INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

KLEBSIELLA PNEUMONIAE: ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA KPC E NDM EM UM HOSPITAL DE FOZ DO IGUAÇU, PR

ALINE CRISTIANE CECHINEL ASSING BATISTA

Foz do Iguaçu
2020

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCIÊNCIAS

KLEBSIELLA PNEUMONIAE: ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA KPC E NDM EM UM HOSPITAL DE FOZ DO IGUAÇU, PR

ALINE CRISTIANE CECHINEL ASSING BATISTA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
Coorientador: Prof. Me. Robson Michael Delai

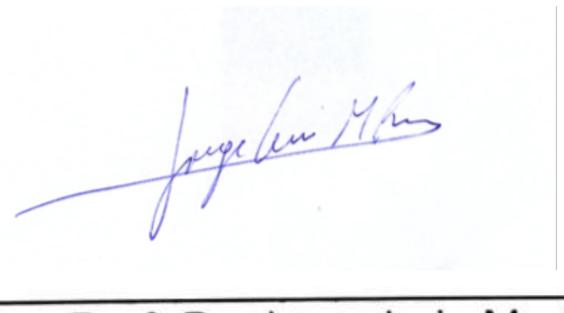
Foz do Iguaçu
2020

ALINE CRISTIANE CECHINEL ASSING BATISTA

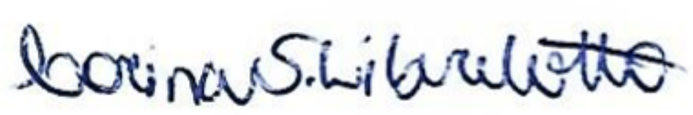
KLEBSIELLA PNEUMONIAE: ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA KPC E NDM EM UM HOSPITAL DE FOZ DO IGUAÇU, PR

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA



Profª. Dra. Carina Sperotto Librelotto
UNIOESTE

Prof. Dra. Daiane Pereira Camacho
UNINGA

Foz do Iguaçu, 16 de outubro de 2020.

Catalogação elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação
Catalogação de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

B333k
Batista, Aline Cristiane Cechinel Assing.
Klebsiella pneumoniae: análise fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência KPC e NDM em um hospital de Foz do Iguaçu, PR / Aline Cristiane Cechinel Assing Batista. - Foz do Iguaçu, 2020.
63 f.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
Orientador: Jorge Luis Maria Ruiz.

1. Bacteriologia médica - estudo - hospital. 2. Bactéria (Klebsiella pneumoniae). 3. Análise - Enzimas NDM e KPC. I. Ruiz, Jorge Luis Maria, Orient. II. Título.

CDU: 616-093/-098

Dedico este trabalho a todos aqueles que me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO (S)

Em primeiro lugar agradeço à Deus que me permitiu alcançar este momento tão gratificante em minha vida.

A minha família, em especial meu esposo Alexandre e meu filho João Vitor pela ausência durante o período em que me preparava para atingir esse objetivo. Por me fazerem companhia até altas horas da madrugada quando precisava estudar para as provas e por me trazer café enquanto estudava.

Ao meu professor orientador Dr. Jorge não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo por me aceitar como sua aluna e ter me conduzido durante todo o período em que cumpria os créditos com paciência e dedicação. Obrigada também pela amizade que construímos nesse período, obrigada pelos cafés que me ofereceu nas disciplinas condensadas e principalmente pelos ensinamentos que me transmitiu através do seu exemplo.

Ao meu coorientador Me. Robson por acreditar no meu potencial me abrindo as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte da minha pesquisa. Aos meus colegas de equipe do laboratório de análises clínicas e CMT por me auxiliarem nos experimentos, em especial à Renata e à Andressa por abraçarem esse desafio juntamente comigo me auxiliando na realização da parte prática. Ao estagiário Vinícius por fazer a cotação de insumos da parte molecular, ao Marcelo por me auxiliar com a estatística e à minha amiga Andréia por me motivar e me emprestar seu ombro nos momentos mais difíceis durante essa jornada.

Agradeço imensamente ao Hospital Ministro Costa Cavalcanti por acreditar no meu trabalho financiando toda a pesquisa, além de me autorizar a utilizar os seus laboratórios.

Aos meus pais que compartilharam comigo cada momento vivido durante este tempo, sempre me incentivando a nunca desistir e a perseguir meus objetivos. Em especial ao meu pai Osnei, que hoje infelizmente não se faz presente fisicamente, mas sua memória me faz relembrar da época em que vivemos e do incentivo que ele me deu para alcançar os meus objetivos, mesmo quando pareciam tão distantes.

Aos meus colegas de curso que de certa forma acrescentaram valor ao que sou hoje, pelo seu auxílio, pelas experiências trocadas e pela sua amizade.

Ao Erwin, pela paciência em sanar as milhares de dúvidas que surgiram ao longo de todo o programa, inclusive na reta final do mestrado. Agradeço pela disponibilidade com que respondia as mensagens e pelos momentos de descontração, mas sobretudo pela amizade que construímos e pelas mensagens positivas nos momentos de desespero.

Às minhas colegas da Vetqualis, principalmente à Roberta e Camila por todo incentivo, auxílio e cumplicidade. Por me fazerem enxergar um potencial que nem eu mesma conseguia ver. Principalmente à Roberta, por me aturar várias vezes na sua casa para orientações, me fazer café e ouvir os meus desabafos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

BATISTA, Aline Cristiane Cechinel Assing; RUIZ, Jorge Luis Maria; DELAI, Robson Michael. ***Klebsiella pneumoniae***: análise fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência KPC e NDM em um Hospital de Foz do Iguaçu, PR. 2020. 63 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* tem se destacado principalmente no ambiente hospitalar, isso devido a sua capacidade de expressar uma diversidade de enzimas de resistência a antibióticos, facilitando sua disseminação e dificultando a terapêutica clínica. Enzimas como as carbapenemases do tipo metalobetalactamases (NDM) e a KPC hidrolisam não apenas os carbapenêmicos, mas também os demais betalactâmicos, levando ao surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes. Objetivo: Realizar análise fenotípica e molecular das enzimas de NDM e KPC provenientes de um hospital de Foz do Iguaçu – PR. Metodologia: Foram selecionadas 200 amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* oriundas de pacientes internados no período de julho de 2018 a julho de 2019. Para a prova fenotípica foi seguido a Nota técnica 01/2013 da ANVISA e PCR para amplificação dos genes codificadores de NDM e KPC. As provas microbiológicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Ministro Costa Cavalcanti (HMCC) e a pesquisa molecular junto ao Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira. Resultados: No teste fenotípico, 165 (82,5%) cepas apresentaram positividade para KPC, 2 (1%) cepas para MBL e 17 (8%) cepas para ambos KPC e MBL, enquanto que no ensaio molecular o gene *bla*KPC foi detectado em 162 (81%) cepas, o gene *bla*NDM em 2 (1%) cepas e ambos os genes em 19 (8,5%) cepas; 16 (8,5%) cepas em ambas as metodologias foram negativas para as carbapenemases pesquisadas. Em suma, pôde-se concluir que houve uma eficiência diagnóstica positiva entre ambas as técnicas e que constituem ferramentas eficientes na triagem de carbapenemases do tipo KPC e NDM em áreas endêmicas.

Palavras-chave: Carbapenemase. *Klebsiella pneumoniae*. NDM. KPC. Tríplice fronteira

BATISTA, Aline Cristiane Cechinel Assing; RUIZ, Jorge Luis Maria; DELAI, Robson Michael. ***Klebsiella pneumoniae***: phenotypic and molecular analysis of KPC and NDM resistance mechanisms in a hospital in Foz do Iguaçu, PR. 2020. 63 pages. Master´s thesis of the Graduate Program in Biosciences – Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae has stood out mainly in the hospital environment, due to its ability to express a diversity of antibiotic resistance enzymes, facilitating its dissemination and hindering clinical therapy. Enzymes like carbapenemases of metalobetalactamases type (NDM) and KPC hydrolyze not only carbapenems, but also other beta-lactams, leading to the emergence of increasingly resistant microorganisms. Objective: To perform phenotypic and molecular analysis of NDM and KPC enzymes from a hospital in Foz do Iguaçu - PR. Methodology: 200 clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* from patients admitted from July 2018 to July 2019 were selected. For the phenotypic test, Technical Note 01/2013 from ANVISA and PCR was followed to amplify the genes encoding NDM and KPC. The microbiological tests were carried out in partnership with the Laboratory of Clinical Analysis of the Hospital Ministro Costa Cavalcanti (HMCC) and molecular assays at the Center for Tropical Medicine of the Triple Frontier. Results: In the phenotypic test, 165 (82.5%) strains were positive for KPC, 2 (1%) strains for MBL and 17 (8%) strains for both KPC and MBL, while in the molecular assay the *bla*KPC gene was detected in 162 (81%) strains, the *bla*NDM gene in 2 (1%) strains and both genes in 19 (8.5%) strains; 16 (8.5%) strains in both methodologies were negative for the researched carbapenemases. In short, it could be concluded that there was a positive diagnostic efficiency between both techniques and that they constitute efficient tools in the screening of KPC and NDM carbapenemases in endemic areas.

Key words: Carbapenemases. *Klebsiella pneumoniae*. NDM. KPC. Triple frontier

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Célula procarionte 17
Figura 2 – Bacilo gram negativo (BGN). 18
Figura 3 – Isolamento de *K. pneumoniae* em Ágar Macconkey 19
Figura 4 – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco-difusão 27
Figura 5 – Teste fenotípico realizado em placa de Mueller Hinton 32
Figura 6 – Análise de eficiência de 16S 40
Figura 7 – Análise de eficiência de KPC 40
Figura 8 – Análise de eficiência de NDM 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos betalactâmicos 21
Tabela 2 – Classificação das Betalactamases por Ambler, Bush-Jacob e Medeiros24
Tabela 3 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação dos genes KPC e NDM em amostras de *K. pneumoniae* 34
Tabela 4 – Amostras clínicas fonte dos isolados 37
Tabela 5 – Resultados dos testes fenotípico e molecular de acordo com o material e setor de coleta das amostras..... 46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Incidência de isolados por setor 38
Gráfico 2 – Resultados identificação fenotípica 39
Gráfico 3 – Resultados identificação molecular 42
Gráfico 4 – Relação de amostras positivas e negativas para KPC..... 43
Gráfico 5 – Relação de amostras positivas e negativas para NDM 44
Gráfico 6 – Relação de amostras positivas e negativas para KPC e NDM..... 45
Gráfico 7 - Relação de positividade para o mecanismo de resistência KPC e material biológico analisado 47
Gráfico 8 - Relação de positividade para o mecanismo de resistência NDM e material biológico analisado 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	Ácido Fenilborônico
EDTA	Ácido Etileno diamino-acético
MBL	Metalobetalactamase
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
NDM	Metalobetalactamase *New Delhi*
BGN	Bacilo gram negativo
ESBL	Betalactamases de amplo espectro
UCO	Unidade de Terapia intensiva coronariana
UTI	Unidade de terapia intensiva Geral
LACEN	Laboratório Central do Estado do Paraná
SONIH	Sistema Online de Notificação de Infecção Hospitalar
OMS	Organização Mundial da Saúde
SESA	Secretaria Estadual de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
CDC	Centro de Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Referencial teórico 16
1.1.1 Família *Enterobacterales* 17
1.1.2 Klebsiella pneumoniae 18
1.1.3 Epidemiologia 20
1.1.4 Resistência microbiana 20
1.1.5 Mecanismos de resistência 23
1.1.5.1 Carbapenemase Classe A 25
1.1.5.2 Carbapenemase Classe B 25
1.1.5.3 Carbapenemase Classe C 26
1.1.5.4 Carbapenemase Classe D 26
1.1.6 Diagnóstico 26
1.2 Justificativa 29
1.3 Pergunta Norteadora e Hipótese 29
2 OBJETIVOS 30
3 MATERIAL E MÉTODOS 31
3.1 Identificação microbiana 31
3.2 Identificação fenotípica 31
3.3 Identificação molecular 33
3.3.1 Extração do DNA 34
3.3.2 PCR em tempo real 35
3.3.3 Eficiência e especificidade da PCR em tempo real 35
3.4 Análise estatística dos dados 36
4 RESULTADOS 37
4.1 Identificação fenotípica 37
5 DISCUSSÃO 49
6 CONCLUSÕES 53
7 REFERÊNCIAS 54

1. INTRODUÇÃO

O surgimento e disseminação de microrganismos multidroga resistentes (MDR) têm se tornado uma séria ameaça à saúde pública global e ao que tudo indica, sem previsão de ser solucionada, podendo afetar indivíduos em qualquer momento da vida. As enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos estão associadas às elevadas taxas de mortalidade, reduzido número de opções terapêuticas e avançado potencial de disseminação (LACEN/SC, 2016).

Embora o desenvolvimento de resistência antimicrobiana seja um fenômeno natural dos microrganismos, esses mecanismos estão sendo potencializados e selecionados devido à fatores como o mau uso de medicamentos antimicrobianos na saúde, antimicrobianos de má qualidade, capacidade laboratorial deficitária, programas inadequados ou inexistentes de prevenção e controle de infecções, favorecendo a transmissão de microrganismos dessa ordem, bem como expondo os demais indivíduos aos mesmos, entre outros fatores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Dados emitidos pelo CDC (*Centers for disease control and Prevention)* dos Estados Unidos da América revelam que pelo menos 2,8 milhões de pessoas são infectadas por bactérias multirresistentes e mais de 35 milhões de pessoas morrem em decorrência disso só nos Estados Unidos (CDC, 2019).

Recentemente, o *Grupo Ad Hoc de Coordenação Interagencial da ONU sobre resistência antimicrobiana* (IAGC) emitiu um alerta de que as doenças relacionadas à resistência aos medicamentos podem causar 10 milhões de mortes a cada ano até 2050, além de danos catastróficos à economia. Podendo levar aproximadamente 24 milhões de pessoas à extrema pobreza até o ano de 2030 (IACG, 2019).

Atualmente, o saldo de óbitos em decorrência de infecções por microrganismos resistentes é de 700 mil pessoas por ano. Com isso, cada vez mais, doenças comuns estão se tornando mais difíceis de serem tratadas e procedimentos médicos que tem o objetivo de salvar vidas, se tornam cada vez mais arriscados (OPAS, 2019).

Dentre os principais microrganismos causadores de doenças e associados a multirresistência, a *Klebsiella pneumoniae* tem se destacado significativamente, principalmente no âmbito hospitalar, devido á sua elevada incidência e capacidade de adquirir e transferir informações genéticas que configuram mecanismos de multirresistência, sendo enquadrada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um

patógeno alvo de alta prioridade na busca por novos antimicrobianos (SANTOS; SECOLI, 2019).

Dos principais mecanismos de sobrevivência desenvolvido pelas bactérias, em especial a *K. pneumoniae*, estão as carbapenemases, enzimas que conferem hidrólise dos principais antimicrobianos utilizados em terapias hospitalares, tais como penicilinas, cefalosporinas de 1ª a 4ª gerações, monobactam e carbapenens. Esse grupo é composto por 3 perfis: metalobetalactamases (MBL), Oxa-carbapenemases e carbapenemases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), sendo que destas, as principais são as MBL do tipo *Nova Delhi* metalobetalactamases (NDM) e KPC, por apresentarem rápida e ampla disseminação mundial após seus primeiros relatos (ANVISA, 2013).

O diagnóstico precoce constitui ferramenta de suma importância para a caracterização desses mecanismos expressos por bactérias resistentes, principalmente em âmbito hospitalar. No entanto, apenas avaliar o perfil de sensibilidade e resistência do antibiograma a esses fármacos, ainda é insuficiente, visto que a junção de betalactamases de espectro estendido ou do tipo AmpC com deficiência de permeabilidade, também podem configurar resistência aos carbapenens sem que haja de fato produção de carbapenemase (SCHRONER, 2018).

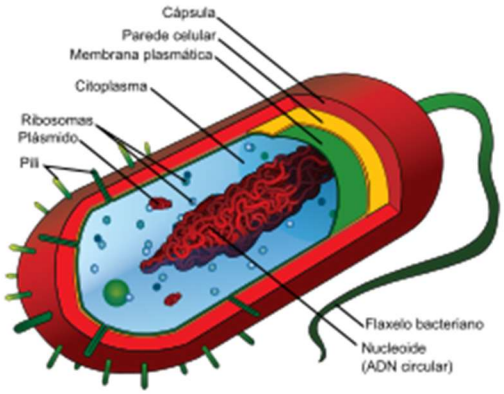
Dessa forma, são necessários testes complementares que alcancem melhores resultados na identificação e isolamento desses microrganismos. Para isso, os testes fenotípicos para carbapenemases e o uso de biologia molecular, através da amplificação dos genes que codificam essas resistências configuram instrumentos valiosos para o rastreio e isolamento desses mecanismos (ANDRADE, 2008).

1.1. Referencial teórico

As bactérias representam um grande grupo de organismos microscópicos tanto em termos de número quanto em variedade. São seres procariontes (Figura 1) e pertencem ao Reino Monera. Podem ser encontrados em inúmeros ambientes, desde o solo e as massas de água, até as superfícies internas e externas de seres humanos, animais inferiores e plantas. No entanto, nem todas as bactérias são benéficas ao homem, há uma série de bactérias patogênicas como por exemplo o bacilo causador da tuberculose ou o coco causador da meningite, entre outros. O fato desses microrganismos

permanecerem apenas como colonizadores ou causadores de infecções dependerá da sua natureza e das defesas do corpo humano (MENEZES e SILVA; NEUFELD, 2015).

Figura 1: Célula procarionte

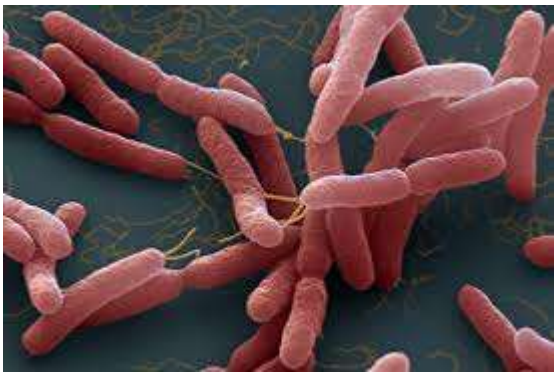


Fonte: ANIMALES, 2020.

1.1.1. Família ***Enterobacterales***

A família das *Enterobacterales* é constituída por um grande e diversificado grupo de microrganismos, classificados em 60 gêneros, 250 espécies e quatro grupos entéricos ainda não nomeados. Esta é composta por bacilos gram negativos (BGN) conforme exemplificado na figura 2, que apresentam características gerais tais como fermentação da glicose, a maioria são oxidase negativos (exceto *Plesiomonas* sp.), anaeróbios facultativos, redutores de nitrato a nitrito, não formadores de esporos, a maioria apresenta flagelos peritríqueos conferindo mobilidade (exceto *Shigella* sp. e *Klebsiella* sp.*)*, podem ser encapsulados ou não. Para sua identificação e isolamento são necessários meios de cultura específicos, seguido por uma série de provas bioquímicas (CUNHA, 2014; ADEOLU *et al*, 2016).

Figura 2 - Bacilo gram negativo (BGN).



Fonte: MCVEY SCOTT, KENNEDY e CHENGAPPA, 2017.

Os Bacilos Gram Negativos (BGN) são bactérias com formato de bastonetes que através do método de coloração de Gram se coram na cor rosa quando observados ao microscópio óptico. Esse método recebeu essa nomenclatura em homenagem ao patologista dinamarquês Hans Christian Joaquin Gram, que realizou sua descoberta em 1884 e modernamente, esta técnica permanece como padrão-ouro para a caracterização bacteriana (KASVI, 2019).

Embora esse grupo de bactérias possa ser encontrado no solo, na água ou em associação com outros microrganismos vivos, incluindo plantas e insetos, seu habitat favorito é o intestino de animais e seres humanos, seja compondo parte da microbiota natural ou como agentes de infecção (HIRAI, 2018).

Bactérias pertencentes a esta família geralmente estão associadas aos casos de sepse, infecções do trato urinário como cistite e pielonefrite, além de pneumonias comunitárias e nosocomiais (CUNHA, 2014).

1.1.2. Klebsiella pneumoniae

O gênero *Klebsiella* recebeu essa nomenclatura no final do século XIX, em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs. O bacilo atualmente conhecido como *Klebsiella* também foi citado por Carl Friedlancer e por muito tempo foi designado como “bacilo de Friedlancer”, e notoriamente conhecido por causar graves pneumonias (KONEMAN *et al*., 2008).

Espécies de *Klebsiella* estão amplamente distribuídas na natureza e no trato gastrintestinal de seres humanos e animais. Em humanos, ela pode colonizar a pele, a faringe, a bexiga e o intestino. No entanto, essa espécie também pode ser patogênica e causar pneumonias associadas à ventilação mecânica, bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, doença pulmonar crônica e infecções de tecidos (CABRAL, 2011).

Klebsiella pneumoniae é um patógeno bacteriano associado a infecções hospitalares graves que acomete principalmente o trato urinário e respiratório, podendo causar de igual modo septicemia e meningite. Sua maior incidência é em ambientes hospitalares acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos (KONEMAN *et al*., 2008).

De acordo com Cabral (2011), *K. pneumoniae* caracteriza-se por ser um bacilo gram negativo, imóvel, não produtor de esporos e produtor de capsulas polissacarídicas, onde estão alojados seus antígenos, permitindo a sua diferenciação em até 77 sorotipos. Ademais, realizam a fermentação da lactose, produzem urease, não produzem indol (exceto a *K. oxytoca*) e não produzem sulfeto de hidrogênio. Sua caracterização morfologia se dá através de colônias grandes e mucoides em placas de isolamento primário (figura 3), podendo se desenvolver com facilidade em meios específicos para o seu cultivo como o Ágar Macconkey.

Figura 3 - Isolamento de *K. pneumoniae* em Ágar Macconkey.

Fonte: MICROBIOLOGY PICTURES, 2019.

1.1.3. Epidemiologia

Klebsiella pneumoniae é a bactéria mais comumente isolada em amostras clínicas e pode causar uma forma clássica de pneumonia primária. Sua presença na orofaringe de pessoas saudáveis pode ocorrer em até 6% dos casos, no entanto sua prevalência ocorre em pessoas hospitalizadas, podendo chegar até 20% dos casos, uma vez que este grupo se apresenta mais debilitado (KONEMAN *et al*, 2010).

Segundo dados epidemiológicos as espécies desse gênero estão envolvidas em 7-14% dos casos de pneumonias nosocomiais, 6-17% de infecções do trato urinário, 4-15% de sepses, 3-20% de infecções neonatais e 4-17% das infecções em UTIs (QUEIROZ *et al*., 2014).

No Brasil, o Estado do Paraná, através de sua plataforma online de notificações (SONIH) publicou um comunicado de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS), dentre os quais 3141 (48%) das notificações foram por enterobactérias e destas, 1293 (38,4%) foram de *K. pneumoniae* (SESA, 2018).

Ainda de acordo com o mesmo autor Sesa (2018), destas 1293 notificações, 276 (21,3%) foram referentes a infecções primárias de corrente sanguínea, 172 (13,3%) estavam relacionadas a infecção de sítio cirúrgico, 487 (37,7%) com infecções do trato urinário e 358 (27,7%) com pneumonia.

Segundo Barcellos *et al* (2018), a taxa de infecções hospitalares no Brasil configura cerca de 14% das internações. Dados da OMS revelam que aproximadamente 234 milhões de indivíduos realizam procedimentos hospitalares por ano, destes um milhão morre em consequência de infecções hospitalares e sete milhões passam por complicações.

1.1.4. Resistência microbiana

Desde a descoberta da penicilina, os antimicrobianos têm sido utilizados no intuito de tratar as mais variadas patologias ao longo dos tempos, no entanto, esse fator tem desencadeado o surgimento de microrganismos mais complexos e com mecanismos de resistência versáteis. Esse processo evolutivo dos microrganismos tem sido observado e intensificado após o uso maciço de antimicrobianos que por pressão seletiva

consequentemente seleciona as bactérias “mais fortes” (aquelas resistentes) e mata as “mais fracas”, dificultando o tratamento (PEREIRA, 2016).

Os antibióticos (Tabela 1) são classificados e divididos conforme sua estrutura química e mecanismo de ação, podendo ser betalactâmicos, tetraciclinas, quinolonas, entre outros. Além disso, existem os antibióticos com espectro estendido, como as penicilinas e cefalosporinas (betalactâmicos), amplamente utilizadas em infecções mais graves e causadas em sua maioria por integrantes da família das Enterobactérias (OLIVEIRA, 2016).

Tabela 1: Classificação dos betalactâmicos.

Classe/ Família	Antibióticos
Sulfonamidas	Sulfadiazina, Sulfametoxazol-trimetoprina
Betalactâmicos	Penicilinas: benzilpenicilina, ampicilina, oxacilina, amoxicilina; Cefalosporinas 1ª geração: cefalotina, cefalexina, cefazolina; Cefalosporinas 2ª geração: cefoxitina, cefuroxima; Cefalosporinas 3ª geração: ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima; Cefalosporinas 4ª geração: cefepime; Cefalosporinas 5ª geração: ceftarolina; Carbapenens: imipinem, meropenem, ertapenem Monobactâm: aztreonam;
Glicopeptideos	Vancomicina e teicoplanina;
Polimixinas	Colistina e Polimixina B;
Tetraciclinas	Tetraciclina, doxiciclina, tigeciclina;
Aminoglicosídeos	Gentamicina, amicacina, tobramicina;
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina;
Lincosamidas	Clindamicina;
Anfenicóis	Cloranfenicol;
Quinolonas	Ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina;
Miscelânia	Ácido fusídico; nittrofurantoína;

Fonte: (PEREIRA, 2016 adaptado pela autora).

As bactérias podem apresentar resistência intrínseca ou natural a um determinado fármaco, e isso ocorre quando uma classe inteira bacteriana apresenta resistência a uma classe específica de antibiótico, já em contrapartida a resistência adquirida é um tipo de mecanismo que ocorre em nível genético, podendo ser de natureza

cromossômica através de mutação, transdução e transformação ou extra cromossômica, através de plasmídeos (PEREIRA, 2016).

Em um contexto geral, após o microrganismo encontrar a sua melhor estratégia, os novos genes que codificam resistência, são disseminados para as bactérias adjacentes através da transferência horizontal de plasmídeos e dessa forma perpetuando e intensificando essa característica para as demais classes bacterianas (OLIVEIRA, 2016).

Os antibióticos da classe dos betalactâmicos são os mais utilizados no tratamento de doenças graves, principalmente as cefalosporinas de segunda e terceira geração (AKTURK *et al*. 2016). Em consequência do frequente uso desses antimicrobianos, acabaram surgindo uma série de modificações e mecanismos de resistência como maneira de defesa e sobrevivência desse tipo de bactéria (ROCHETTI, 2011).

A antibioticoterapia indiscriminada tem se tornado um grande desafio à saúde pública em todo o mundo, pois tem levado à proliferação de bactérias dotadas de enzimas como as carbapenemases do tipo metalobetalactamases (MBL) e as KPCs que hidrolisam não apenas os carbapenêmicos, mas também os demais betalactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, contribuindo para o surgimento de microrganismos com perfil de resistência a múltiplos antibióticos, sendo conhecidas como bactérias multirresistentes, levando a um quadro epidêmico de infecções hospitalares com implicações graves tanto no âmbito social quanto econômico (SANTOS, 2004; CUNHA, 2014; SHEN, 2016; ANVISA, 2013).

A resistência antimicrobiana leva ao aumento dos custos médicos, prolongando as hospitalizações e aumentando a mortalidade. Pois, quando infecções já não podem ser tratadas por antibióticos de primeira linha, geralmente medicamentos mais caros devem ser utilizados. Impactando no tempo de tratamento da doença, aumentando os custos de saúde, bem como a carga econômica e a qualidade de vida sobre a sociedade (OPAS, 2018).

Segundo Santos e Secoli (2019), o custo médio anual gasto em combate aos microrganismos multirresistentes, gira em torno de U$ 45 bilhões. E o valor gasto com terapias anualmente pode chegar a 70% das despesas com saúde na Índia, 43% no Paquistão e 20% no Brasil.

1.1.5. Mecanismos de resistência

A resistência bacteriana é a capacidade que os microrganismos desenvolvem para derrotar os antibióticos que foram projetados para a sua morte. O uso indiscriminado ou mesmo abusivo dos mesmos, trouxe consigo o desenvolvimento de mecanismos de resistência comuns, principalmente em ambientes hospitalares (CDC, 2019).

Dentre os principais mecanismos temos: 1- a mutação gênica, na qual acontece a alteração do alvo do antimicrobiano, dessa forma não comprometendo o funcionamento bacteriano; 2- alteração da permeabilidade da membrana celular, impedindo a entrada do antibiótico na célula; 3- bombas de efluxo que realiza o bombeamento do antibiótico para fora da mesma; e 4- a hidrólise, ou seja, a capacidade de degradar ou de inativar o antibiótico (LOUREIRO *et al,* 2016).

A resistência aos antimicrobianos está diretamente relacionada à expressão fenotípica dos organismos procariontes, podendo ser intrínseca, adquirida ou susceptibilidade. O surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica pode ser considerado como uma manifestação natural baseada no princípio evolutivo de sua adaptação decorrente das mudanças no seu meio ambiente. Sabe-se que as enterobactérias podem levar apenas 20 minutos para se replicar, ou seja, a partir dessa premissa, muitas gerações podem ser produzidas em apenas algumas horas, levando a inúmeras oportunidades para uma evolução adaptativa (CUNHA, 2014).

A partir da introdução da Ampicilina em 1960, a resistência aos agentes betalactâmicos tornou-se um importante problema clínico. Os antibióticos betalactâmicos compreendem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e o monobactam. Eles representam em torno de 60% do total de antimicrobianos utilizados, isto devido a sua eficácia e segurança. Entretanto, os carbapenêmicos são considerados mais potentes e com espectro de ação mais estendido seja com bactérias gram positivas ou negativas, o que os tornam fármacos de última linha e utilizados em casos de infecções graves onde o microrganismo possui perfil de resistência abrangente (SCHÖRNER, 2016; LOUREIRO *et al,* 2016).

A carbapenemase de acordo com Oliveira (2016) é uma enzima produzida por bactérias, que confere resistência aos antibióticos da classe dos carbapenens através da hidrólise. Atualmente existem duas correntes de classificação desse mecanismo: Ambler e Bush-Jacob-Medeiros. Enquanto a classificação de Ambler baseia-se na homologia

proteica, ou seja, na similaridade de aminoácidos e não nas características funcionais, Bush e colaboradores se fundamentam nas propriedades funcionais enzimáticas, na estrutura molecular e na sequência nucleotídica para a classificação em grupos funcionais (ABRANTES e NOGUEIRA, 2017).

Segundo a classificação de Bush (Tabela 2) o primeiro grupo é composto por betalactamases que não sofrem inibição total pelo ácido clavulânico, o segundo pelas penicilinases, cefalosporinases e betalactamases de amplo espectro e o terceiro e último grupo pelas metalobetalactamases, inibidas mais fracamente por inibidores de betalactamases. Por outro lado, Ambler utiliza uma classificação de A a D, sendo as serino-carbapenemases integrantes das classes A, C e D e as metalobetalactamases pertencentes a classe B, pois possuem um íon zinco em seu sítio alvo (AREND, 2014).

Tabela 2 - Classificação das Betalactamases por Ambler, Bush-Jacob e Medeiros.

GRUPO DE BUSH-JACOBY-MEDEIROS	CLASSE MOLECULAR DE AMBLER	SUBSTRATOS PREFERENCIAIS	INIBIÇÃO PELO ÁCIDO CLAVULÂNICO	PRINCIPAIS REPRESENTANTES
1	C	Cefalosporinas	-	Enzimas AmpC de BGN
2ª	A	Penicilinas	+	Penicilinases de estafilococos
2B	A	Penicilinas e cefalosporinas	+	TEM-1, TEM-2 e SHV-1
2BE (ESBLS)	A	Penicilinas, cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	+	TEM-3 a TEM-160, SHV-2 a SHV-101 e *Klebsiella oxytoca* K1
2BR	A	Penicilinas	+/-	TEM resistentes aos inibidores
2C	A	Penicilinas e carbenicilina	+	Hidrolisam carbenicilina
2D	D	Penicilinas e cloxacilina	+/-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2E	A	Cefalosporinas	+	Cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico

2F	A	Penicilinas, Cefalosporinas e carbapenens	+	Carbapenemases inibidas pelo ácido clavulânico
3	B	Maioria dos betalactâmicos (inclusive carbapenens)	-	Carbapenemases dependentes de zinco (metalo betalactamases)
4	Não determinada	Penicilinas	-	Penicilinase de *Burkholderia cepacia*

Legenda: BGN: Bacilo gram negativo; TEM-1, TEM-2, SHV-1, TEM-3, TEM-160, SHV-2, SHV-101, OXA-1, OXA-11 e PSE-2: genes produtores de betalactamases; ESBL: betalactamases de amplo espectro.

Fonte: OLIVEIRA, 2009.

1.1.5.1. Carbapenemase Classe A

Este tipo de carbapenemase hidrolisa todos os betalactâmicos, no entanto sua atividade pode ser inibida em partes pelo ácido clavulânico, tazobactam e o ácido borônico. A KPC compõe essa classe de resistência, sendo a KPC-2 e KPC-3 mais frequentemente encontradas devido a sua localização em plasmídeos, e as únicas linhagens detectadas em território nacional até o momento. (OLIVEIRA, 2016).

1.1.5.2. Carbapenemase Classe B

As metalobetalactamases são capazes de hidrolisar todos os betalactâmicos com exceção do monobactam e podem ser inibidas apenas por quelantes de zinco como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), não sendo afetados por outros inibidores como o ácido clavulânico entre outros. Enzimas pertencentes a esse grupo são potencialmente perigosas, pois limitam as opções de tratamento (OLIVEIRA, 2016). Fazem parte desse grupo as metalobetalactamases dos subtipos SPM (São Paulo Metalobetalactames), VIM (Verona Imipinemase), GIM (German imipinemase), IMP (Imipinemase), AIM (Australian imipinemase) e NDM (Nova Deli metalobetalactamase) (ABRANTES e NOGUEIRA, 2017).

1.1.5.3. Carbapenemase Classe C

Neste grupo se encontram as cefalosporinases ou AmpC (Adenosina monofosfato cíclico). Elas sozinhas não promovem a resistência aos carbapenêmicos, mas quando associadas à fatores como a deficiência de porinas, podem gerar redução da sensibilidade e inclusive conferir resistência aos carbapenêmicos (ABRANTES e NOGUEIRA, 2017).

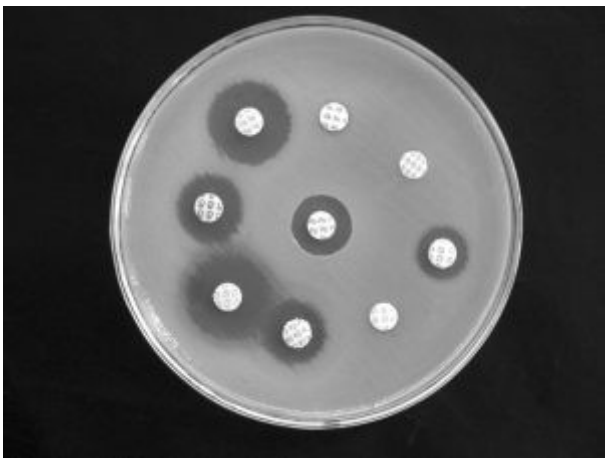
1.1.5.4. Carbapenemase Classe D

Esse grupo, assim como as carbapenemases da Classe A, apresentam enzimas serino-proteases. Hidrolisam as oxacilinas, oximinocefalosporinas e carbapenêmicos. As mais conhecidas são as carbapenemases do tipo OXA-48. As oxilinases também podem estar associadas a outros fatores betalactâmicos como por exemplo o CTX-M que confere resistência aos betalactâmicos cefotaxima e ceftriaxona. Além da OXA-48, existem outros subtipos como a OXA-146, OXA-40, OXA-58, OXA-24, OXA-23 sendo diferenciadas por meio de sua constituição estrutural (ABRANTES e NOGUEIRA, 2017; OLIVEIRA, 2016).

1.1.6. Diagnóstico

Atualmente, a identificação de *Klebsiella pneumoniae* resistente ocorre através do uso de técnicas microbiológicas de acordo com critérios estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e BrCAST (*Brazillian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), como o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), avaliando-se os halos de inibição em disco-difusão (Figura 4), ou através da dosagem de concentração inibitória mínima (MIC) dos seguintes antibióticos: penicilinas, carbapenens, cefalosporinas e monobactam (ANVISA, 2013).

Figura 4 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco-difusão.



Fonte: KASVI, 2019.

Além do teste convencional de análise dos halos (disco-difusão), métodos complementares como disco aproximação ou o uso de soluções inibitórias também podem ser utilizadas a fim de obter melhores resultados. Para isso, os testes fenotípicos são bastante úteis para triagem desses materiais (ANVISA, 2013).

Ainda que a determinação não seja tão complexa, a detecção de KPC ainda é um desafio para a maioria dos laboratórios clínicos. A suspeita se inicia a partir da resistência total ou intermediária aos antimicrobianos da classe dos carbapenens, sendo que destes, o ertapenem desempenha melhor marcador de triagem, visto que possui maior sensibilidade para detecção de carbapenemase (SCHORER, 2016).

Ainda de acordo com o mesmo autor, o método fenotípico mais utilizado para esta pesquisa era o HODGE modificado (MHT) que consiste na inativação de um carbapenem por cepas produtoras de carbapenemase, permitindo que uma cepa indicadora sensível ao carbapenem estenda o crescimento em direção a um disco contendo o mesmo antimicrobiano ao longo da faixa do inóculo da cepa testada, no entanto, com o advento das cepas NDM, o mesmo foi desaconselhado pela ANVISA devido a sua baixa sensibilidade (<50%) para a detecção e triagem desse novo mecanismo.

Sendo assim, outras metodologias foram propostas como por exemplo o uso de bloqueadores enzimáticos como o ácido fenilborônico (AFB) que possui acima de 99% de especificidade para detecção de KPC e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que funciona como quelante do íon zinco e por isso, constitui ferramenta importante para detecção de MBL em enterobactérias (ANVISA, 2013).

Ademais, já estão disponíveis no mercado testes imunocromatográficos que consistem na detecção de cepas produtoras de KPC, NDM e OXA-48-*like* em um mesmo teste, com elevada especificidade e sensibilidade, além de emitir resultados em até 15 minutos (SAGIROGLU *et al,* 2018).

Contudo, métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), permanecem sendo padrão-ouro para identificação e rastreio de genes de resistência expressos por *Klebsiella pneumoniae*. Neste método, o DNA a ser amplificado é determinado por sequências iniciadoras ou *primers*, que se ligam aos genes de interesse como *bla*KPC-1, *bla*KPC-2 e *bla*NDM-1, responsáveis pela expressão das enzimas que conferem resistência à cepa (KPC-1, KPC-2 e NDM-1) (ANDRADE, 2008).

As técnicas moleculares podem ser aplicadas para detectar associações, estratificar e refinar dados através de mensurações sensíveis e específicas, contribuindo para em atividades epidemiológicas, incluindo a vigilância de doenças, investigação de surtos, identificação de padrões de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente distintos, caracterizar interações patógeno-hospedeiro, detectar organismos não cultiváveis, e permitir melhor entendimento da patogênese das doenças em um nível molecular (AREND, 2014). A alta sensibilidade da técnica permite a detecção do patógeno na amostra original, as vezes auxiliando naquelas amostras que não conseguem ser identificadas fenotipicamente por causa da baixa carga patogénica.

Através da *Real Time* qPCR (PCR quantitativa em tempo real), pode-se realizar a quantificação do material genético alvo durante o seu processo de amplificação. Isso se deve ao uso de fluorescência, que permite a visualização da amplificação, bem como a quantificação do material pesquisado, garantindo bastante sensibilidade e excelentes resultados em menos de 2 horas. No entanto, exige mão-de-obra especializada e equipamentos sofisticados, além de insumos com custos bastante elevados (KASVI, 2019).

Desta maneira, o uso de biologia molecular é de suma importância, visto que complementa os achados microbiológicos em um curto espaço de tempo, uma vez que sua versatilidade, aliada com a precisão e sensibilidade dessa técnica faz com que tenha grande aplicabilidade no campo da microbiologia diagnóstica. Possibilitando uma terapêutica adequada para o tratamento de pacientes hospitalizados, diminuindo, por sua vez o tempo de internamento dos mesmos (SCHORNER, 2016).

1.2. Justificativa

Atualmente, a resistência bacteriana é um problema de saúde pública global e a disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos é uma preocupação recorrente. Várias bactérias apresentam predisposição ao desenvolvimento de mecanismos de resistência enzimáticos quando expostas inadequadamente à agente antimicrobianos, sendo estes um grande empecilho no momento de escolher o antibiótico mais adequado para o tratamento do paciente (CUNHA, 2014).

O HMCC é um complexo hospitalar que atende a tríplice fronteira (Brasil, Paraguai e Argentina) e por isso torna-se um alvo bastante importante para a realização desse tipo de pesquisa. O crescente fluxo e mobilidade populacional nesta região possibilitam realizar uma análise ampla e abrangente na identificação de cepas resistentes.

Diante desse contexto, a detecção fenotípica da produção de MBL e KPC permitirá o uso de práticas clínicas mais rápidas e seguras na escolha e indicação do uso de antibióticos. Auxiliando no diagnóstico precoce, diminuindo por sua vez, o tempo de internação, o uso empírico e indiscriminado de antimicrobianos, evitando que a cepa seja disseminada para outros pacientes.

O estudo permitirá auxiliar no esclarecimento acerca destes mecanismos de resistência, contribuindo dessa forma para o aumento do banco de informações para pesquisas avançadas nesta área. Ademais, os dados gerados nesta pesquisa podem ser utilizados na implantação de medidas de prevenção e controle da propagação de cepas dotadas dessas enzimas de resistência em ambientes hospitalares e na comunidade, com vistas a reduzir a morbidade e a mortalidade.

1.3. Pergunta Norteadora e Hipótese

A resistência microbiana em amostras clínicas de pacientes hospitalizados está relacionada aos mecanismos de resistência com variantes dos genes KPC e NDM.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o fenótipo e o genótipo de metalobetalactamase do tipo NDM e carbapenemase do tipo KPC em populações de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras clínicas de pacientes internados em um hospital de emergência em Foz do Iguaçu, PR, no período de julho de 2018 a julho de 2019.

2.2 Específicos

Analisar 300 isolados de *Klebsiella pneumoniae* com perfil de resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactam;

Realizar a identificação fenotípica dessas amostras de acordo com a Nota técnica 01/2013 da Anvisa;

Investigar a presença de variantes dos genes *bla*KPC e *bla*NDM através de Biologia Molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi autorizado pela instituição a qual serão coletados os dados - Hospital Ministro Costa Cavalcanti Fundação de Saúde Itaiguapy, através de um termo de consentimento para a disponibilização dos isolados. Tendo sido aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/ Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/ Plataforma Brasil, Parecer número: 2.858.261 (Anexo I).

Foram utilizadas amostras de sangue, urina, fezes, *swabs* retais e secreções destinadas à realização dos exames laboratoriais de rotina de pacientes internados que deram entrada no laboratório de análises clínicas do Hospital Ministro Costa Cavalcanti (HMCC) no período de julho de 2018 a julho de 2019. Foram selecionadas uma amostra por paciente, a fim de evitar vários clones de um mesmo indivíduo e ampliar o escopo de pesquisa.

3.1. Identificação microbiana

A identificação foi realizada por meio de identificação bioquímica e concentração inibitória mínima estimada em automação através do equipamento Vitek 2 (BioMerieux®), onde foram selecionados 200 isolados de *Klebsiella pneumoniae* que apresentaram perfil de resistência para os antibióticos da classe das penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactâmicos. Para a identificação foram utilizados os cartões GN (BioMerieux®) e para o antibiograma os cartões 238 (BioMerieux®) para amostras urinárias e cartões 239 (BioMerieux®) nas demais amostras.

Os parâmetros utilizados para seleção de triagem de resistência das cepas analisadas foram MIC ≥ 2µg/ mL para meropenem/ imipinem e MIC ≥ 1 µg/ mL para ertapenem.

3.2. Identificação fenotípica

A identificação fenotípica desses isolados foi realizada através da metodologia de disco aproximação conforme Nota técnica Nº 01/2013 da Anvisa (Anexo II).

Para os testes de metalobetalactamases (MBL) foram utilizados discos de Imipinem e Meropenem do mesmo lote, que foram depositados na face interna de uma placa de Petri estéril e em seguida foram embebecidos com 10 µl de solução de EDTA a 0,1 M. Já para KPC foram utilizados discos de Meropenem e Imipinem do mesmo lote, que foram depositados na face interna de outra placa de Petri estéril e então, depositados 10 µl Ácido FenilBorônico (AFB). Os discos contendo as soluções de EDTA e AFB foram deixados em repouso por 20 minutos até que toda umidade fosse evaporada (ANVISA, 2013; SHENOY, JYOTHI e RAVIKUMA, 2014).

A seguir, foi realizada uma suspensão bacteriana de cada cepa a ser testada em solução salina estéril 0,9% com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Foi utilizado um turbidimetro (BioMerieux®) como auxílio para esta finalidade, em seguida a suspensão foi semeada em uma placa de Ágar Mueller-Hinton em quatro campos sobrepostos (Figura 5). Após completa evaporação da umidade, os discos de Meropenem e Imipinem contendo as soluções de EDTA e AFB, além dos discos sem nenhuma solução adicionada foram aplicados sobre a placa semeada e incubados a 36ºC por 24 horas.

Figura 5 – Teste fenotípico realizado em placa de Mueller Hinton

Fonte: a autora, 2020.

Os isolados que apresentaram diferença ≥ 5 mm entre o diâmetro do halo de inibição com discos de carbapenêmicos (imipinem ou meropenem) contendo EDTA e diâmetro de halo de inibição dos discos de carbapenêmicos sem EDTA foram considerados potenciais produtores de metalobetalactamases. Enquanto os isolados que apresentaram diferença ≥ 5 mm entre o diâmetro do halo de inibição com discos de carbapenêmicos (imipinem ou meropenem) contendo AFB e diâmetro de halo de inibição dos discos de carbapenêmicos sem AFB foram considerados potenciais produtores de KPC.

Após a avaliação fenotípica os isolados foram armazenados em BHI + 50% de glicerol a uma temperatura de -80°C para posterior avaliação genotípica (WEIB *et al*, 2017).

3.3. Identificação molecular

O estudo molecular foi realizado no laboratório de biologia molecular do Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira. Para a realização da PCR em tempo real, o material genético bacteriano (*K. pneumoniae*) foi extraído de acordo com protocolo original do CDC (CDC, 2011).

A metodologia de amplificação escolhida foi a PCR em tempo real com a química SYBR Green modificando o protocolo do CDC; para isto, foram utilizados *primers* específicos (tabela 3) para a amplificação dos genes *bla*KPC-1 e *bla*NDM-1 que correspondem aos genes de resistência confirmatório para KPC e NDM (FLORES *et al*, 2016). Para a identificação da espécie bacteriana estudada e como controle endógeno, foram utilizados *primers* (tabela 3) específicos para a região 16S rDNA que constitui uma região conservadora da espécie. As sequencias dos *primers* foram verificadas através do software *BLASTnt (National Library of Medicine*) e os tamanhos dos amplicons, temperatura de anelamento, probabilidade de dímeros de *primers* foram determinados utilizando o software primers-BLAST (*National Library of Medicine*).

Os *primers* foram verificados quanto ao tamanho, temperatura de anelamento e porcentagem de GC (guanina/ citosina).

Tabela 3 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação dos genes KPC e NDM em amostras de *K. pneumoniae.*

	Oligonucleotídeos	***Sequência nucleotídica, 5´-3´***
16 S	16S rRNA-F	TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A
	16S rRNA-R	TGC GGG ACT TAA CCC AAC A
KPC	KPC-F	GGC CGC CGT GCA ATA C
	KPC-R	GCC GCC CAA CTC CTT CA
NDM	NDM-F	GAC CGC CCA GAT CCT CAA
	NDM-R	CGC GAC CGG CAG GTT

Fonte: CDC, 2011.

Os *primers* (IDT Síntese biotecnologia®) foram reconstituídos com água ultrapura conforme especificação do fabricante para 100 µM e em seguida, foi realizada a padronização das concentrações em concentrações de 0,7 µM, 0,5 µM, 0,4 µM e 0,25 µM.

A PCR em Tempo Real pelo sistema SYBR Green foi realizada em um volume de reação de 20 µL contendo 10 µL QuantiNova kit SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®); 0, 5 µL de cada *primer*; 6 µL de água ultrapura, 2 µL de ROX ReferenceDye e 1 µL de DNA.

3.3.1. Extração do DNA

As colônias bacterianas foram ressuspendidas em 25 µL de água ultrapura em microtubos estéreis livres de DNAse e RNAases, em seguida foi adicionado 25 µL de NaOH 0,1 M e homogeneizado por inversão. O tubo foi acoplado em termo bloco à 99ºC por 10 minutos e resfriado em gelo por 5 minutos, após isso, foi neutralizado com 18 µL de Tris-HCl 0,5 M com pH 8,0. Foi adicionado 400 µL de água ultrapura gelada, homogeneizado por inversão e centrifugado por 3 minutos. Por fim, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril.

Ao final da última etapa de extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop TM®) e armazenado a –80 ° C.

3.3.2. PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento *QuantStudio 7 Flex – Real time PCR System* (Thermofisher®) utilizando o kit *QuantiNova SYBR green PCR* (Qiagen®).

As condições de termociclagem foram: 2 minutos a 50ºC, seguidos de 10 minutos a 95ºC e 40 ciclos de 15 segundos a 95ºC e 1 minuto a 60ºC. Ademais, todos os *primers* testados foram submetidos à análise da curva de desnaturação (*melting*), no intuito de determinar a temperatura de desnaturação dos produtos de PCR para cada gene e identificar dímeros de *primers*.

O ciclo de dissociação dos produtos para a curva de desnaturação (*melting*) foi: 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C, e uma etapa para realização da curva de desnaturação que variou de 68°C até 95°C, com aumento gradual na temperatura de 0,5°C/s. Através disso, foi determinada a temperatura de desnaturação (T_m) dos produtos de PCR dos genes pesquisados. Além disso, foi avaliado o Ct em que houve a detecção da positividade.

3.3.3. Eficiência e especificidade da PCR em tempo real

Para determinar a eficiência dos *primers* foi realizada uma curva padrão utilizando diluições de uma amostra positiva adquirida comercialmente oriunda de um banco de culturas de cepas padrões (*ATCC* BAA 1705 e BAA 2146), posteriormente foi calculada a eficiência utilizando o software *qPCR efficiency calculator* (www.thermofisher.com). As curvas foram avaliadas por um ensaio com as amostras em duplicata. A regressão linear foi construída com o mínimo de 5 pontos.

Foram utilizadas cepas controles adquiridas comercialmente. Como controle positivo, utilizou-se as cepas *de K. pneumoniae ATCC* BAA 1705 (KPC), *K. pneumoniae* BAA 2146 (NDM) e como controle negativo *K. pneumoniae* ATCC 700603.

3.4. Análise estatística dos dados

Para a análise descritiva, assim como a tabulação e armazenamento dos dados, criação de tabelas e gráficos foi utilizado o programa Microsoft Excel 2010. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Prism 8.0 (GraphPad software®).

Para a análise de relevância entre as metodologias fenotípica e molecular dos mecanismos testados foi realizado o Teste Exato de Fisher com correção de Yates para dados não paramétricos.

A relação de materiais biológicos analisados e a positividade dessas amostras foi avaliada através do teste de variância *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos.

O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo nas análises.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação fenotípica

Um total de 200 amostras (Tabela 4) foram selecionadas e analisadas no período de julho de 2018 a julho de 2019. Destas, 165 (82,5%) foram inibidas pelo AFB indicando positividade para KPC, 2 (1%) foram inibidas pelo EDTA indicando positividade para MBL, 16 (8%) foram inibidas para AFB e EDTA concomitantemente e, 17 (8,5%) não apresentaram positividade tanto para AFB quanto EDTA (Gráfico 1).

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes foram oriundos de amostras de swab de vigilância epidemiológica (retal), seguidos de amostras urinárias, respiratórias e de corrente sanguínea, incluindo dispositivos invasivos associados (cateter). Destas, mais da metade, ou seja, 110 (55%) isolados eram provenientes de pacientes do sexo masculino, enquanto 90 (45%) foram isolados de pacientes do sexo feminino.

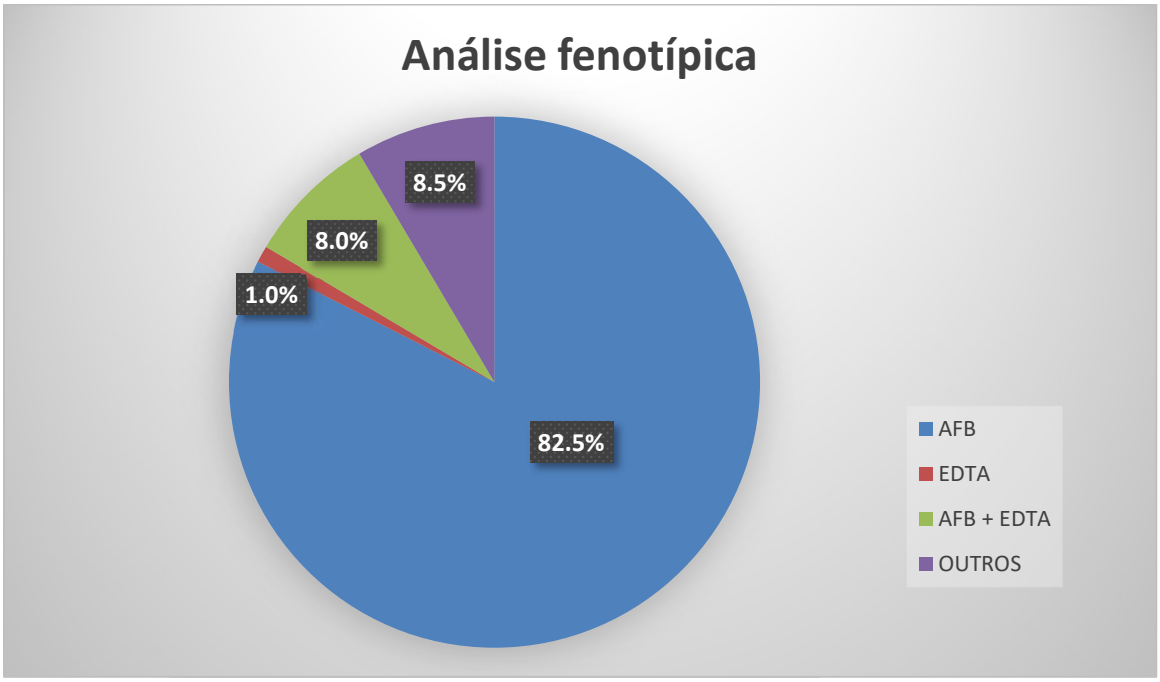
Tabela 4: Amostras clínicas fonte dos isolados

Amostra	Quantidade	%
Swab de vigilância (retal)	105	52,5%
Urina	40	20%
Secreção traqueal	31	15,5%
Hemocultura	11	5,5%
Ponta de Cateter	10	5%
Abscesso	2	1%
Escarro	1	0,5%
Total	200	100%

Fonte: a autora, 2020.

Foram selecionados 4 (2%) isolados da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e Pediátrica, 60 (30%) isolados da Unidade de Terapia Intensiva Geral, 46 (23%) isolados da Unidade de Terapia Intensiva Coronariana e 90 (45%) isolados dos blocos de internação (Gráfico 2). Destes, 193 (96,5%) eram de origem brasileira e 7 (3,5%) de nacionalidade paraguaia. Ademais, a maior parte dos atendimentos 110 (55%) eram SUS e apenas 90 (45%) possuíam algum convênio médico.

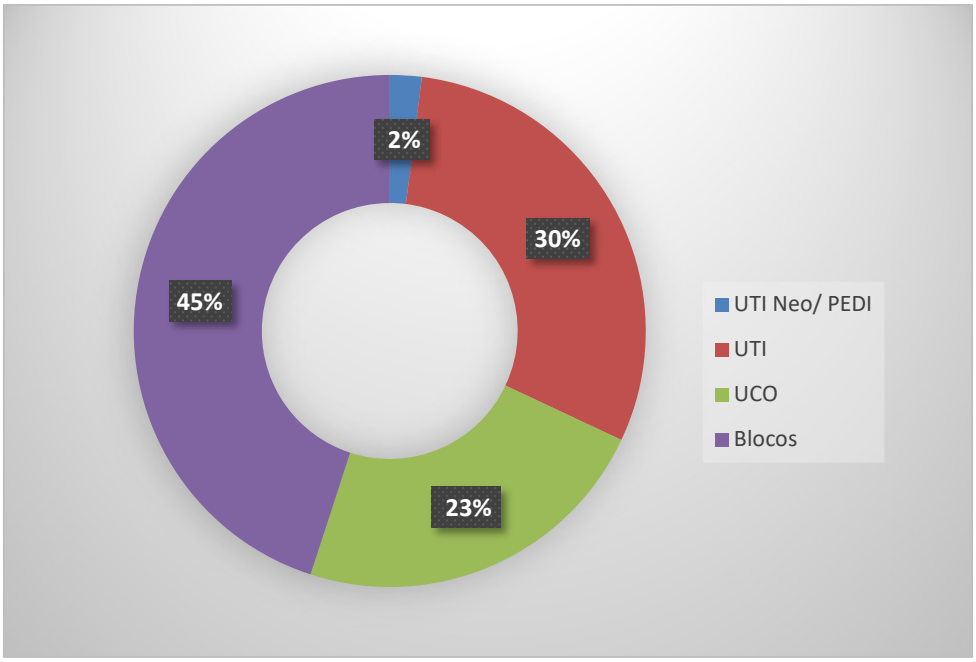
Gráfico 1: Resultado identificação fenotípica.



Legenda: AFB – Ácido Fenilborônico; EDTA - Ácido Etileno diamino-acético; OUTROS – negativo para as carbapenemases pesquisadas.

Fonte: a autora, 2020.

Gráfico 2: Incidência de isolados por setor



Legenda: UTI neo/ PEDI – Unidade de terapia intensiva neonatal e pediátrica; UTI – Unidade de terapia intensiva geral; UCO- Unidade de terapia intensiva coronariana; BLOCOS – Blocos de internação hospitalar.

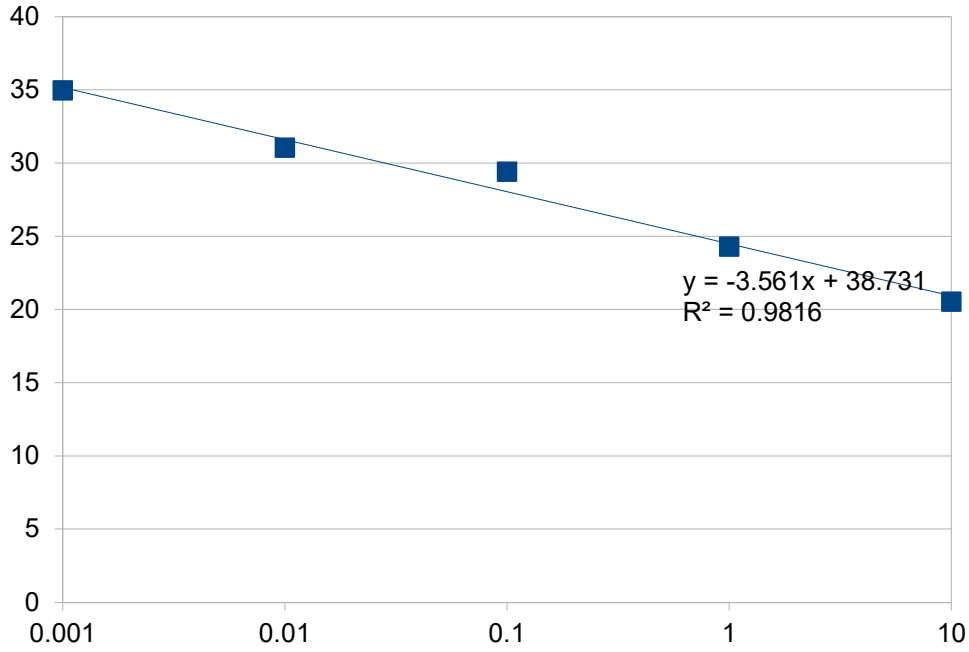
Fonte: a autora, 2020.

4.2 Identificação molecular

4.2.1 Padronização da PCR quantitativa em tempo real

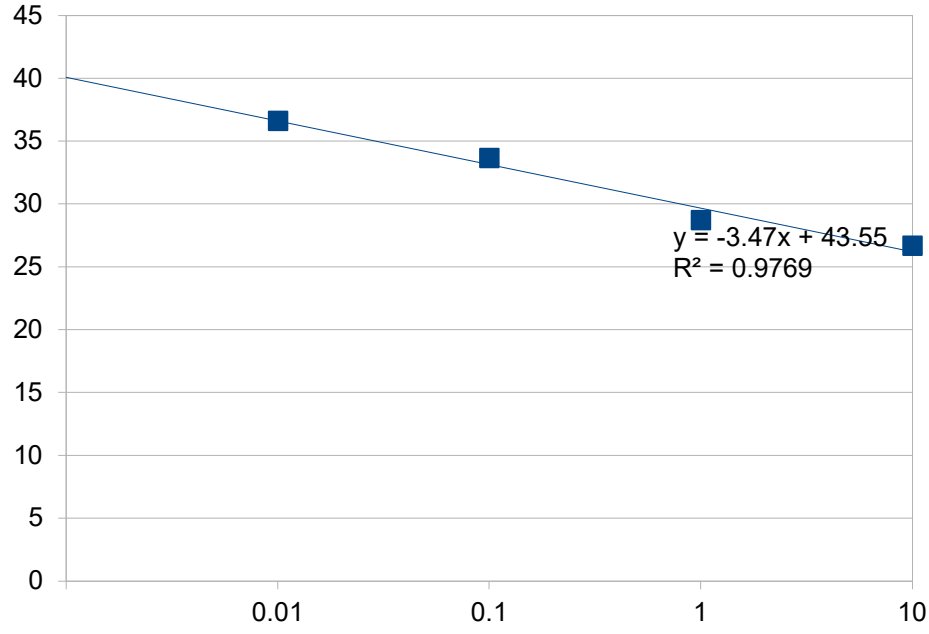
A análise da amplificação do 16 S (Figura 6) apresentou 90,91% de eficiência, enquanto KPC (Figura 7) apresentou 94,17% e NDM (Figura 8) 89,95%.

Figura 6 - Análise de eficiência de 16S.



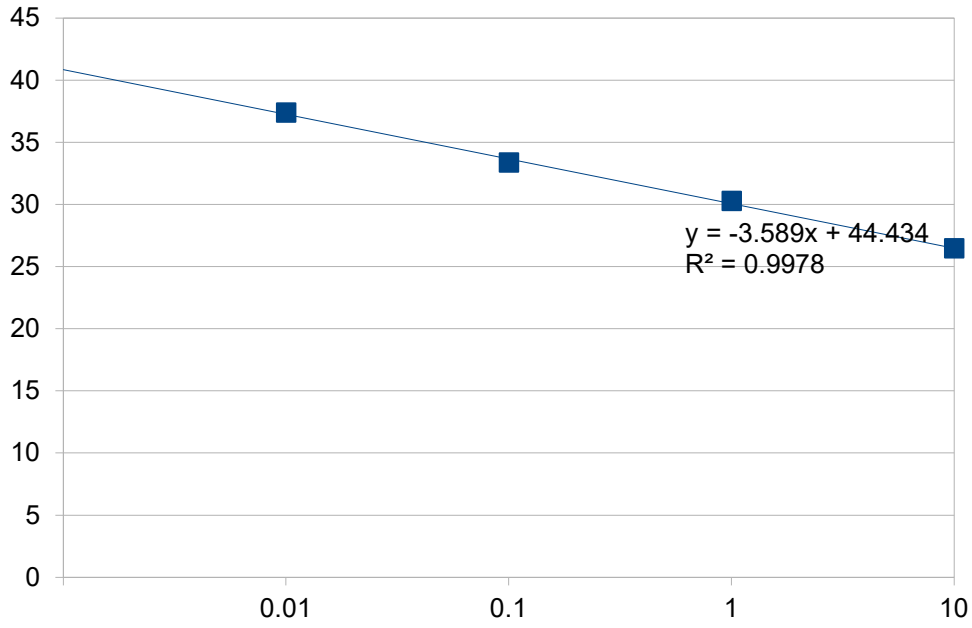
Fonte: a autora, 2020.

Figura 7 - Análise de eficiência de KPC.



Fonte: a autora, 2020.

Figura 8 - Análise de eficiência de NDM.

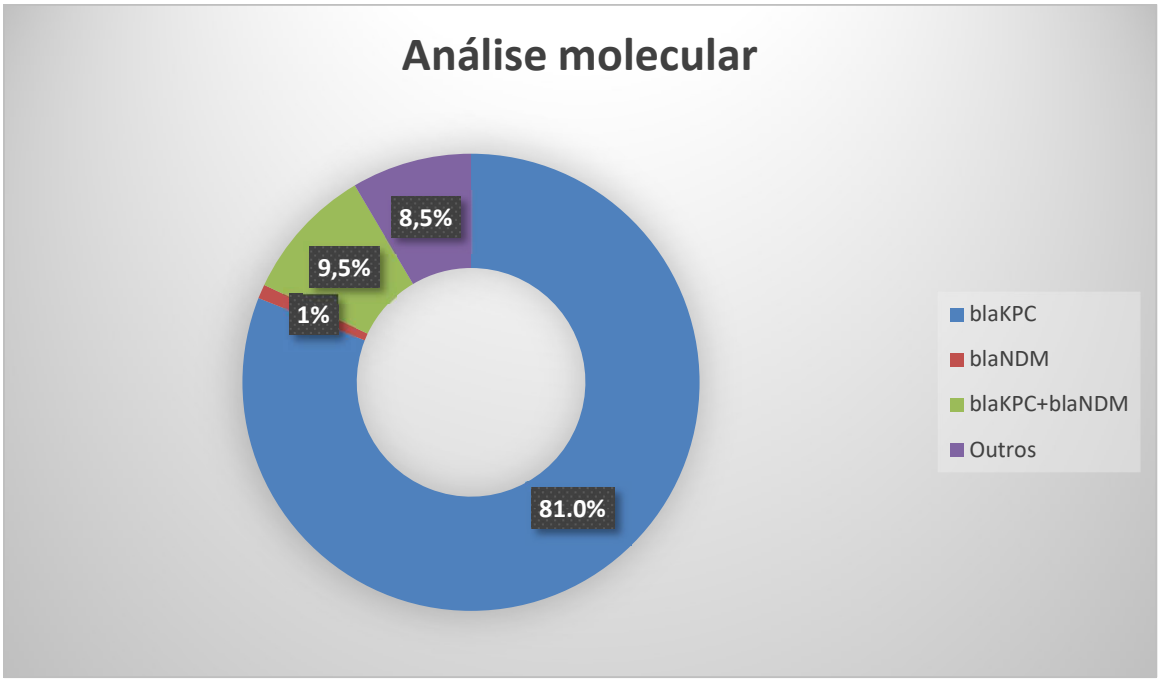


Fonte: a autora, 2020.

4.2.2 Resultados moleculares

Na pesquisa molecular 162 amostras (81%) apresentaram positividade para o gene *bla*KPC, 2 (1%) foram positivas para o gene *bla*NDM, 19 (9,5%) apontaram presença dos genes *bla*KPC e *bla*NDM na mesma amostra e 17 (8,5%) não apresentaram positividade para os genes pesquisados (Gráfico 3).

Gráfico 3: Resultado identificação molecular.



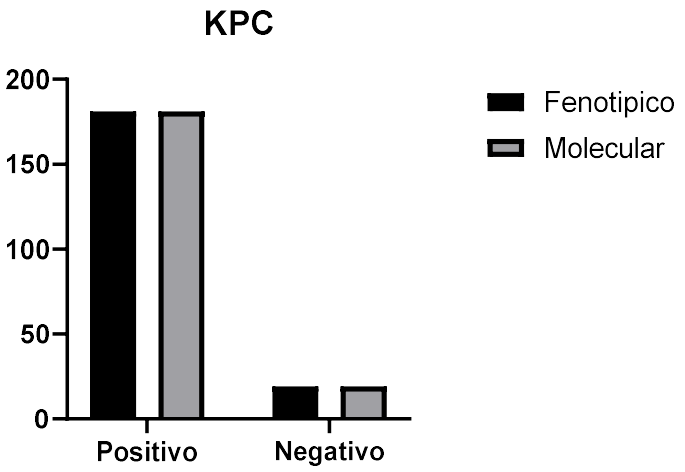
Legenda: *bla*KPC – carbapenemase do tipo KPC; *bla*NDM – Nova Delhi metalocarbapenemase; Outros - negativo para as carbapenemases pesquisadas.

Fonte: a autora, 2020.

4.3 Comparação entre teste fenotípico e molecular

Em relação à positividade para KPC (Gráfico 4), ambos os testes realizados demonstraram similaridade nos resultados, onde 181 cepas foram positivas para esse marcador de resistência, apresentando o valor de P superior a 0,9999 (99,99%).

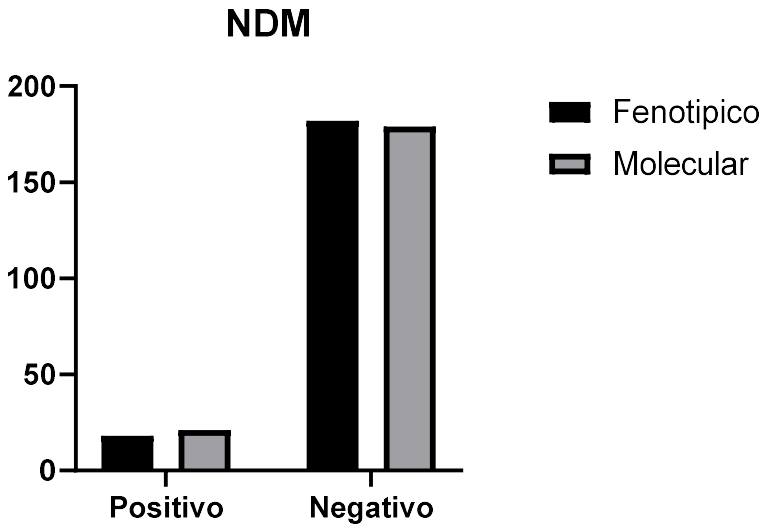
Gráfico 4: Relação de amostras positivas e negativas para KPC.



Fonte: a autora, 2020.

Para a análise do marcador de resistência de NDM (Gráfico 5), o teste fenotípico identificou 18 cepas, enquanto o molecular identificou 21 cepas, apresentando valor de P de 0,7364 (73,64%).

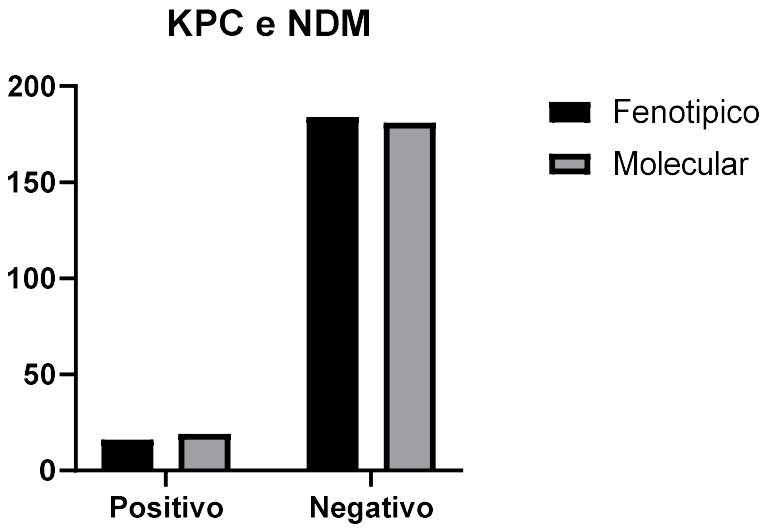
Gráfico 5: Relação de amostras positivas e negativas para NDM.



Fonte: a autora, 2020.

E na identificação de cepas concomitantemente positivas para KPC e NDM (Gráfico 6), o teste fenotípico apresentou positividade para 16 cepas enquanto o molecular para 19 cepas, apresentando o valor de P de 0,7239 (72,39%).

Gráfico 6: Relação de amostras positivas e negativas para KPC e NDM.



Fonte: a autora, 2020.

Estratificando as amostras positivas por locais de coleta e consequentemente internação, notou-se que houve um aumento significativo de positividade dos *swabs* retais oriundos dos blocos de internação, superando as unidades de terapia intensiva quando analisadas em isolado (UCO e UTI), além disso esse material foi o único onde se pode detectar positividade nos setores pediátricos (Tabela 5).

Em relação às amostras urinárias, novamente as maiores taxas de positividade foram detectadas nos setores de internação, contabilizando um índice de positividade de 92,5% (Tabela 5), onde o mecanismo de KPC foi o único detectado. Um perfil semelhante de resistência foi observado nas amostras da UCO e UTI, que tiveram 100% de positividade para o mesmo mecanismo de resistência.

A positividade das amostras de aspirado traqueal foram mais elevadas nas unidades de terapia intensiva (UCO e UTI) em relação aos demais setores, devido ao número de pacientes que fazem o uso de dispositivos como a ventilação mecânica ser mais incidente (Tabela 5).

As amostras de hemocultura e ponta de cateter também foram mais incidentes nos blocos de internação e apresentaram perfis de resistência semelhantes. Bem como o perfil apresentado nas amostras de Secreção de abscesso e escarro (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados dos testes fenotípico e molecular de acordo com o material e setor de coleta das amostras.

					TESTE FENOTÍPICO NOTA TÉCNICA ANVISA					TESTE MOLECULAR - Real time *SyBr green*				
Amostras	%	Setores	n	Índice de Positividade	AFB	EDTA	AFB/ EDTA	NENHUM	Total	*bla*KPC	*bla*NDM	*bla*KPC/*bla*NDM	NENHUM	Total
Swab retal	52,5%	Blocos	36	34,3%	77,8%	2,8%	8,3%	11,1%	100%	72,2%	2,8%	13,9%	11,1%	100%
		Pediatria	4	3,8%	75%	25%	-	-	100%	75%	25%	-	-	100%
		UCO	31	29,5%	83,9%	-	6,4%	9,7%	100%	83,9%	-	6,4%	9,7%	100%
		UTI	34	32,4%	76,5%	-	14,7%	8,8%	100%	76,5%	-	14,7%	8,8%	100%
TOTAL			105	100%										
Urina	20%	Blocos	37	92,5%	83,8%	-	-	16,2%	100%	83,8%	-	-	16,2%	100%
		Pediatria		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UCO	2	5%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		UTI	1	2,5%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
TOTAL			40	100%										
Secreção traqueal	15,5%	Blocos	6	19,5%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		Pediatria		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UCO	9	29%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		UTI	16	51,5%	68,7%	-	25%	6,3%	100%	68,7%	-	25%	6,3%	100%
TOTAL			31	100%										
Hemocultura	5,5%	Blocos	7	63,6%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		Pediatria		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UCO	1	9,1%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		UTI	3	27,3%	66,7%	-	33,3%	-	100%	66,7%	-	33,3%	-	100%
TOTAL			11	100%										
Ponta de cateter	5%	Blocos	4	40%	75%	-	25%	-	100%	75%	-	25%	-	100%
		Pediatria		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UCO	3	30%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		UTI	3	30%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
TOTAL			10	100%										
Secreção de abscesso	1%	Blocos	1	50%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		Pediatria		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UCO	1	50%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
		UTI		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL			2	100%										
Escarro	0,5%	Blocos		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Pediatria		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UCO		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		UTI	1	100%	100%	-	-	-	100%	100%	-	-	-	100%
TOTAL			1	100%										
TOTAL GERAL	100%		200											

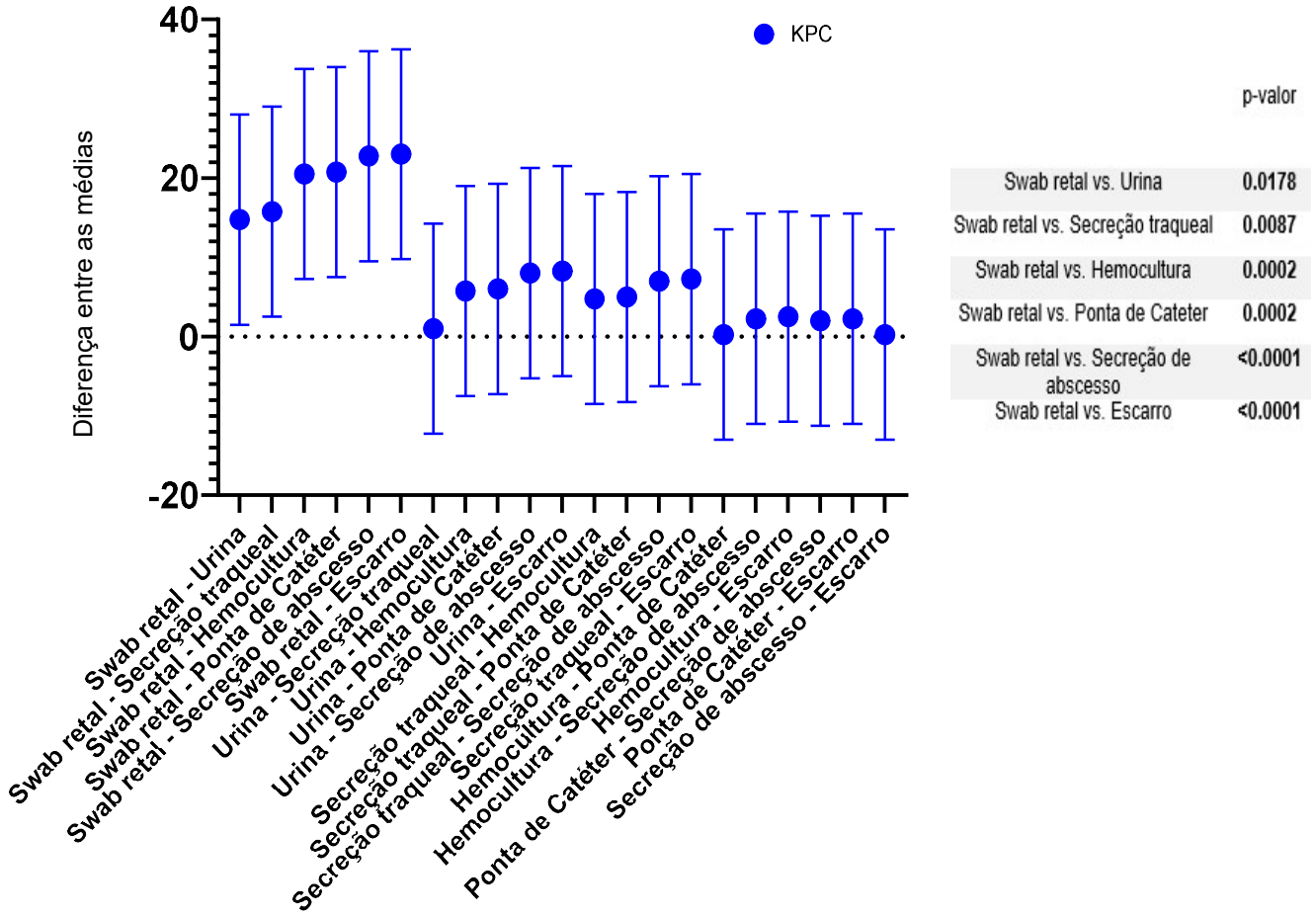
Tabela apresentando o índice de positividade das amostras por setor de coleta e porcentagem de positividade dos testes fenotípico e molecular de cada uma delas.
UCO: Unidade de terapia intensiva coronariana; UTI: Unidade de terapia intensiva Geral; AFB: Ácido fenilborônico; EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético;

Fonte: a autora, 2020.

Cruzando as amostras com os mecanismos de resistência apresentados, após análise estatística com o teste de variância de *Kruskal-wallis* foi encontrada diferença estatística significativa apenas nas amostras de *swab* retal em comparação com os demais materiais biológicos analisados e apenas para o mecanismo de resistência KPC, ou seja, a taxa de positividade das amostras de *swab* retal positivas para KPC neste estudo apresentaram médias indicativas de haja pelo menos uma diferença significativa entre os grupos analisados, sugerindo que este material possui relevância significativa em relação ao fator de resistência KPC, conforme descritos no gráfico 7.

Os demais materiais analisados não apresentaram significância estatística (Ilustrados no Gráfico 8).

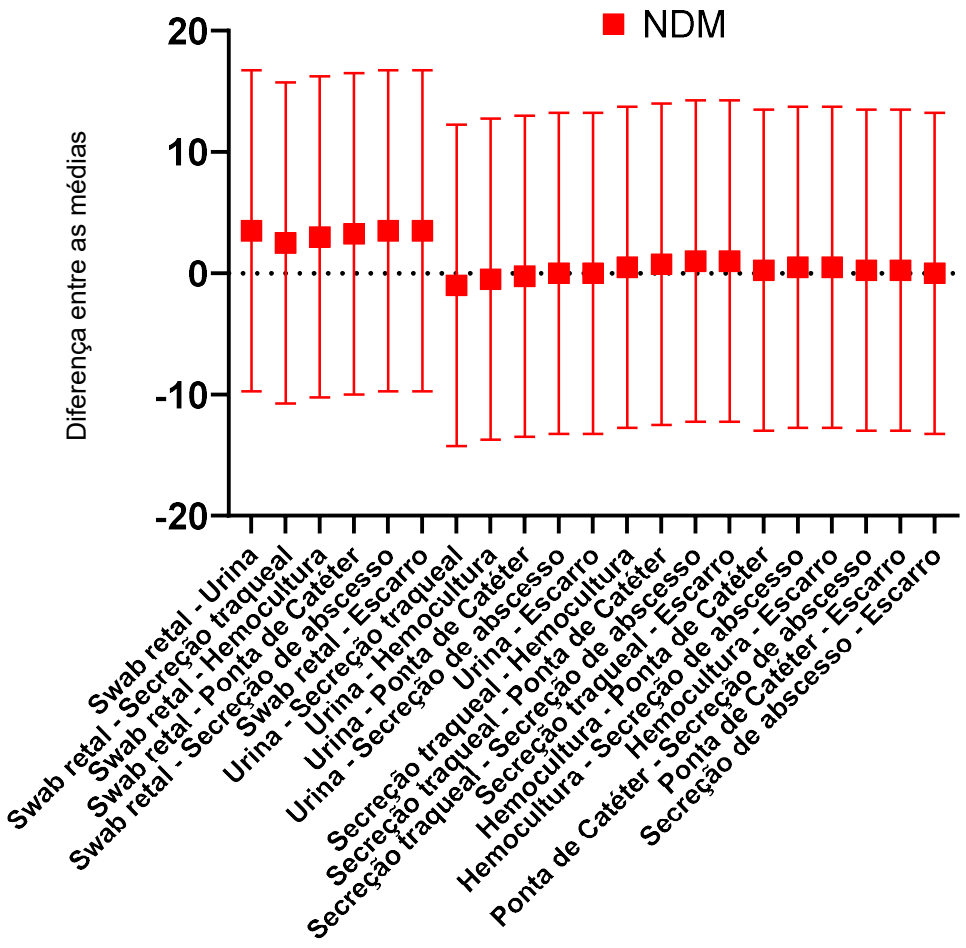
Gráfico 7: Relação de positividade para o mecanismo de resistência KPC e material biológico analisado.



	p-valor
Swab retal vs. Urina	0.0178
Swab retal vs. Secreção traqueal	0.0087
Swab retal vs. Hemocultura	0.0002
Swab retal vs. Ponta de Cateter	0.0002
Swab retal vs. Secreção de abscesso	<0.0001
Swab retal vs. Escarro	<0.0001

Fonte: a autora, 2020.

Gráfico 8: Relação de positividade para o mecanismo de resistência NDM e material biológico analisado.



Fonte: a autora, 2020.

5. DISCUSSÃO

A resistência microbiana das enterobactérias aos carbapenens, em especial a *K. pneumoniae*, tem se tornado um grande desafio à saúde pública mundial e inclusive no Brasil. Em razão da limitação no uso de antimicrobianos em cepas resistentes à esses antimicrobianos, a mortalidade em pacientes infectados por essas cepas é maior que naqueles infectados por enterobactérias sensíveis aos carbapenens (MENG *et al*, 2019).

Ainda segundo o mesmo autor, um estudo realizado na cidade de Nova Iorque (EEUU) revelou que pacientes infectados com cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenens apresentaram 48% de mortalidade hospitalar, além de maior tempo de internação e elevado custo financeiro quando comparados com pacientes infectados com cepas da mesma bactéria, porém sensíveis aos carbapenens.

Esses mecanismos de resistência não é novidade e está se distribuindo mundialmente, embora cepas como a KPC tenham sido descritas em 2001, somente em 2005 é que se deu a sua primeira aparição no estado da Carolina do Norte - Estados Unidos e em outubro de 2009 foi registrado o primeiro caso no estado do Paraná, Brasil (AREND, 2014). Já a cepa de NDM foi registrada primeiramente em 2008, na Índia e em 2013 teve seu primeiro surto na França e primeiro caso descrito no Brasil (SILVA, 2013; PICOLOTTO, 2018).

O controle da disseminação dessas cepas resistentes é bastante difícil, uma vez que os genes codificadores dessas enzimas situam-se em elementos móveis, os plasmídeos. Além disso, estudos revelaram que a eficiente disseminação de KPC está associada à distribuição de clones de alto risco distribuídos mundialmente que apresentam melhores condições de adaptação (SCHORNER, 2016).

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, ambas as análises fenotípica e molecular mostraram resultados muito próximos em relação à frequência de KPC (82,5 e 81%), NDM (1%) e até mesmo aquelas que não apresentaram positividade para nenhuma das carbapenemases avaliadas no trabalho. Observamos uma leve diferença na identificação de cepas que continham os dois mecanismos (KPC e NDM) concomitantemente, podendo ser evidenciada com melhor performance através da metodologia molecular, pois a investigação fenotípica mostrou 8% de positividade enquanto a metodologia molecular mostrou 9,5%.

No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente relevantes, pois apresentaram valores de P acima de 0,05 (KPC: >0,9999; NDM: 0,7364; KPC/ NDM: 0,7239). Um número maior de amostras avaliadas poderia aumentar o poder do teste estatístico e permitir determinar as diferencias.

Em se tratando do protocolo adotado para a amplificação das amostras, os *primers* apresentaram elevada eficiência para todos os genes pesquisados e embora a indicação para ensaios diagnósticos seja a utilização da química de Taqman®, o protocolo adotado nesta pesquisa (SyBRgreen®) demonstrou resultados satisfatórios. Porém, vale ressaltar que a padronização da técnica é de suma importância nessa escolha, pois SyBR green® é ferramenta que pode sofrer influência de sequencias de dupla fita que não a pesquisadas (como dímeros de *primers*) que mascaram os resultados, podendo revelar resultados falsamente positivos. Em contrapartida, o sistema de detecção Taqman® possui sondas específicas que reduzem essa possibilidade (ROSSETI, SILVA e RODRIGUES, 2006).

Levando em consideração que ambas as metodologias não apresentaram diferenças estatísticas significativas e o valor gasto por técnica (Fenotípico: R$ 61,77 e Molecular: R$ 103,72), pode-se dizer que a técnica fenotípica pode ser tranquilamente empregada na rotina diagnóstica, uma vez que apresentou bom desempenho e preço mais acessível, porém com tempo de liberação do resultado mais longo (24 horas). Em compensação, a metodologia molecular, embora mais cara apresenta tempo menor de liberação do resultado (até 3 horas).

Neste estudo foi evidenciado um maior número de cepas KPC em relação à NDM, apresentando uma prevalência similar com estudos realizados na China por Hou *et al* (2015), que apresentou 97,3% de prevalência das cepas KPC.

Um estudo realizado por Castanheira *et al* (2019) utilizando 178.825 cepas de enterobactérias de diversos centros de atenção à saúde em 42 países da América do Norte, América Latina, Europa e Ásia, demonstrou significativa prevalência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos na América Latina em relação às demais regiões estudadas.

Logan e Weinstein (2017) também relataram KPC como carbapenemase endêmica na América Latina, onde o Brasil juntamente com a Colômbia e a Argentina demonstraram elevados índices dessa resistência em cepas de *K. pneumoniae.*

Resultados similares também foram encontrados em Porto Alegre através do estudo de Silva *et al* (2017), que revelou 56,4% de *K. pneumoniae* com inibição de AFB

sugerindo KPC, seguidos de 3,4% de inibição de EDTA e 32,6% das cepas não apresentou inibição pra nenhum dos substratos pesquisados, sugerindo outro tipo de mecanismo envolvido ou deficiência de porinas.

Ainda no mesmo estudo, foi evidenciado maior incidência de resistência aos carbapenêmicos em amostras de *swab* retal (43,4%), corroborando com os dados evidenciados em nosso trabalho.

No entanto, um estudo realizado no Sergipe por Vivas *et al* (2020), relatou uma sobretaxa de isolados de NDM (50,3%) comparado com KPC (5,4%) e apenas um isolado (1,2%) mostrando positividade para ambos os genes. Embora não se saiba a origem do material biológico dessas amostras, sabe-se que as cepas testadas eram de *K. pneumoniae.*

A região oeste do Estado do Paraná concentra um contingente de mais de um milhão e cem mil habitantes. E Foz do Iguaçu é um dos municípios que concentra mais de 100.000 habitantes. Com o início da construção da Usina Hidrelétrica (década de 70) de Itaipu houve uma explosão demográfica com a vinda de trabalhadores de todas as partes do Brasil (PMFI, 2020).

Atualmente, a cidade apresenta 256.081 habitantes e sua localização entre a Tríplice Fronteira (Brasil – Paraguai e Argentina) e a presença de atrativos turísticos como o Parque Nacional do Iguaçu, permite uma mobilidade populacional elevada não apenas de brasileiros, mas também turistas argentinos, paraguaios, norte-americanos, franceses, espanhóis, alemães, ingleses, peruanos, chineses e italianos (AEN PR, 2020).

Foz do Iguaçu está localizada na região oeste do Paraná e, embora esteja situada entre as fronteiras (Paraguai e Argentina), os dados obtidos neste trabalho não foram diferentes da epidemiologia de outras cidades do Paraná, segundo dados da SESA (2018), onde o número de cepas de *K. pneumoniae* para KPC foi de 30,7% e NDM de 1,55%. Em relação ao local da infecção, as infecções urinárias registradas nesse período para o mesmo microrganismo foram 31,42% para o KPC e 2,87% para o NDM (SESA, 2018).

Neste trabalho não sequenciamos as cepas testadas para avaliação de clonalidade das cepas, sendo esta uma sugestão que permitiria verificar se há circulação de cepas atípicas na região ou clones de uma cepa padrão. Um estudo realizado em Curitiba por Arend *et al* (2015) avaliou a clonalidade de 129 amostras de *K. pneumoniae* e encontrou maior incidência de cepas de KPC em *swabs* retais (30,5%), seguidas de hemocultura (21,1%), urina (11,7%) e aspirado traqueal (10,9%). Destes, mais da metade

(84%) provinha de 2 clones predominantes, sugerindo a possibilidade de contaminação cruzada.

Verificamos também que a maior incidência de cepas positivas de *swab* retal, urina, hemocultura e ponta de cateter foram provenientes dos blocos de internação hospitalar, isto porque o número de pacientes internados nesses locais supera as internações nas UTIs, sendo assim, a amostragem analisada é muito maior.

Entretanto, as amostras de secreção traqueal foram mais incidentes nas unidades de terapia intensiva adulta, pois nos blocos o número de pacientes em ventilação mecânica é menor que nas UTIs.

Foram analisados 200 isolados de *Klebsiella pneumoniae* com perfil de resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactam. A intenção preliminar do projeto era realizar a análise de 300 isolados, porém não foi possível atingir esse objetivo no período determinado para a análise. Entretanto, isso não prejudicou a eficácia da pesquisa, pois o número analisado ainda supera o valor amostral necessário para este projeto.

Embora não haja registro de outros estudos sobre resistência bacteriana realizados nesta cidade, de acordo com este trabalho, o status atual de Foz do Iguaçu é endêmico para o KPC, e este é um motivo importante para que seja dada maior atenção ao diagnóstico precoce de cepas que apresentam resistência, pois o manejo inadequado permite a disseminação de plasmídeos contendo informações de resistência a outros microrganismos, tornando a terapia e o resultado favoráveis ao paciente.

Além disso, ações de vigilância e boas práticas em gestão hospitalar devem ser incentivadas e aprimoradas, bem como a implementação de ações de melhoria para controlar a disseminação de microrganismos multirresistentes no âmbito hospitalar.

6. CONCLUSÕES

Foi realizada a identificação fenotípica e molecular de 200 cepas de *K. pneumoniae.*

A análise fenotípica revelou 165 (82,5%) cepas de KPC, 2 (1%) cepas de MBL, 16 (8%) cepas de KPC e MBL e 17 (8,5%) cepas negativas para as resistências pesquisadas.

A pesquisa dos genes *bla*KPC e *bla*NDM identificou 162 (81%) cepas apresentando o gene *bla*KPC, 2 (1%) cepas apresentando o gene *bla*NDM, 19 (9,5%) cepas apresentando ambos os genes e 17 (8,5%) cepas não detectáveis para os genes pesquisados.

A correlação do teste fenotípico frente a metodologia molecular considerada padrão ouro para *bla*KPC e *bla*NDM foi boa, demonstrando ser uma ferramenta importante para predizer a produção dessas carbapenemases em áreas endêmicas onde não haja predominância de outras carbapenemases.

7. REFERÊNCIAS

AKTURK, H. *et al*. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factor for progression to infection. *The Brazilian journal of infectious diseases*, v. 20, n. 2, p. 134-140, 2016.

ABRANTES, J.A.; NOGUEIRA, J.R.M. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. *RBAC*. v. 49, n. 3, p.240-244, 2017.

ADEOLU, M. *et al*. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.v. 66, p. 5575–5599, 2016.

AEN PR. Parque Nacional do Iguaçu bate recorde de visitantes em 2019. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=105231#:~:text=O%20Parque%20Nacional%20do%20Igua%C3%A7u,de%20dois%20milh%C3%B5es%20de%20vezes >. Acesso em: 20 junho 2020.

ANDRADE, L. N. Estudo fenotípico e molecular de b*etal*actamases de espectro estendido e Amp C em Enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Pós graduação em Biociências, 2008.

ANIMALES. Célula procarionte. Disponível em: <https://www.animales.website/celula-procarionte/>. Acesso em: 16 junho 2020.

ANVISA. Nota técnica no 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multirresistente. Brasília, 2013.

AREND, L.N.S. Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de microrganismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná. Tese (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná, Pós graduação em Medicina Interna, Área de Concentração em Doenças Infecciosas, Setor de Ciências da Saúde, 2014.

AREND, L*. et al.* Phenotypic and molecular characterization of 942 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in southern Brazil. *Journal of Infection and Chemotherapy*, p. 1-4, 2015.

BARCELLOS, R. A. *et al.*Bactérias multirresistëntes produtoras de carbapenemase: um problema de saúde pública. *Revista Espaço e Saúde*, v. 6, n. 2, p. 63-75, dez. 2018.

CABRAL, A.B. Caracterização genética de isolados clínicos de Klebsiella pneumoniae resistentes a antibióticos β-lactâmicos de última geração provenientes de Recife-PE. Dissertação (especialização)-Universidade Federal de Pernambuco, Pós graduação Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, 2011.

CASTANHEIRA, M. *et al*. Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among enterobacteriaceae isolates in 20 years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 6, 2019.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2011.

CDC. Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi m*et al*lo-β-lactamase (NDM-1). Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf>. Acesso em: 04 abril 2019.

CUNHA, V. O. Bactérias multirresistentes: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* – Enzima KPC nas infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). Dissertação (especialização)-Universidade Federal de Minas Gerais, Pós graduação em Microbiologia, 2014.

FLORES, C. *et al*. Detection of antimicrobial resistance genes in b*et al*actamases and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial,* v. 52, n. 5, p. 284-292, oct. 2016.

HIRAI, C.K. Atualização sobre enterobactérias. *Revista Analytica*. Ed. 107, 2018.

HOU, X. *et al*. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Brazilian Journal of Microbiology,* v.46, n. 3, p. 759-768, 2015.

IACG. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Disponível em: < https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6 >. Acesso em: abril 2019.

KASVI. Aplicações dos meios de cultura em microbiologia. Disponível em: < https://kasvi.com.br/aplicacoes-meios-de-cultura-microbiologia/ >. Acesso em: 20 maio 2019.

KONEMAN *et al***.** Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

KONEMAN *et al***.** Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010.

LACEN/ SC. Nota técnica no 01/2016: Estabelece o Plano de gerenciamento das ações a ser adotado pelos Serviços de Saúde públicos e privados para redução de Eventos Adversos Infecciosos 2016. Florianópolis, 2016.

LOGAN, L.; WEINSTEIN, R. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, v. 215, p. 28-36, 2017.

LOUREIRO, R. *et al.* Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MENEZES e SILVA, C.H.P.; NEUFELD, P.M. Bacteriologia e Micologia: para o laboratório clínico. Revinter: Rio de Janeiro, 2015.

MENG, X. *et a*l. Assessing Molecular Epidemiology of Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae (CR-KP) with MLST and MALDI-TOF in Central China. *Scientific Reports*, v. 9, n.1, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PAN-BR Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única VENDA PROIBIDA. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: nov. 2018.

MICROBIOLOGY PICTURES. Klebsiella pneumoniae. Disponível em: <www.microbiologyinpictures.com>. Acesso em: 02 dezembro 2019.

opas, C. O. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β-lactamases de espectro estendido em Escherichia coli e Klebsiella spp. no Hospital universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, 2009.

OLIVEIRA, D.V. Análise e caracterização de isolados ambientais da família *Enterobacteriaceae* quanto à presença de genes de resistência a βlactâmicos. Tese (doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2016.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud/OMS – Organização Mundial da Saúde. OPAS/OMS e Anvisa apresentam estratégias para Segurança do Paciente. Brasília (DF); 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_pronpro&view=pronpro&Itemid=846>. Acesso em: 09 dezembro 2018.

OPAS. Doenças resistentes a medicamentos poderão causar 10 milões de mortes por ano no mundo. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/doencas-resistentes-a-medicamentos-poderao-causar-10-milhoes-de-mortes-por-ano-no-mundo/ >. Acesso em: 15 fevereiro 2019.

PEREIRA, P. S. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil 2016. Tese (Doutorado)-Instituto Oswaldo Cruz, Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

PICOLOTTO, M.K.S. Isolamento da primeira cepa de Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase codificada pelo gene blaNDM: um estudo de caso. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 8, n. 1, p. 8-10, 2018.

PMFI. Dados Sociodemográficos de Foz do Iguaçu 2011. Disponível em: <www.pmfi.pr.gov.br>. Acesso em: 20 junho 2020.

QUEIROZ, J.H.F.S *et al.* Isolamento e caracterização molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase. In: Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, 8 ed, Dourados – MS, 2014.

ROCHETTI, T. T. Detecção bacteriana e de genes de resistência a antimicrobianos pela técnica de PCR em tempo real em infecções de corrente sanguínea de pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de São Paulo, Pós graduação em Ciências, 2011.

ROSSETI, M.L; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Rio de janiero: Ed Guanabara koogan. 2006.

SAGIROGLU, P. *et al*. Performance of "RESIST-3 O.K.N. K-SeT" immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 4, p. 885-890, 2018.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto contexto enfermagem*, v. 13, p. 64-70, 2004.

SANTOS, W.M.; SECOLI, S.R. Impacto econômico do tratamento de pacientes infectados com *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. São Paulo. *Einstein*, v. 17, n. 4, p. 1 – 8, 2019.

SCHORNER, M.A. Estudo caso-controle dos aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções nosocomiais por Klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemases do tipo KPC. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Pós-graduação em Farmácia, 2016.

SESA. Superintendência de Vigilância em Saúde. Boletim Informativo SONIH – agosto a dezembro de 2017 - Sistema Online de Notificação de Infecções Hospitalares – SONIH Avaliação dos Indicadores Estaduais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde e Resistência Microbiana. Curitiba. abril, 2018. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br>. Acesso em: 01 ago. 2018.

SHEN, P. *et al*. Characterization of the genetic environment of the blaKPC-2 gene among *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese Hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases*, v. 20, n. 4, p. 384-388, 2016.

SHENOY, K. A.; JYOTHI, E.K.; RAVIKUMA, R. Phenotypic identification & molecular detection of blaNDM-1 gene in multidrug resistant gram-negative bacilli in a tertiary care centre***. Indian journal of medical research,*** v. 139, n. 4, p. 625-631, apr. 2014.

SILVA, D. *et al*. Phenotypic methods for screening carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and assessment of their antimicrobial susceptibility profile, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 50, n. 2, p. 173-178, 2017.

SILVA, D.F. Pesquisa de metalobetalactamase e KPC em populações de Klebsiella sp e Enterobacter sp isolados do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Dissertação (Especialização) Programa de Aprimoramento Profissional - SES-SP, elaborado no Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina- USP Ribeirão Preto, 2013.

VIVAS, R. *et al*. Prevalence of Klebsiella pneumoniae carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive K. pneumoniae in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 53, 2020.

WEIB, D. *et al*. A multiplex real-time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM and blaOXA48. *Journal of microbiological methods,* v. 142, p. 20-26, 2017.

ANEXO I

UNIOESTE - CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Klebsiella pneumoniae: análise fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência MBL e KPC em um hospital de Foz do Iguaçu, PR.

Pesquisador: Aline Cristiane Cechinel Assing Batista

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 94855418.1.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRACAO LATINO-AMERICANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.858.261

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo molecular que será realizado no laboratório de biologia molecular do Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira. Serão utilizadas amostras de sangue, urina, fezes e secreções destinadas à realização dos exames laboratoriais de rotina de pacientes internados que derem entrada no laboratório de análises clínicas do Hospital Ministro Costa Cavalcanti (HMCC) no período de junho de 2018 a junho de 2019. Em seguida, após identificação através do aparelho Phoenix (BD Diagnostics) serão selecionados 300 isolados de Klebsiella pneumoniae que apresentarem perfil de resistência para os antibióticos da classe das penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactâmicos.A identificação fenotípica desses isolados será realizada através da metodologia de disco aproximação conforme Nota técnica Nº 01/2013 da Anvisa.

Objetivo da Pesquisa:

Pesquisar o fenótipo e o genótipo de metalobetalactamase (MBL) e Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase KPC em populações de Klebsiella pneumoniae isoladas de amostras clínicas de pacientes internados em um hospital de emergência em Foz do Iguaçu, PR, no período de julho de 2018 a julho de 2019.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não possui riscos para o paciente. Apenas risco baixo para o pesquisador, porque estará

UNIOESTE - CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE

exposto a microorganismos patogênicos, no entanto o laboratório conta com uma cabine de fluxo laminar com dispositivo de exaustão e o pesquisador estará munido de jaleco de manga longa, óculos de proteção e luvas descartáveis.

Benefícios: A pesquisa auxiliará na criação de protocolos de identificação precoce de multiresistentes em ambiente hospitalar, isso propiciará em um diagnóstico mais rápido e terapêutica adequada, evitando um prolongamento da estadia hospitalar, bem como a disseminação de microrganismos potenciais produtores de multiresistência.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de interesse científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos anexados

Recomendações:

Projeto pode ser aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1103905.pdf	27/07/2018 16:14:51		Aceito
Outros	Coleta_de_dados_2.pdf	27/07/2018 16:14:12	Aline Cristiane Cechinel Assing Batista	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_uso_de_arquivos.pdf	25/07/2018 16:26:09	Aline Cristiane Cechinel Assing Batista	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_uso_do_material.pdf	25/07/2018 16:24:21	Aline Cristiane Cechinel Assing Batista	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_HMCC.pdf	25/07/2018 16:23:10	Aline Cristiane Cechinel Assing Batista	Aceito

UNILA

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu ALINE CRISTIANE CECHINEL ASSING BATISTA, acadêmica (o) do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Biociências 2018 do curso de mestrado da Universidade Federal da Integração Latino-Americana UNILA, sob orientação do Prof. Jorge Luis Maria Ruiz, venho solicitar autorização do Hospital Ministro Costa Cavalcanti, para realização da dissertação de mestrado.

O respectivo projeto tem como tema: Resistência microbiana.

O objetivo do projeto é: Pesquisar o fenótipo e o genótipo de MBL e KPC em populações de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras clínicas de pacientes internados em um hospital de emergência em Foz do Iguaçu, PR, no período de julho de 2018 a julho de 2019.

A coleta de dados será realizada, por meio de análise fenotípica utilizando discos de imipinem, meropenem e ertapenem, impregnados com as soluções de Ácido FenilBorônico (AFB), Cloxacilina (CLOXA) e EDTA em 300 amostras previamente triadas pelo laboratório de Análises Clinicas do HMCC e que possuam resistência a pelo menos 2 carbapenens, conforme nota técnica 01/2013 da ANVISA. Em seguida, as mesmas serão armazenadas em caldo TSB com glicerol e congeladas a -80°C. Para a análise molecular, o material genético será extraído através de ebulição de acordo com protocolos do CDC, para a amplificação serão utilizados primers especificos para a identificação dos genes *bla*KPC e *bla*NDM através de PCR em tempo real utilizando a química SyBRgreen.

Como o controle positivo, serão utilizadas cepas controles que apresentem genes de resistência que estão armazenadas no banco de microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC).

Todos os procedimentos serão realizados em conformidade com os princípios éticos, desta maneira, será solicitado à instituição a qual serão coletados os dados, um termo de consentimento para a disponibilização dos isolados. Além disso, essa pesquisa será submetida à avaliação por comitê de ética.

O Hospital Ministro Costa Cavalcanti concede a (o) referente acadêmica(o) o direito de utilizar os dados obtidos de forma anônima e confidencial, coletados apenas com fim de pesquisa. Fica claro também a garantia de esclarecimento antes e durante a pesquisa sobre a metodologia aplicada ou qualquer outra dúvida. O Hospital Ministro Costa Cavalcanti e seus locais utilizados não terão nenhum custo para a realização deste trabalho.

Assinaremos o presente documento em três vias de igual teor, ficando uma em posse do Diretor Superintendente do Hospital Ministro Costa Cavalcanti, outra com o orientador e uma com a acadêmica. A sua assinatura neste termo de consentimento dará autorização a autora da pesquisa a utilizar os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos e publicação dos resultados obtidos tanto para os participantes quanto para a comunidade científica, no caso desta última, sempre serão resguardados a privacidade e o anonimato.

Prof. Dr. Jorge Luis M. Ruiz
Universidade Federal da Integração Latino - Americana
SIAPE 2242052

Dr. Francisney P. do Nascimento
Coordenador Curso

Dr. Jorge Luis M. Ruiz
Orientador do Projeto

Rogério Soares Bohm
Diretor Superintendente

ROGÉRIO SOARES BÖHM
Diretor Superintendente

ANEXO II

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

NOTA TÉCNICA Nº 01/2013

MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS MULTIRESISTENTES.

Brasília, 17 de abril de 2013