



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

MANUELLA RODRIGUES DE SOUZA MELLO

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CARBAPENEMASE EM
Enterobacteriaceae E *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM CLÍNICAS
VETERINÁRIAS DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.**

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL – BRASIL

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

MANUELLA RODRIGUES DE SOUZA MELLO

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CARBAPENEMASE EM
Enterobacteriaceae E *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM CLÍNICAS
VETERINÁRIAS DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.**

Auditório

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 095/2014

ORIENTADOR (A): PROF^a DR^a SIMONE PERECMANIS

BRASÍLIA/DF

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CARBAPENEMASE EM
Enterobacteriaceae E *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM CLÍNICAS
VETERINÁRIAS DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.**

MANUELLA RODRIGUES DE SOUZA MELLO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE
ANIMAL.

APROVADA:

SIMONE PERECMANIS, PROF.^a DR^a (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF.^a DR^a (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA INTERNA)

KARLA MORAES ROCHA GUEDES, PROF.^a DR^a (Universidade de Cuiabá)
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA, MARÇO DE 2014.

BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOUZA-MELLO, M. R. **Detecção da atividade da enzima carbapenemase em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em clínicas veterinárias do Distrito Federal, Brasil.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, XXp. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza Mello, Manuella Rodrigues de
Detecção da atividade da enzima carbapenemase em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em clínicas veterinárias do Distrito Federal, Brasil. / Manuella Rodrigues de Souza Mello. – Registro: 2014
– f.; – cm.

Orientadora: Simone Percmanis

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. KPC. 2. Teste de Hodge Modificado. 3. Clínicas Veterinárias. I. Percmanis, Simone, orient. II. Título

Dedico à Anne Dianne Máximo,
com imensa saudade.

Aos meus pais, com profunda
gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as dádivas e alegrias em minha vida. Ele me proporcionou minhas conquistas, minha família tão amada e meus queridos amigos.

Agradeço imensamente à Professora Dra. Simone Peregmanis. Além de um exemplo de mulher, educadora e orientadora, uma amiga que me acompanhou e confiou em mim ao longo desses cinco anos de trabalho.

Agradeço, especialmente, aos meus queridos que cultivei com muito amor no laboratório: Hudson, Vinicius, Rafael Lourinho e Ana Paula. A rotina ao lado de vocês sempre foi maravilhosa. Agradeço a Deus por ter me dado colegas de trabalho que posso considerar com verdadeiros amigos.

Agradeço de todo o meu coração à minha amiga-irmã Anne Daianne. Você nos deixou um vazio e sempre existirá a saudade dos momentos maravilhosos que qualquer um tinha ao seu lado. Você me incentivou, me ouviu, me escutou e, claro, rimos uma vida inteira juntas.

Agradeço imensamente à minha querida amiga Karla Moraes Guedes que está sempre presente em todos os momentos difíceis e por ter aceitado o convite para participação da banca, realizando um trabalho crítico excepcional. Muito obrigada!

Agradeço também aos mais recentes amigos de trabalho: Marcela, Luciana, André Simaan, Diego e Portugal. Obrigada pela alegria, pelo carinho e pela grande ajuda.

A Capes e Cnpq, por me ajudarem financeiramente nesses dois anos de estudo. Agradeço à minha família e aos meus pais, Josefa e Antonio Roberto. Obrigada pelo amor, pela educação e por sentimentos tão intensos e gratificantes que eu não consigo expressar com palavras. Eu amo vocês.

Agradeço ao meu amor, Felipe Augusto, razão da minha felicidade e paz de todos os dias. Obrigada pelo apoio, por me sustentar quando preciso, por ser parte da minha vida, por ser meu melhor amigo e parte minha família.

"Não vos aconselho o trabalho, mas a luta. Não vos aconselho a paz, mas a vitória!

Seja o vosso trabalho uma luta! Seja a vossa paz uma vitória!"

Friedrich Wilhelm Nietzsche

RESUMO

O recente aparecimento de bactérias produtoras de enzimas carbapenemases representa um problema de saúde pública relacionado com a ineficiência no tratamento de infecções nosocomiais. Além do aumento de isolados humanos, muitas pesquisas apontam o crescente número de bactérias multirresistentes não somente em ambientes hospitalares, mas também em isolados de animais, ambientes e afluentes. Entretanto, estudos direcionados para o potencial zoonótico ainda são limitados. O objetivo do presente estudo foi identificar cepas de *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* produtores de enzimas carbapenemases circulantes em ambientes veterinários. Foram isoladas 17 amostras provenientes de clínicas veterinárias e submetidas ao teste de difusão em disco com imipenem, ertapenem e meropenem. 11 cepas sugestivas da presença de carbapenemases, com halo ≤ 22 mm no antibiograma, foram submetidas ao Teste de Hodge Modificado. Todas as amostras foram negativas para o teste de Hodge Modificado. Apesar de não ter sido detectada fenotipicamente a expressão da enzima carbapenemase, a resistência aos carbapenêmicos pode estar relacionada a outro mecanismo de resistência adquirido. Portanto, considerando os crescentes relatos da disseminação de carbapenemases, em especial a KPC, o mapeamento das áreas onde bactérias multirresistentes estão presentes é vital para a elaboração de medidas de controle e manutenção da salubridade da população.

Palavras-chave: KPC. Teste de Hodge Modificado. Carbapenemases. Resistência bacteriana. Clínicas Veterinárias.

ABSTRACT

The recent emergence of bacteria producing carbapenemase enzyme represents a public health issue related to the inefficiency in the treatment of nosocomial infections. In addition to the increased human isolates, current studies indicate the increasing number of multidrug-resistant bacteria not only in hospital settings, but also present in isolates from animals, common areas and effluents. However, studies on the zoonotic potential are still limited. The aim of this study was to identify strains of *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa* producing carbapenemase enzymes in veterinary environments. 17 samples from veterinary clinics were isolated and examined through the disk diffusion test with imipenem, meropenem and ertapenem. 11 strains suggesting of the presence of carbapenemase with halo ≤ 22 mm on antibiograma were submitted to the modified Hodge test. All samples were negative for the modified Hodge test. Despite the expression of carbapenemase enzyme has not been phenotypically detected, the carbapenem resistance may be related to another mechanism of acquired resistance. Therefore, considering the increasing reports of the spread of carbapenemases, especially KPC, the mapping of areas where multidrug-resistant bacteria are present is vital for the development of control measures and maintenance of the population health. Key words: KPC. Modified Hodge Test. Carbapenemase. Antibiotic resistance. Veterinary clinics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1 Padrão do halo de sensibilidade indicado pelo CLSI, 2012.	17
Quadro 2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 17 isolados.	19

LISTA DE ABREVIATURAS

KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
ESBL	Beta-lactamases de Amplo Espectro
ETP	Ertapenem
IMP	Imipenem
MER	Meropenem
THM	Teste de Hodge Modificado

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO I	01
1 Introdução	01
2 Levantamento bibliográfico	02
2.1 Resistência bacteriana e o uso de antibióticos	02
2.2 Resistência a β-lactâmicos e a emergência das β-lactamases	03
2.3 Carbapenemases	04
2.3.1 Classificação	04
2.3.2 Mecanismo de ação dos β -lactâmicos	05
2.3.3 Mecanismo de resistência das carbapenemases	05
2.3.4 Origem e disseminação das carbapenemases	05
3 Objetivos	08
Referências	08
CAPITULO II	15
Introdução	15
Material e Métodos	16
Resultados	18
Discussão	20
Conclusão	22
Referências	22

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de infecções hospitalares é diretamente afetada pelo desenvolvimento de resistência bacteriana, visto que aumenta o tempo de internação dos pacientes e o custo hospitalar e da comunidade, além de evoluírem para óbitos. Com o uso indiscriminado de antibióticos nas últimas décadas, essa realidade se tornou ainda mais frequente (Alanis 2005, Brasil 2010). Nesses casos, a escolha de antibióticos carbapenêmicos é priorizada por serem estes eficazes no tratamento de quadros associados a bactérias multirresistentes (Levinson & Jawetz 1998). Contudo, após a descoberta de bactérias produtoras de enzimas capazes de conferir resistência a esses antibióticos, foi indispensável um novo enfoque a cerca de uma ameaça para a saúde pública (Brasil 2010).

Em 1996, – na Carolina do Norte, EUA – foram identificados isolados da enterobactéria *Klebsiella pneumoniae* que apresentavam resistência a antibióticos carbapenêmicos (Yigit et al. 2001). Essa resistência é conferida pela ação de um tipo de enzima carbapenemase, nomeada de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), capaz de provocar a hidrólise de grande variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos (Queenan & Bush 2007). A mutação da sequência genética do gene original que induz a produção de enzimas KPC fez surgir diversas variantes identificadas em diferentes espécies de bactérias e localidades. A enzima já foi identificada em *Citrobacter freundii* e *Klebsiella oxytoca* (Rasheed et al. 2008), *Enterobacter* spp. (Bratu et al. 2005), *Salmonella* spp. (Miriagou et al. 2003) e *Escherichia coli* (Bratu et al. 2007), além de notificações em Israel (Navon-Venezia et al. 2006), China (Li et al. 2011), Grécia (Cuzon et al. 2008) e França (Naas et al. 2005).

O primeiro caso reportado na América do Sul ocorreu na Colômbia, em 2006, onde a presença da enzima foi identificada em *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Villegas et al. 2006). A partir de 2006, ocorrências consecutivas foram identificadas no Brasil, primeiramente em Recife (Monteiro et al. 2009) e na sequência, Rio de Janeiro (Peirano et al. 2009), São Paulo (Beirão et al.

2009) e Distrito Federal, sítio com o maior número de casos de pessoas infectadas e de óbitos no país (Pereira 2012).

Além do aumento de isolados humanos, bactérias multirresistentes portadoras de carbapenemases foram detectadas em ambiente não hospitalar, como demonstrado em pesquisas envolvendo amostras colhidas de animais de produção (Fischer et al. 2012), animais de companhia (Shaheen et al. 2013, Stolle et al. 2013), afluentes e esgoto (Quinteira 2005). Entretanto, ainda é muito escassa a literatura sobre o potencial zoonótico de microrganismos multirresistentes, principalmente os produtores de carbapenemases KPC, e os seus futuros impactos na sociedade, na Medicina, bem como, na Medicina Veterinária (Woodford et al. 2014, Portnet & Johnson 2010).

Na Medicina Veterinária há poucos relatos sobre a contaminação ambiental e a possível presença de bactérias que representam risco à saúde pública. O acometimento ou a morte de animais como consequência de contaminação do ambiente hospitalar não são identificadas ou documentadas, demonstrando uma menor preocupação com a insalubridade do ambiente e dos pacientes (Portnet & Johnson 2010, Santos et al. 2010).

2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRAFICO

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA E O USO DE ANTIBIÓTICOS

Os primeiros antimicrobianos surgiram no início do século XX, como agentes quimioterápicos e antibióticos propriamente ditos. Dentre os agentes antibióticos, o primeiro a ser descrito foi a penicilina em 1929, por Fleming, embora sua comercialização só tenha sido implementada após a segunda guerra mundial (Madingan, Martinko, Parker, 2004).

Já na metade do século XX era conhecida resistência de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, os agentes causadores mais comuns de infecções hospitalares nos anos 80 e 90, à penicilina (Souza et al. 2005, Rubin et al. 1999). Ainda no que concerne a alta habilidade de desenvolvimento de resistência a antibióticos, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras anaeróbias presentes do trato intestinal possuem a propriedade corriqueira de transferência de genes resistência entre diferentes gêneros e espécies (Quinn et al. 2005).

Atualmente, a resistência a drogas antimicrobianas é cada vez mais representativa, tanto em humanos quanto em animais (Quinn et al. 2005). O uso indiscriminado de antibióticos na medicina e em produções agropecuárias tem contribuído para o aumento de relatos nos últimos 30 anos (Santos et al. 2010, Alanis 2005).

Entre as condições predisponentes para a disseminação da resistência, locais com uma alta concentração de bactérias multirresistentes estão em primeiro plano. Hospitais e, em especial, as Unidades de Terapia Intensiva, apresentam os fatores de risco mais importantes existentes: o uso excessivo de antibióticos em ambiente nosocomial; falhas dos profissionais da saúde em procedimentos de higiene; e a permanência de pacientes com o sistema imune comprometido em leitos hospitalares (Santos 2004).

Em casos críticos de infecções causadas por bactérias multirresistentes é adotado o tratamento com antibióticos carbapenêmicos, como o imipenem, meropenem e ertapenem, eficazes contra um amplo espectro de bactérias gram positivas e gram negativas. Dessa forma, o aspecto mais preocupante da dispersão de resistência bacteriana é a exclusão de opções terapêuticas para pacientes de risco que contraíram infecções oportunistas. (Levinson & Jawetz 1998, Hirsh & Zee 1999).

2.2 RESISTÊNCIA A BETA-LACTÂMICOS E A EMERGÊNCIA DE BETA-LACTAMASES

O mecanismo de ação de drogas antimicrobianas está relacionado ao comportamento das bactérias ao sofrerem a ação química da droga (Hirsh & Zee 1999). O principal mecanismo de resistência de patógenos envolvidos em infecções nosocomiais é a produção de β -lactamases (Bertonchelli & Hörner 2008; Bradford 2001). Em geral, enzimas β -lactamases são codificadas cromossomicamente, exercendo um importante papel na seleção de bactérias resistentes, e muitos gêneros de bactérias gram-negativas possuem esses mecanismos naturalmente. A evolução dessas enzimas é a partir de proteínas de ligação à penicilina, que em sua estrutura gênica se assemelha às β -lactamases (Bradford 2001, Jacoby & Munoz-Price 2005). A outra oportunidade de transferência da resistência bacteriana é por meio de plasmídeos, elementos genéticos circulares que carregam uma sequência de pares de base podendo compartilhar todas as

informações presentes, parte delas ou apenas um determinado trecho de pares de base que codifica a produção desse tipo de enzima (Quinn et al. 2005). A primeira β -lactamase transferida por plasmídeo em bactérias gram-negativas ocorreu na década de 1960, onde foi descrito o gene TEM-1 (Datta & Kontomichalou 1965). A variedade de enzimas com essa estrutura é enorme e já foram identificadas mais de 150 tipos de β -lactamases atualmente (Bradford 2001).

2.3 CARBAPENEMASES

As enzimas que fazem parte dessa classificação são β -lactamases que hidrolisam preferencialmente carbapenêmicos, podendo apresentar resistência conjuntamente a penicilinas e/ou cefalosporinas (Quinteira 2005).

2.3.1 Classificação

Conforme classificação das β -lactamases sugerida por Ambler (1980), quatro classes foram divididas (Classes A, B, C e D), tomando como base de organização a sua estrutura primária. As classes A e B podem ser consideradas carbapenemases já que possuem a capacidade, mesmo que reduzida, de catalisar a hidrólise de carbapenêmicos. No entanto, a resistência observada nas classes C e D (oxacilinas) pode estar ligada a outros fatores, como a alteração da permeabilidade da membrana (Rasmussen et al. 1996, Quinteira 2005).

A classe A é composta por apenas nove enzimas, dentre elas: Sme-1 (Naas et al. 1994), IMI-1 (Rasmussen et al. 1996), KPC-1 (Yigit et al. 2001), KPC-2 (Moland et al. 2003), KPC-3 (Woodford et al. 2004) e etc. Esse grupo compreende carbapenemases de metabolismo catalítico do tipo serina- β -lactamase, ou seja, no centro ativo da enzima possui resquícios de serina, um aminoácido primário responsável pela hidrólise, que oferece uma resistência variável a cefalosporinas e são sensíveis ao tratamento em conjunto com ácido clavulânico e tazobactam (Bradford 2001, Quinteira 2005, Bertonchelli & Hörner 2008). Das enzimas da classe A, a família KPC surgiu mais recentemente diferindo do padrão das outras enzimas, apresentando alto nível de resistência as cefalosporinas e, sobretudo aos carbapenêmicos (Miriagou et al. 2003),

além de uma sequência de pares de base pouco compatível com as demais enzimas do grupo (Quinteira 2005).

As enzimas pertencentes da classe B, chamadas metalo- β -lactamases, podem ser transferidas por plasmídeos ou codificadas cromossomicamente. Utilizam íons de zinco ou outros cátions divalentes para realizar o seu metabolismo catalítico. As enzimas desse grupo são responsáveis pela resistência da maioria dos antibióticos disponíveis comercialmente (Bush et al. 1995).

2.3.2 Mecanismo de ação dos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos possuem em comum um anel β -lactâmico, uma estrutura intacta primordial para a ação antimicrobiana, formado por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio com radicais que podem alterar e são exemplos de antibióticos que inibem a ação de enzimas transpeptidases, responsáveis pela etapa final da síntese da parede celular bacteriana. A parede celular, composta de por uma camada de peptidoglicanos, confere proteção, sustentação e manutenção externa da membrana celular, além do controle da pressão osmótica interna da célula bacteriana, vital para sua sobrevivência. A molécula do antibiótico penetra na bactéria através das porinas presentes na membrana externa da parede celular bacteriana e em seguida se ligam e inibem as proteínas ligadoras de penicilina (PLP), as chamadas transpeptidases. Para que todo esse processo ocorra, a estrutura do antimicrobiano não deve ser destruída pela ação das β -lactamases (Levinson & Jawetz 1998; Spinosa et al. 2006).

2.3.3 Mecanismo de resistência das carbapenemases

As carbapenemases conferem resistência mediada pela ação das enzimas acelerando reações e com poder catalítico. O mecanismo catalítico, também conhecido como complexo de Michaelis (ou enzima substrato ES) ocorre em duas etapas: A primeira etapa corresponde a uma ligação não covalente, particularmente estável, entre o catalisador (carbapenemase) e o substrato (carbapenêmico). A inativação do antibiótico ocorre na segunda etapa por meio da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico. A hidrólise faz com que a enzima seja liberada ainda ativa,

podendo realizar novamente a reação com outras moléculas do antibiótico (Livermore 1995).

2.3.4 Origem e disseminação das carbapenemases

Com base nas publicações em revistas e jornais científicos, a primeira evidência da presença de novas carbapenemases ocorreu a partir de um isolado de *Klebsiella pneumoniae* com total resistência ao imipenem e ao meropenem. A amostra, denominada KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), foi isolada no ano de 1996 em um hospital participante do programa ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*) da Carolina do Norte, Estados Unidos (Yigit et al. 2001).

Em estudo realizado durante os anos de 1998 e 1999, a enzima carbapenemase KPC-2 foi detectada em quatro amostras de *K. pneumoniae*, a partir de amostras de pacientes internados no Centro Clínico de Maryland, Estados Unidos. Tais isolados apresentaram resistência ao ertapenem e foram consideradas sensíveis ou intermediárias ao imipenem e meropenem, diferentemente dos achados da KPC-1, na Carolina do Norte. A enzima observada nesse estudo, batizada de KPC-2, apresentou 99% de compatibilidade genética com a sequência da KPC-1, possuindo apenas um aminoácido variante (Moland et al. 2002).

Woodford et al. (2004) publicou dados de amostras de *K. pneumoniae* produtoras da carbapenemase KPC-3, coletadas entre os anos de 2000 e 2001 em um hospital de Nova York, provenientes de 24 pacientes de UTI.

O primeiro relato de presença de KPC fora dos Estados Unidos ocorreu na França (Naas et al. 2005), em 2005, quando amostras de um paciente foram identificadas de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 com a mesma sequência genética das amostras descritas por em *Salmonella enterica* em Maryland (Miriagou et al. 2003). O paciente estava internado anteriormente em um hospital em Nova York, onde passou por um procedimento cirúrgico e provavelmente ocorreu a contaminação com a bactéria identificada, comprovando o transporte intercontinental. Até a descoberta da enzima KPC na França, a mediação por plasmídeo do gene que codifica a enzima KPC apenas tinha ocorrido nos Estados Unidos (Naas et al. 2005).

A primeira aparição de enzimas KPC não relacionadas com o transporte de bactérias provenientes dos Estados Unidos ocorreu em Israel no ano de 2005, onde

foram encontradas quatro amostras de *E. coli* produtoras de KPC-2 (Navon-Venezia et al. 2006). Também em Israel, Leavitt et al. (2007) sugeriu o potencial de disseminação clonal em Israel de *K. pneumoniae* que carregavam genes que codificam as enzimas KPC-2 e KPC-3.

A partir de 2005, casos consecutivos foram relatados na América do Sul: primeiramente na Colômbia, em 2005, e depois em Recife, em 2006. O estudo conduzido na Colômbia identificou a enzima KPC-2 em *K. pneumoniae* (Villegas et al. 2006). Apesar não ter sido confirmada a relação direta com as amostras encontradas nos Estados Unidos no estudo de Villegas et al. (2006), um artigo publicado em 2007 por Wei et al. (2007) comprovou a relação genética entre os achados da Colômbia e dos Estados Unidos. Nesse estudo, foi descrita uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2, na China, sem identidade genética com os descritos nos Estados Unidos (Wei et al. 2007).

Embora o caso de KPC ocorrido em Recife tenha sido proveniente de amostras de 2006, apenas em 2009 houve a primeira notificação da presença dessas enzimas. Em três das quatro amostras de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva foram detectados os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-2} (Monteiro et al. 2009).

No entanto, Pavez et al. (2009) confirmou a presença de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 isoladas em São Paulo por meio de um estudo regional de vigilância sanitária de amostras do período de 2003 a 2008. O estudo indicou que a aparição de genes de resistência ligados à produção de carbapenemases parece ter surgido em São Paulo em 2005 e, posteriormente, foi observada em outros estados do Brasil (Pavez et al. 2009).

Em avaliação conduzida por Pereira (2012), realizada no período de 2006 a 2010, a respeito do polimorfismo genético e o perfil de resistência a antimicrobianos realizada em doze estados brasileiros (AL, AM, CE, DF, ES, GO, MG, MA, PE, PI, RJ e SC), foi detectado o gene *bla*_{KPC-2} em todas as amostras e associado a plasmídeos em 95,3% das amostras. O gene *bla*_{KPC-2} e outros genes de resistência relacionados à β -lactamases de amplo espectro (ESBL) foram detectados em seis amostras oriundas de dois hospitais do Rio de Janeiro, nos anos de 2007 e 2008. Ademais, outro fator que dificulta o controle sanitário é a dispersão do gene *bla*_{KPC} através de complexos clonais (Pereira 2012).

O Conselho Federal de Enfermagem (Cofen 2012) publicou dados do período de 2009 e 2010 indicando os casos notificados de pacientes infectados ou contaminados por enterobactérias produtoras da enzima KPC na rede hospitalar no Brasil: Espírito Santo, 3 casos; Goiás, 4; Minas Gerais, 12; Santa Catarina, 3; São Paulo, 70; e Distrito Federal, 157. O maior número de casos e óbitos foi notificado no Distrito Federal. A Gerência de Investigação e Prevenção a Infecção e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (GEPEAS) divulgou, em 12 de janeiro de 2011, que entre janeiro de 2010 e 08 de janeiro de 2011, 367 casos de portadores foram notificados no Distrito Federal. Desses, 82 pacientes apresentavam sinais de infecção e 16 óbitos foram informados. O fato é que desde 2008 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) adotou medidas para controlar a situação epidemiológica das “superbactérias” por meio de manuais explanando sobre as principais síndromes infecciosas relacionadas à assistência à saúde, incluindo suas definições, indicadores, medidas e estratégias de prevenção (Brasil 2010).

3 OBJETIVOS

Gerais

Identificar a presença de espécies de enterobactérias e *P. aeruginosa* resistentes à carbapenêmicos em hospitais e clínicas veterinárias do DF e Entorno.

Específicos

Detectar a presença de enzimas carbapenemases, fenotipicamente, por meio do Teste Hodge Modificado.

REFERÊNCIAS

- Alanis A.J. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?. **Archives of Medical Research** 36(6):697-705
- Ambler R. P. 1980. The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. London. (Biol.)** 289:321–331. (Apud Livermore 1995)

- Beirão E.M., Furtado J.J.D., Girardello R., Filho H. & Gales A.C. 2009. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 15(1):69-73.
- Bertonchelli C.M. & Hörner R. 2008. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 44(4):577-599.
- Bradford P.A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical microbiology reviews** 14(4):933-951.
- Brasil. 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica 01/2010**: Medidas para identificação e prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes.
- Bratu S., Landman D., Alam M., Tolentino E. & Quale J. 2005. Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49(2):776-778.
- Bratu S., Brooks S., Burney S., Kochar S., Gupta J., Landman D. & Quale, J. 2007. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Clinical Infectious Diseases** 44(7):972-975.
- Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 39(6):1211.
- Carvalhoes C.G., Picão R.C., Nicoletti A.G., Xavier D.E. & Gales A.C. 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal of antimicrobial chemotherapy** 65(2):249-251.
- Castanheira M., Deshpande L.M., Mathai, D., Bell J.M., Jones R.N. & Mendes, R.E. 2011 Early dissemination of NDM-1-and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 55(3):1274-1278.
- CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22. **Clinical and Laboratory Standards Institute**.

- COFEN – Conselho Federal de Enfermagem. Enzima KPC: entenda o que é. Disponível em: <http://www.portalcofen.gov.br/sitenovo/node/5877>. Acessado em: 17 de janeiro de 2012.
- Cuzon G., Naas T., Demachy M.C. & Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52(2):796-797.
- Fairfax M.R., Queenan A.M., Lephart P.R., Kaye K.S., Dror M., Arnous, N., Samnia T.T., Mitchell R.A., Alangaden G. & Salimnia H. 2001. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** 71(3):325-326.
- Datta N. & Kontomichalou P. 1965. Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In *Enterobacteriaceae*. **Nature** 20(8):239-241.
- Dienstmann R., Picoli S.U., Meyer G., Schenkel T. & Steyer, J. 2010. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 46(1):23-27.
- Fischer J., Rodriguez I., Schmogger S., Friese A., Roesler U., Helmuth R. & Guerra, B. 2012. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 67(7):1793-1795.
- Girlich D., Laurent P. & Nordmann P. 2011. Value of the Modified Hodge Test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology** 50(2):477.
- Hirsh D.C. & Zee Y.C. 2003. **Microbiologia Veterinária**. Guanabara Koogan. 446p.
- Jacoby G.A. & Munoz-Price L.S. 2005. The new β -lactamases. **New England Journal of Medicine** 352(4):380-391.
- Kaczmarek F.M., Dib-Hajj F., Shang W. & Gootz T.D. 2006. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of blaACT-1 β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 50(10):3396-3406.
- Leavitt A., Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Schwaber M.J. & Carmeli Y. 2007. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

- strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51(8):3026-3029.
- Levinson W. & Jawetz E. 1998. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4ª ed. Porto Alegre. Artes Médicas. 415p.
- Li G., Wei Q., Wang Y., Du X., Zhao Y. & Jiang X. 2011. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 30(4):575-580.
- Livermore D.M. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 8(4):557-584.
- Livermore D.M., Winstanley T.G. & Shannon K.P. 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 48(suppl 1):87-102.
- Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J. 2004. **Microbiologia de Brock**. 10ª ed. São Paulo: Prentice Hall. 608p
- Miriagou V., Tzouveleki L.S., Rossiter S., Tzelepi E., Angulo F.J. & Whichard J. M. 2003. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 47(4):1297-1300.
- Moland E.S., Hanson N.D., Herrera V.L., Black J.A., Lockhart T.J., Hossain A., Johnson J.A., Goering R.V. & Thomson, K.S. 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 51(3):711-714.
- Monteiro J., Santos A.F., Asensi M.D., Peirano G. & Gales A.C. 2009. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 53(1):333-334.
- Naas T., Vandel L., Sougakoff W., Livermore D. M. & Nordmann P. 1994. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 38(6):1262-1270.
- Naas T., Nordmann P., Vedel G. & Poyart C. 2005. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49(10):4423-4424.

- Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Leavitt A., Schwaber M.J., Schwartz D. & Carmeli Y. 2006. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 50(9):3098-3101.
- Oliveira S.J. 2000. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. 2ª ed. Ulbra. 237p.
- Oliveira M.V. & Cardoso A.M. 2012. A Importância da Detecção de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases pelo Teste de Hodge Modificado. **NewsLab**.
- Pavez M., Mamizuka E.M. & Lincopan N. 2009. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 53(6):2702-2702.
- Peirano G., Seki L.M., Passos V.L.V., Pinto M.C., Guerra L.R & Asensi M.D. 2009. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 63(2):265-268.
- Pereira P. 2012. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes regiões do Brasil. Tese de Doutorado. **Instituto Oswaldo Cruz**.
- Poole K. 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. **Cellular & Molecular Life Sciences** 61(17):2200-2223.
- Portner J. A. & Johnson J. A. 2010. Guidelines for reducing pathogens in veterinary hospitals: disinfectant selection, cleaning protocols, and hand hygiene. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians** (Yardley, PA) 32(5):E1-11.
- Queenan A.M. & Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. 20(3):440–458.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J.C. & Leonard, F.C. 2005. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed. 512p.
- Quinteira S.M.B. 2005. Eco-epidemiologia de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases com impacto clínico. Tese de doutorado. **Universidade do Porto – Portugal**.
- Rasheed J.K., Biddle J.W., Anderson K.F., Washer L., Chenoweth C., Perrin J., Newton D.W. & Patel J.B. 2008. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

- type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. **Journal of Clinical Microbiology** 46(6):2066-2069.
- Rasmussen B.A., Bush K., Keeney D., Yang Y., Hare R., O'Gara C. & Medeiros A.A. 1996. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a classe A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 40(9):2080-2086.
- Rubin R.J., Harrington C.A., Poon A., Dietrich K., Greene J.A. & Moiduddin A. 1999. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infections in New York City hospitals. **Emerging Infectious Diseases** 5(1):9-17.
- Santos N.Q. 2004. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto-Enfermagem** 13(SPE):64-70.
- Santos L.R., Neto J.F.S., Rizzo N.N., Bastiani P.V., Rodrigues L.B., Barcellos H.H.A. & Brun M.V. 2010. Contaminação ambiental em um hospital veterinário e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas. **Ciência Animal Brasileira** 11(2):384-389.
- Shaheen B.W., Nayak R. & Boothe D.M. 2013. Emergence of a New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 57(6):2902-2903.
- Souza M.V., Reis C. & Pimenta F.C. 2005. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical** 34(1):27-36.
- Spinosa H.S., Górnica S.L. & Bernardi M.M. 2006. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan. 4ª ed. 897p.
- Stolle I., Prenger-Berninghoff E., Stamm I., Scheufen S., Hassdenteufel E., Guenther S., Bethe A., Pfeifer Y. & Ewers C. 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 68(12):2802-2808.
- Villegas M. V., Lolans K., Correa A., Suarez C.J., Lopez J.A., Vallejo M., Quinn J.P. & Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella*

- pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50(8):2880-2882.
- Wei Z.Q., Du X.X., Yu Y.S., Shen P., Chen Y.G. & Li L.J. 2007. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 51(2):763-765.
- Woodford N., Tierno P.M., Young K., Tysall L., Palepou M.F.I., Ward E., Painter R., Suber D., Shungu D., Silver L., Inglima K., Kornblun J. & Livermore D.M. 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48(12):4793-4799.
- Woodford N., Wareham D.W., Guerra B. & Teale C. 2014. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 69(2):287-291.
- Yigit H., Queenan A.M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J.W., Steward C.D., Alberti S., Bush K. & Tenover F.C. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** 45(4):1151–1161.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana representa um fator prejudicial quando associado aos casos de infecções hospitalares. O uso indiscriminado de antibióticos nas últimas décadas, a desatenção aos procedimentos de higiene por parte de profissionais da saúde e a permanência de pacientes com o sistema imune comprometido em leitos hospitalares são elementos que induzem o desenvolvimento e a disseminação de microrganismos não suscetíveis à ação de antibióticos (Alanis 2005, Brasil 2010, Santos 2004).

A escolha terapêutica priorizada é a utilização de carbapenêmicos, antibióticos da classe dos β -lactâmicos, em razão da eficácia em quadros infecciosos associados a bactérias multirresistentes, sobretudo a enterobactérias (Levinson & Jawetz 1998). Os β -lactâmicos possuem em comum um anel β -lactâmico, uma estrutura intacta primordial para a ação antimicrobiana. O anel β -lactâmico é formado por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio com radicais que podem alterar e são exemplos de antibióticos que inibem a ação de enzimas transpeptidases, responsáveis pela etapa final da síntese da parede celular bacteriana. A parede celular confere proteção, sustentação e manutenção externa da membrana celular, composta por uma camada de peptidoglicano, que controla a pressão osmótica interna da célula bacteriana, vital para sua sobrevivência. A molécula do antibiótico penetra na bactéria através das porinas presentes na membrana externa da parede celular bacteriana e, em seguida, se liga e inibe proteínas ligadoras de penicilina (PLP), as chamadas transpeptidases. Para que todo esse processo ocorra, não devem ser destruídos pelas β -lactamases produzidas pelas bactérias (Levinson & Jawetz 1998, Spinosa et al. 2006). A inativação do antibiótico ocorre na segunda etapa por meio da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico. A hidrólise faz com que a enzima seja liberada ainda ativa, podendo realizar novamente a reação com outras moléculas do antibiótico (Livermore 1995).

As enzimas que exercem as atividades descritas acima são denominadas β -lactamases, dispostas em quatro classes (Classes A, B, C e D), conforme a classificação de Ambler (1980). As classes A e B possuem a capacidade, mesmo que reduzida, de catalisar a hidrólise de carbapenêmicos, enquanto a resistência associada às classes C e

D (oxacilinas) pode estar relacionada a outros fatores, como a alteração da permeabilidade da membrana (Rasmussen et al. 1996, Quintera 2005).

Uma nova β -lactamase classe A, nomeada de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), emergiu nos últimos 10 anos, demandando um novo enfoque a cerca de uma ameaça para a saúde pública (Brasil 2010). Seu perfil de resistência distinto é capaz de hidrolisar não somente grande variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactams, como também carbapenêmicos (Queenan & Bush 2007).

A carbapenemase KPC foi primeiramente identificada em amostras de *Klebsiella pneumoniae*, em 1996, na Carolina do Norte, EUA (Yigit et al. 2001). A enzima já foi identificada em *Citrobacter freundii* e *Klebsiella oxytoca* (Rasheed et al. 2008), *Enterobacter* spp. (Bratu et al. 2005), *Salmonella* spp. (Miriagou et al. 2003) e *Escherichia coli* (Bratu et al. 2007). Os relatos da enzima KPC e de novas variantes da foram isoladas em Israel (Navon-Venezia et al. 2006), China (Li et al. 2011), Grécia (Cuzon et al. 2008), França (Naas et al. 2005) e América do Sul (Villegas et al. 2006).

A partir de 2005, ocorrências foram documentadas no Brasil: primeiramente, em Recife (Monteiro et al. 2009) e os relatos seguintes no Rio de Janeiro (Peirano et al. 2009), São Paulo (Beirão et al. 2009) e Distrito Federal, sítio com o maior número de casos de pacientes infectados e de óbitos no país (Pereira 2012).

O alto número de casos de pacientes infectados por bactérias multirresistentes em hospitais no Distrito Federal motivou a execução deste trabalho, que objetiva a identificação de espécies de enterobactérias e *P. aeruginosa* resistentes à carbapenêmicos. A principal finalidade foi detectar a presença de enzimas carbapenemases, fenotipicamente, por meio do Teste Hodge Modificado. Essa abordagem visa identificar o transporte de carga bacteriana entre proprietários e animais de companhia, e a introdução de mais mecanismos de resistência na população humana e animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre março e outubro de 2013 foram visitadas cinco clínicas veterinárias, onde nos foi permitido acesso, localizadas em Brasília e no Entorno, para a realização de coletas de amostras. Foram coletados *swabs* de arrasto de locais onde ocorre maior

circulação de animais e ou de dispensa de materiais como pia, piso, bancada de atendimento, mesa do veterinário, balança, mesa cirúrgica, autoclave e balde acessório para a mesa de atendimento. Todas as amostras foram coletadas em triplicata.

Os swabs coletados foram transportados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) até o laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília para o processamento das amostras. Os swabs foram estriados em placas de Ágar Sangue de carneiro a 5%, incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as colônias foram repicadas em ágar MacConkey. As colônias características foram submetidas aos testes bioquímicos de identificação de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* para a sua classificação. Para identificação das enterobactérias foi utilizado primeiramente dos testes de catalase, Oxidade e Oxidação/Fermentação da Glicose.

Depois de identificadas como pertencentes da família *Enterobacteriaceae*, um teste bioquímico de triagem conhecido como IMViC (constituído pelos testes do Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato) e outros testes bioquímicos de rotina para identificação de gênero e espécie serão realizados. Os testes utilizados para a identificação foram Motilidade, Fenilalanina, Gelatina, Triplo Ferro Açúcar, Malonato, Ornitina, Lisina, Arginina, Glicose, Sacarose, Lactose, Rhamnose, Rafinose, Xilose, Arabinose, Maltose, Salicina, Dulcitol e Sorbitol (Oliveira 2000). Para o isolamento e identificação de *Pseudomonas aeruginosa* foi observado o crescimento bacteriano com produção de pigmento pioverdina (verde fluorescente), piocianina (azul verdoso) e fluoresceína (amarelo fluorescente) na placa de Petri contendo Agar Cetrimida.

Para a detecção da enzima KPC, as bactérias foram submetidas à metodologia de antibiograma por difusão em disco com carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem). Para a interpretação dos resultados, foram adotados os padrões do diâmetro do halo inibitório de sensibilidade, publicados em 2012, pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), como indicado no Quadro 1.

Quadro 1: Padrão do halo de sensibilidade indicado pelo CLSI, 2012.

CLSI, 2012			
Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
ETP	≥ 22 mm	21 – 19	≤ 18 mm
IMP	≥ 23 mm	22 – 20	≤ 19 mm
MER	≥ 23 mm	22 – 20	≤ 19 mm

ETP: ertapenem; IMP: imipenem; MER: meropenem.

As bactérias com halo inibitório ≤ 22 mm no antibiograma foram submetidos ao teste de Hodge modificado. O disco utilizado preferencialmente é o ertapenem 10mm, uma vez que relatos indicam que a sensibilidade e a especificidade para KPC são maiores na utilização deste antimicrobiano (90% a 100% e 81% a 93%, respectivamente) quando comparados aos demais (Dienstmann et al. 2010).

Para interpretação da sensibilidade aos antimicrobianos empregaram-se diâmetros de halos para carbapenens recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI 2012). O Teste de Hodge Modificado, indicado pelo CLSI para isolados suspeitos de bactérias produtoras de carbapenemases, que apresentam um perfil de resistência a cefalosporinas de amplo espectro, foi realizado seguindo o seguinte protocolo: Primeiramente, foi preparada uma suspensão de caldo Mueller Hinton contendo três ou quatro colônias de *E. coli* ATCC 25922, sabidamente sensível a ação do ertapenem. Esta suspensão foi então inoculada em toda a superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton, como o realizado em procedimentos de rotina de antibiograma. A placa foi deixada secar por 10 minutos em temperatura ambiente. O disco de ertapenem foi posicionado no centro da placa. Uma segunda suspensão, agora composta por colônias do isolado a ser testado, foi inoculada em linha reta, da borda do disco de ertapenem até a periferia da placa. Em uma mesma placa também foram inoculados uma estria do controle negativo, a *K. pneumoniae* ATCC 700603 e outras estrias referentes às amostras teste, cada uma em uma distância aceitável para que não ocorresse interferência nos resultados umas das outras. Após 18 horas, como previsto, formou-se um halo de inibição central, relativo à suscetibilidade da *E. coli* ATCC 25922. Para a interpretação dos resultados, foram consideradas negativas as amostras que não interferiram no diâmetro do halo central. As possíveis positivas corresponderiam àquelas que o crescimento bacteriano se estendesse até bem próximo ao disco de ertapenem (Oliveira & Cardoso 2012).

RESULTADOS

Nas coletas realizadas para esse estudo foram isoladas dezessete amostras de *P. aeruginosa* e Enterobactérias provenientes de mesas de internação, atendimento e cirúrgica, chão, pia, canil e no balde localizado abaixo da mesa de atendimento. Entre os isolados, sete (41,4%) foram identificados como *Enterobacter* spp., quatro identificados

como (23,5%) *K. pneumoniae*, três identificados como (17,6%) *P. aeruginosa*, duas identificadas como (11,7%) *E. coli* e uma identificada como (5,8%) *Serratia* spp.

No Quadro (Quadro 2) relaciona todas as amostras identificadas e o perfil de resistência a partir do teste de difusão em disco com os antibióticos imipenem, ertapenem e meropenem.

Quadro 2: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 17 isolados.

Interpretação do teste de difusão em disco			
Isolados	ETP	IMP	MER
	(Halo/CLSI)	(Halo/CLSI)	(Halo/CLSI)
<i>E. coli</i>	13 mm/R	19 mm/R	29 mm/S
<i>E. coli</i>	29 mm/S	29 mm/S	29 mm/S
<i>Enterobacter</i> spp.	30 mm/S	24 mm/S	18 mm/R
<i>Enterobacter</i> spp.	30 mm/S	30 mm/S	30 mm/S
<i>Enterobacter</i> spp.	24 mm/S	25 mm/S	16 mm/R
<i>Enterobacter</i> spp.	R	24 mm/S	24 mm/S
<i>Enterobacter</i> spp.	R	16 mm/R	20 mm/I
<i>Enterobacter</i> spp.	30 mm/S	24 mm/S	29 mm/S
<i>Enterobacter</i> spp.	19 mm/I	26 mm/S	20 mm/I
<i>K. pneumoniae</i>	29 mm/S	29 mm/S	30 mm/S
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	10 mm/R	16 mm/R	14 mm/R
<i>K. pneumoniae</i>	30 mm/S	30 mm/S	30 mm/S
<i>P. aeruginosa</i>	14 mm/R	24 mm/S	25 mm/S
<i>P. aeruginosa</i>	22 mm/S	30 mm/S	24 mm/S
<i>P. aeruginosa</i>	18 mm/R	25 mm/S	20 mm/I
<i>Serratia</i> spp.	20 mm/I	30 mm/S	20 mm/I

ETP: Ertapenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário; CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

Com a realização do procedimento de triagem realizado com uso da técnica de difusão em disco foi encontrado um total de onze (64,7%) amostras que apresentaram halo inibitório inferior a 22 mm e 23 mm – para o ertapenem e os demais,

respectivamente, a pelo menos um dos antibióticos, sendo sugestivas de KPC, uma vez que a resistência encontrada sugere a presença de enzimas carbapenemases. Dentre as bactérias resistentes estão: três (27,3%) *P. aeruginosa*, uma (9,1%) *E. coli*, duas (18,2%) *K. pneumoniae*, cinco (45,4%) *Enterobacter* spp.. Apenas foi observado perfil de total suscetibilidade em bactérias isoladas na pia do consultório e na balança. Ainda referente ao teste de difusão em disco com carbapenêmicos, o imipenem apresentou maior índice de sensibilidade (76,5%), enquanto o ertapenem apresentou resistência em 52,95% das amostras.

O fenótipo de KPC não foi detectado em nenhuma das amostras uma vez que, o teste de Hodge modificado foi empregado nas onze amostras sugestivas de KPC, selecionadas por meio dos resultados do teste de difusão em disco. O resultado foi negativo para todas as amostras testadas, eliminando a possibilidade de presença de carbapenemases, a partir da detecção fenotípica.

DISCUSSÃO

A presença de bactérias resistentes a carbapenêmicos em clínicas veterinárias sugere a circulação desses patógenos na comunidade, apesar de a maioria dos casos relatados no Brasil serem vinculada a hospitais e pacientes humanos internados em Unidades de Tratamento Intensivo (Dienstmann et al. 2010). A troca de carga bacteriana entre os proprietários e seus animais é ratificada com os dados encontrados nesse trabalho, visto que antibióticos carbapenêmicos não são empregados comumente na clínica veterinária. Logo, os achados podem estar vinculados ao alto número de notificações na rede hospitalar do Distrito Federal, inferindo que esses microrganismos resistentes foram disseminados pela população a partir do surto hospitalar. Para destacar a importância dos achados na Medicina Veterinária, a disseminação de mecanismos de resistência contra carbapenêmicos pode interferir nas opções terapêuticas, já que a resistência a carbapenêmicos está associada também a um alto nível de resistência a cefalosporinas e penicilinas, amplamente empregados na Medicina Veterinária (Spinosa et al. 2006). Pesquisas direcionadas para a detecção de carbapenemases em animais e ambientes veterinários ainda são muito limitadas e a escassez de literatura em relação a dados de perfil de sensibilidade limita a análise comparativa entre os dados encontrados

e os estudos já existentes não abordam todos os locais onde podem estar presentes essas bactérias.

A respeito do teste de difusão em disco, as taxas de suscetibilidade obtidas no presente estudo foram de 76,47%, 52,94% e 47,05%, para o imipenem, meropenem e ertapenem, respectivamente. O imipenem apresentou maiores taxas de sensibilidade e o ertapenem, menores, de forma semelhante também aos estudos dirigidos por Carvalhaes (2009), que utilizou cepas sabidamente portadoras de genes de carbapenemases, onde as taxas de resistência encontradas foram de 93% para o imipenem, 57% para o meropenem e 11% para o ertapenem. Da mesma forma, Dienstmann et al. 2010, encontraram em amostras provenientes de hospitais em Porto Alegre, microorganismos 100% sensíveis ao imipenem, enquanto 78,57% foram suscetíveis ao meropenem e nenhuma amostra ao ertapenem. Esses estudos sugerem que o emprego do ertapenem como opção terapêutica é comprometido pela ação de mecanismos de resistência.

Em relação aos resultados negativos do THM, Livermore et al. (2001) defenderam a ideia de que testes interpretativos, embora sejam amplamente empregados por laboratórios de microbiologia, não são ferramentas de diagnóstico específicas, uma vez que não é possível detectar novos mecanismos de resistência como o mesmo perfil de resistência. Ou seja, no presente estudo, a presença de enzimas carbapenemases das classes A, B e D pode ser descartada, devido ao resultado negativo para todas as amostras, porém outro mecanismo de resistência está presente e não pôde ser detectado pelo THM. Outra hipótese é a suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos atribuída à perda de proteínas da membrana externa, resultando na diminuição da permeabilidade nos canais de entrada dos β -lactâmicos (Poole 2004). Carvalhaes et al. (2009) descreveram a perda de proteínas da membrana externa, denominadas *outer membrane protein* (OMP), em 96% das cepas de enterobactérias produtoras da β -lactamase classe B CTX-M. A perda de porinas é um mecanismo de resistência associado às bactérias gram-negativas, visto que somente gram-negativas possuem membrana externa (Kaczmarek et al. 2006, Livermore et al. 1995).

Uma terceira hipótese é a possibilidade da existência de resultados falso negativos no THM, uma vez que, embora este teste seja considerado altamente eficaz na detecção de carbapenemases das classes A, especialmente do tipo KPC, B e D, em destaque as enzimas OXA-48, foram observados falso negativos em estudo realizado por Girlich et al. (2012). Neste ensaio foi observada a sensibilidade diminuída (50%) do

THM em cepas produtoras das enzimas do tipo NDM-1, em conformidade com os achados de Castanheira et al. (2011), onde onze de quinze amostras produtoras de NDM-1 apresentaram resultado negativo ou fracamente positivo no THM. Dessa forma, é possível que a resistência observada nos antibiogramas realizados esteja ligada à presença de ESBL, como por exemplo, a enzima NDM-1.

A proposição mais aceitável é que o número de amostras testadas não tenha sido suficiente para a detecção desse mecanismo de resistência emergente. Nos Estados Unidos, Shaheen (2013) pesquisou em 944 isolados, oriundos de amostras de cães e gatos, que foram submetidos à análise do perfil sugestivo de presença de KPC. Apenas 100 amostras foram submetidas à Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) e confirmando a presença dos genes pesquisados em somente seis amostras. Também em cães, Stolle et al. (2013) executou um estudo de um total de 1311 amostras de *E. coli* (1175) e *K. pneumoniae* (136), onde foram confirmadas, também por PCR, oito (0,61%) amostras positivas para a presença da enzima (cinco amostras de *K. pneumoniae* e três de *E. coli*). De tal modo, é presumível notar que a detecção, fenotípica ou molecular, de enzimas carbapenemases é difícil, de forma que é imperativa uma alta amostragem para a identificação de positivos.

CONCLUSÃO

Apesar de descartada a presença de carbapenemases nas amostras isoladas nesse estudo, foi possível identificar bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* capazes de inativar a ação dos carbapenêmicos em clínicas veterinárias.

Por conseguinte, a presença de patógenos oportunistas multirresistentes não se encontra somente em clínicas veterinárias, mas também em residências, locais públicos e em produção de animais destinados para alimentação, como já documentado. Sem dúvidas, medidas de controle da disseminação de resistências bacteriana a antibióticos são vitais para um melhor prognóstico do futuro.

REFERÊNCIAS

Alanis A.J. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?.
Archives of Medical Research 36(6):697-705

- Ambler R. P. 1980. The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. London. (Biol.)** 289:321–331. (Apud Livermore 1995)
- Beirão E.M., Furtado J.J.D., Girardello R., Filho H. & Gales A.C. 2009. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 15(1):69-73.
- Brasil. 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica 01/2010**: Medidas para identificação e prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes.
- Bratu S., Landman D., Alam M., Tolentino E. & Quale J. 2005. Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49(2):776-778.
- Bratu S., Brooks S., Burney S., Kochar S., Gupta J., Landman D. & Quale, J. 2007. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Clinical Infectious Diseases** 44(7):972-975.
- Carvalhoes C.G., Picão R.C., Nicoletti A.G., Xavier D.E. & Gales A.C. 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal of antimicrobial chemotherapy** 65(2):249-251.
- Castanheira M., Deshpande L.M., Mathai, D., Bell J.M., Jones R.N. & Mendes, R.E. 2011 Early dissemination of NDM-1-and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 55(3):1274-1278.
- CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22. **Clinical and Laboratory Standards Institute**.
- Cuzon G., Naas T., Demachy M.C. & Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52(2):796-797.
- Dienstmann R., Picoli S.U., Meyer G., Schenkel T. & Steyer, J. 2010. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em

Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 46(1):23-27.

Girlich D., Laurent P. & Nordmann P. 2011. Value of the Modified Hodge Test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology** 50(2):477.

Kaczmarek F.M., Dib-Hajj F., Shang W. & Gootz T.D. 2006. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of blaACT-1 β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 50(10):3396-3406.

Levinson W. & Jawetz E. 1998. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4^a ed. Porto Alegre. Artes Médicas. 415p.

Li G., Wei Q., Wang Y., Du X., Zhao Y. & Jiang X. 2011. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 30(4):575-580.

Livermore D.M. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 8(4):557-584.

Livermore D.M., Winstanley T.G. & Shannon K.P. 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 48(suppl 1):87-102.

Miriagou V., Tzouvelekis L.S., Rossiter S., Tzelepi E., Angulo F.J. & Whichard J. M. 2003. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 47(4):1297-1300.

Monteiro J., Santos A.F., Asensi M.D., Peirano G. & Gales A.C. 2009. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 53(1):333-334.

Naas T., Nordmann P., Vedel G. & Poyart C. 2005. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49(10):4423-4424.

Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Leavitt A., Schwaber M.J., Schwartz D. & Carmeli Y. 2006. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among

- multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 50(9):3098-3101.
- Oliveira S.J. 2000. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. 2^a ed. Ulbra. 237p.
- Oliveira M.V. & Cardoso A.M. 2012. A Importância da Detecção de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases pelo Teste de Hodge Modificado. **NewsLab**.
- Peirano G., Seki L.M., Passos V.L.V., Pinto M.C., Guerra L.R & Asensi M.D. 2009. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 63(2):265-268.
- Pereira P. 2012. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes regiões do Brasil. Tese de Doutorado. **Instituto Oswaldo Cruz**.
- Poole K. 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. **Cellular & Molecular Life Sciences** 61(17):2200-2223.
- Queenan A.M. & Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. 20(3):440–458.
- Quinteira S.M.B. 2005. Eco-epidemiologia de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases com impacto clínico. Tese de doutorado. **Universidade do Porto – Portugal**.
- Rasheed J.K., Biddle J.W., Anderson K.F., Washer L., Chenoweth C., Perrin J., Newton D.W. & Patel J.B. 2008. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. **Journal of Clinical Microbiology** 46(6):2066-2069.
- Rasmussen B.A., Bush K., Keeney D., Yang Y., Hare R., O'Gara C. & Medeiros A.A. 1996. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a classe A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 40(9):2080-2086.
- Santos N.Q. 2004. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto-Enfermagem** 13(SPE):64-70.
- Shaheen B.W., Nayak R. & Boothe D.M. 2013. Emergence of a New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered

from companion animals in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 57(6):2902-2903.

Spinosa H.S., Górnica S.L. & Bernardi M.M. 2006. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan. 4^a ed. 897p.

Stolle I., Prenger-Berninghoff E., Stamm I., Scheufen S., Hassdenteufel E., Guenther S., Bethe A., Pfeifer Y. & Ewers C. 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 68(12):2802-2808.

Villegas M. V., Lolans K., Correa A., Suarez C.J., Lopez J.A., Vallejo M., Quinn J.P. & Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50(8):2880-2882.

Woodford N., Wareham D.W., Guerra B. & Teale C. 2014. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 69(2):287-291.

Yigit H., Queenan A.M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J.W., Steward C.D., Alberti S., Bush K. & Tenover F.C. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** 45(4):1151–1161.