtos causados por patógenos mais virulentos e resistentes. A KPC e a metalobetalactamase VIM são as betalactamases mais frequentes descritas (Queenan & Bush 2007).

As metalobetalactamases são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* e *Aeromonas spp.*. Entretanto desde o início da década de 1990, genes que

codificam metalobetalactamases têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, que não produzem naturalmente tais enzimas, como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp* e gêneros da família *Enterobacteriaceae*.

A resistência a carbapenêmicos em enterobactérias é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas. Algumas publicações evidenciam taxas de mortalidade em 30 dias em 40% a 50% dos casos (TUMBARELLO et al.2012).

Desde a descrição inicial da KPC no Brasil, varias publicações tem demonstrado a sua disseminação em todo o país presente em vários gêneros e espécies bacterianas.

A NDM foi identificada em 2008 pela primeira vez e desde então tem sido amplamente descrita em enterobactérias causando infecções e surtos principalmente no subcontinente Indiano(YONG et al.2009). Na américa latina alguns casos foram relatados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM , o primeiro caso de NDM-1 no Brasil foi detectado no Rio Grande do Sul em cepas de *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado por meio do levantamento bibliográfico de publicações científicas relacionadas a casos de MBL no Brasil.

O levantamento de dados foi realizado baseado em trabalhos científicos publicados nos sites de pesquisas Pubmed, Google acadêmico e Scielo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram revisados 47 artigos com casos de MBL no Brasil, incluindo NDM-1, IMP, VIM e SPM-1.

A partir de 2002, diversos estudos foram realizados no Brasil buscando identificar subclasses de MBL em isolados de bacilos gram negativos não fermentadores e em enterobactérias. Em 2003 Santos-Filho et. al pesquisaram a incidência de metalobetalactamases em 250 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* destas 14% apresentaram resistência aos carbapenens, sendo que 75% foram positivas para o gene blaSPM-1 e 25% para o gene blaIMP1.

Foi descrito em Pernambuco por Poirel et al.(2004) uma propagação clonal de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem em 19 amostras isoladas de uma enfermaria, neste estudo foi observado que 11 destes isolados clínicos eram produtores de metalobetalactamases todos do tipo SPM-1. No ano seguinte Magalhães et al (2005) observaram 48 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* onde 50% eram resistentes ao imipenem e destes 62,5% eram produtores de MBL tipo SPM-1.

Mendes et al (2004) descreveram em Brasília o primeiro relato da enzima IMP-16 no mundo a cepa que abrigava esta variante do gene IMP foi isolada em abril de 2002 de um paciente de 60 anos de um hospital da capital brasileira. Alguns estudos realizados em São Paulo mostraram a incidência de genes tipo IMP, VIM e SPM. Sander et al. (2005) publicou em estudo com 183 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* 36 dos isolados tiveram a detecção de MBLs sendo SPM-1(55,6%), VIM-2 (30,5%) e IMP-1 (8,3%) sendo este estudo o primeiro relato de caso publicado da enzima VIM-2 no Brasil

Em um estudo com 573 cepas de enterobactérias resistente aos carbapenens entre os anos de 2011 a 2013, 74% das cepas foram isolados *Klebsiella pneumoniae*, 15,2% *Enterobacter spp*, 8,8% somaram espécies intrinsecamente resistente à polimixina (*Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri*), *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* somaram apenas 2,1% dos isolados. Destas, 205 cepas foram caracterizadas quanto à presença dos genes blaKPC, blaNDM, blaIMP, blaVIM, blaOXA-48, que codificam carbapenemases. O gene predominantemente detectado nas cepas foi blaKPC, encontrado em 77,0% de todos

os isolados testados. Além de blaKPC, o gene blaNDM foi detectado em 4 cepas (1,9% dos isolados testados) e blaIMP foi detectado em uma cepa (0,4% dos isolados testados). Cepas de *P. mirabilis* apresentaram a maior variabilidade quanto à detecção de genes bla. De seis cepas analisadas cinco foram positivas para a presença de blaKPC e uma das cepas portava tanto o gene blaNDM como o blaIMP. Os genes blaVIM e blaOXA-48 não foram detectados em nenhuma das cepas testadas.

Em isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL no Brasil, tem sido relatada a presença de IMP e VIM, porém o principal problema se concentra em isolados produtores de enzimas SPM-1, que parecem ser endêmicos e responsáveis por altos índices de mortalidade.

Outro estudo publicado na revista Clin Biomed Res em 2014 feito com um total de 701 isolados mostrou que as enterobactérias resistentes aos carbapenens predominantes foram *Klebsiella pneumoniae* (47% das amostras positivas) e *Enterobacter cloacae* (18%). As carbapenemases mais frequentes foram KPC (48%), OXA-48 (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 enterobactérias resistentes aos carbapenens pertencentes ao grupo Proteae (*Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*) foram associados a menor positividade para carbapenemase do que isolados de outras enterobactérias resistentes aos carbapenens. 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.

Segundo Zanol et al.(2010) em estudo com 292 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no Hospital das clínicas/USP de Ribeirão Preto- SP no período de abril a agosto de 2007, 54 cepas foram resistentes aos carbapenêmicos. Destas 24 apresentaram testes fenotípicos para produção de meta-beta-lactamase (MBL) e encaminhados para a análise por PCR e a detecção dos genes envolvidos na produção de MBL. Como resultado do sequenciamento genético 5 cepas (9,3%) apresentaram o gene correspondente a SPM-1 e os demais genes pesquisados (IMP,VIM,GIM,SIM e KPC) nenhum foi amplificado (90,7 %).

CONCLUSÃO

A incidência de isolados de MBL em hospitais brasileiros vem se tornando a cada dia uma realidade em nossos hospitais.

Diante dos dados bibliográficos analisados foi observado que os maiores índices de MBL no Brasil são do tipo SPM-1.

É fundamental que todos os serviços de saúde e laboratórios no Brasil utilizem os mesmos procedimentos e critérios interpretativos para a detecção de carbapemenases.

A detecção desses casos aponta uma oportunidade para controle da disseminação desse tipo de mecanismo de resistência no Brasil. Esse controle só poderá ser alcançado com um grande esforço multidisciplinar, que inclui, além de outras medidas detecção precoce de pacientes colonizados, implementação de precauções de contato e de tratamento adequado.

A emergência de bactérias produtoras de MBL requer mudanças na rotina dos laboratórios de microbiologia, adequando métodos capazes de detectar a sua produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBLER, R.P.; COULSON, A.F.; FRÈRE, J.M.; GHUYSEN, J.M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R.C.; TIRABY, G.; WALEY, S.G. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* p. 269-70. 1991.
- BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.*v.32. n.7. p.1085-1089. 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* v.39. n.6. p.1211-33. 1995.
- GONCALVES, Diana Christina Pereira Santos et al . Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 42, n. 4, p. 411-414, Aug. 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000400010&lng=en&nrm=iso>. access on 14 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000400010>.
- LARAKI, N.; FRANCESCHINI, N.; ROSSOLINI, G.M.; SANTUCCI, P.; MEUNIER, C.; DE PAUW, E.; AMICOSANTE, G.; FRERE, J.M.; GALLEN, M. Biochemical Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 Metallo- β -Lactamase IMP-1 Produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 43. p. 902–906. 1999.
- LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metalo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 43. p. 1584-1590. 1999.
- MAGALHÃES, V.; LINS, A.K.; MAGALHÃES, M. Metallo- β - lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian journal of microbiology** V.36, n2, p.123-125, 2005

- NORDMANN, P.; NAAS, T. ; FORTINEAU, N. ; POIREL, L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol.* v. 10. n.5. p. 436-440. 2007.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* v. 8. p.321-331. 2002.
- POLOTTO, Milena. Detecção de genes de beta-lactamases de amplo espectro em *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isoladas em São José do Rio Preto - SP. 2010. 61 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94825>
- POIREL, L.; MAGALHÃES, M.; LOPES, M.; NORDMANN, P.; Molecular analysis of metallo- β - lactamase gene blaSPM-1- surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Recife, Brazil **Antimicrobial Agents Chemotherapy** V48, p.1406- 1409, 2004
- SADER, H.S.; REIS ,A.O.; SILBER, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs, SPMs the diversity of metallo- β - lactamase produced by carbapenem – resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** V. 11, n1. P.73-76, 2005.
- SANTOS – FILHO,L.; SANTOS , I.; XAVIER , D.E.; MENEZES ,L.C. Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β - lactamase isoladas em João Pessoa/PB, Brasil **Revista Brasileira de análises clínicas** V.35, n3, p.127-131, 2003
- TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T. A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β - lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* v. 50. p. 673-679. 2002.
- TOLENTINO, F.M. Detecção e Identificação dos genes de beta-lactamases blaSHV, blaTEM e blaCTX-M em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 2009.

- ZANOL, F. M. et al. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul **J Bras Patol Med Lab** v. 46 ,n. 4 , p. 309-314 ,agosto 2010