

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM ENTEROBACTÉRIAS

COMPARISON OF METHODS FOR PHENOTYPIC DETECTION OF CARBAPENEM RESISTANCE IN ENTEROBACTERIA

Maria Luiza Machado Teixeira¹ e Bruno Stefanello Vizzotto²

RESUMO

As infecções hospitalares causadas por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) representam um grande problema de saúde pública em todo o mundo, necessitando de detecções rápidas e que reproduzam resultados confiáveis. Este estudo teve por objetivo realizar a comparação entre o Método de Inativação de Carbapenêmico (MIC) e Teste do Disco Combinado (TDC), a fim de avaliar a performance destes métodos, com vistas a estimar a melhor rotina de processamento para a caracterização da resistência bacteriana de Enterobacterias Resistentes aos Carbapenêmicos (ERCs). Assim foram analisados 58 isolados bacterianos por meio do Teste de Disco-Difusão, Disco-Combinado e Método de Inativação de Carbapenem. Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, os isolados mostraram-se resistentes para a maioria dos agentes testados, sendo que no teste empregando Ácido fenilborônico, todas as cepas testadas foram positivas para a produção de carbapenemase, contudo, no teste de inativação de carbapenêmicos, 07 isolados mostraram-se negativos para a mesma detecção, contradizendo os resultados anteriores. A rápida disseminação de KPC necessita de uma detecção rápida e eficaz. O teste de disco-difusão é a principal metodologia para triagem fenotípica, enquanto o teste de inibição de carbapenemases foi considerado uma excelente opção para detecção dessas enzimas, além de apresentar um baixo custo.

Palavras-chave: Inativação de Carbapenêmicos; Inibição de Carbapenemases; KPC.

ABSTRACT

Nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) represent a major public health problem worldwide, requiring rapid detection that reproduces reliable results. This study aimed to compare the Carbapenem Inactivation Method (CIM) and the Combined Disc Test (CDT), in order to evaluate the performance of these methods, with a view to estimating the best processing routine for the characterization of resistance bacteria of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE). Thus, 58 bacterial isolates were analyzed using the Disk-Diffusion Test, Disk-Combined and Carbapenem Inactivation Method. As for sensitivity to antimicrobials, the isolates were resistant to most agents tested, and in the test using phenylboronic acid, all strains tested were positive for the production of carbapenemase, however, in the carbapenem inactivation test, 07 isolates were negative for the same detection, contradicting previous results. The rapid spread of KPC necessitates rapid and effective detection. The disk-diffusion test is the main methodology for phenotypic screening, while the carbapenemases inhibition test was considered an excellent option for detecting these enzymes, in addition to having a low cost.

Keywords: Carbapenem Inactivation; Inhibition of Carbapenemases; KPC.

1 Estudante de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Nanociências - Universidade Franciscana - UFN. E-mail: maria.lmteixeira@ufn.edu.br. ORCID: 0000-0001-8632-6914

2 Professor do curso de Biomedicina - Universidade Franciscana - UFN. E-mail: bvizzotto@ufn.edu.br. ORCID: 0000-0001-6819-4081

INTRODUÇÃO

As Enterobacteriaceae são bacilos gram-negativos, encontrados principalmente no trato gastrointestinal dos humanos como parte integrante da microbiota normal (LAVAGNOLI *et al.*, 2017). Esses microrganismos podem adquirir mecanismos de resistência aos antimicrobianos, como, por meio de enzimas conhecidas como carbapenemases. As carbapenemases ocorrem mais frequentemente em enterobactérias, com maior incidência nos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella* (SEIBERT *et al.*, 2014).

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) causadas por Enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) representam um grande problema de saúde pública mundialmente, sendo de extrema importância para a detecção precoce dos fatores de risco, podendo reduzir a transmissão cruzada de microrganismos nos serviços de saúde (ALVIM; COUTO; GAZZINELLI, 2020). As mãos dos profissionais de saúde são os mais importantes reservatórios para a transmissão de patógenos no ambiente hospitalar, sendo recomendado realizar constantemente a sua higienização (ANVISA, 2013). A disseminação de microrganismos multirresistentes (MDR) podem ser influenciada por fatores como uso excessivo de antibióticos, procedimentos cirúrgicos, próteses médicas, e a capacidade das bactérias de transmitir seu material genético com a informação de resistência aos fármacos (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

As enzimas KPC são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, sendo que, atualmente, são reconhecidas 21 variantes (KPC-2 a KPC-22), onde a variante KPC-1, inicialmente descrita em 1996, em um isolado de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte. Após a primeira identificação ocorreram relatos de uma nova variante, identificada como KPC-2, porém, descobriu-se um erro na sequência descrita originalmente, a KPC-1 e KPC-2 tratavam-se da mesma enzima, prevalecendo à denominação KPC-2. Outra variante da enzima, identificada como KPC-3 em *K. pneumoniae*, causou o primeiro surto em Israel em 2006. As variantes KPC-2 e KPC-3 apresentam maior prevalência no Brasil e no mundo (MIRANDA *et al.*, 2018).

Existem três principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos: degradação enzimática por produção de carbapenemase, expressão de bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade da membrana externa por mutações de porina (DALMOLIN *et al.*, 2017). A bomba AcrAB-ToIC é encontrada em *Enterobacteriaceae* formando um complexo tripartido que abrange a membrana interna, o periplasma e a membrana externa, com a finalidade de expulsar os antibióticos da célula (EICHENBERGER; THADEN, 2019). Mutações apenas em porinas como OmpK35 e OmpK36 geralmente não resultam em resistência aos carbapenêmicos, porém quando presentes em *Enterobacteriaceae* produtoras de AmpC ou CTX-M produzem atividade hidrolítica de carbapenêmicos. A degradação enzimática ocorre por meio de genes localizados em cromossomos e elementos genéticos, como plasmídeos, que codificam para enzimas favorecendo

assim a sua rápida disseminação e a transferência frequente de múltiplos genes de resistência aos antibióticos (RADA *et al.*, 2019).

As técnicas moleculares são referência para confirmar a presença dos genes de resistência, porém nem sempre estão disponíveis na rotina hospitalar, por isso os testes fenotípicos são importantes para auxiliar na detecção primária de diferentes genes de resistência em isolados clínicos (NICOLA; NIEVAS; SMAYEVSKY, 2012). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda realizar o teste de *screening* por disco-difusão com carbapenêmicos, teste de inibidores de carbapenemases, determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e confirmação pela pesquisa do gene *blaKPC* por biologia molecular (ANVISA, 2013). Entretanto, até agora, não há informações suficientes sobre o desempenho relativo desses métodos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar a comparação entre o Método de Inativação de Carbapenêmico (MIC) e Teste do Disco Combinado (TDC), a fim de avaliar a taxa de resposta entre os testes recomendados pelo BrCAST, com vistas a estimar a melhor rotina de processamento para a caracterização da resistência bacteriana a partir de isolados de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs).

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLADOS CLÍNICOS

No presente estudo, foram analisadas 58 cepas clínicas de Enterobactérias produtoras da enzima KPC, previamente caracterizadas por metodologia de Reação em cadeia da polimerase - PCR, pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Franciscana-UFN, isoladas por laboratórios clínicos que prestam atendimento a hospitais de médio porte na cidade de Santa Maria - RS, a partir de pacientes colonizados/infectados em sítios anatômicos diversos. As cepas encontravam-se armazenadas em Caldo BHI + glicerol (20%) à -80°C, a partir de onde foram reativadas por meio de repique em ágar MacConkey (Sigma®) e caldo BHI (Sigma®), em estufa bacteriológica por 24h à 35±2°C. Após recuperação, as cepas foram identificadas a nível de espécie utilizando o sistema API20E (Biomérieux®).

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para confirmação do padrão de suscetibilidade antimicrobiana de cada isolado clínico, foi realizado o teste de disco-difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton com os seguintes discos contendo agentes antimicrobianos: AMP (Ampicilina 30 µg); AMC (Amoxicilina - Ácido clavulânico 30 µg); ATM (Aztreonam 30 µg); CFL (Cefalotina 30 µg); CPM (Cefepima 30 µg); CRO (Ceftriaxona 30 µg);

CTX (Cefotaxima 5 µg); CAZ (Ceftazidima 30 µg); ERT (Ertapenem 10 µg); GEN (Gentamicina 10 µg); IMP (Imipenem 10 µg) e MER (Meropenem 10 µg). As placas foram inoculadas com amostras de cada cepa ajustadas a uma turbidez de 0,5 McFarland. Discos contendo os agentes antimicrobianos foram aplicados na superfície do ágar inoculado, e as placas foram incubadas por 24h à 35±2°C. Os diâmetros das zonas de inibição foram interpretados de acordo com os critérios preconizados pelo BrCast, sendo os microrganismos classificados em Sensível - Dose padrão (S), Sensível - Aumentando exposição (I) e Resistente (R) (BRCAST, 2017).

TESTE DO DISCO COMBINADO (TDC)

Os isolados clínicos foram caracterizados para a produção de carbapenemases por meio do TDC. Este foi realizado utilizando ágar Muller Hinton e discos de Meropenem com e sem a adição de Ácido Fenilborônico (10 µL, 40 mg mL⁻¹). Os discos com e sem AFB foram aplicados na superfície do ágar inoculado, e as placas foram incubadas por 24h à 35±2°C. Foi considerado positivo quando observou-se uma diferença de no mínimo 5 mm no halo formado em volta dos discos contendo o aditivo em comparação a aqueles sem o aditivo (ANVISA, 2013).

MÉTODO DE INATIVAÇÃO DE CARBAPENÊMICOS (MIC)

Da mesma forma, os isolados clínicos também foram testados quanto a sua capacidade de produção de carbapenemase pelo método MIC. O princípio deste método é detectar a hidrólise enzimática por meio da incubação de um carbapenem em uma suspensão bacteriana. Para sua execução foi preparada uma solução contendo 10 µL do microrganismo, coletado com auxílio de alça descartável estéril de 10 µL e 400 µL de água destilada estéril, o material foi vortexado e após foi adicionado um disco de Meropenem 10 µg, sendo a suspensão incubada por duas horas à 35±2°C. Após a incubação, o disco foi removido da suspensão usando uma alça de inoculação, colocado-o em uma placa de ágar Mueller-Hinton previamente inoculada com a cepa *E. coli* ATCC 25922, sendo incubada novamente à 35±2°C por 24 horas (ZWALUW *et al.*, 2015).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A sensibilidade foi calculada e comparada com a caracterização molecular a qual serviu como padrão de referência, e os intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados com a utilização do software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). Foram aplicados Teste Anova e Teste Não Paramétrico de Friedman.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

A resistência aos carbapenêmicos devido a produção de carbapenemases é um problema sério, tornando-se desafiadora do ponto de vista laboratorial, pois a rápida disseminação de produtores de carbapenemase, principalmente entre *Enterobacterales*, exige métodos de detecção confiáveis na rotina. Desta forma, a alta sensibilidade e especificidade em conjunto com um rápido fluxo de trabalho tornaram-se obrigatórios para determinar o tratamento de patógenos e controlar sua disseminação (BARTOLINI *et al.*, 2014). Por esse motivo, no presente trabalho, analisamos dois testes fenotípicos diferentes em relação a sua capacidade de identificar corretamente organismos produtores de KPC, com vistas a fornecer um fluxo de trabalho mais preciso e confiável para a detecção de organismos produtores de carbapenemase em amostras clínicas.

A resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* no Brasil gira em torno de 40%, onde 80% dos isolados são representativos da espécie *K. pneumoniae* (CURY *et al.*, 2020). Em 2013, no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), ocorreu a primeira detecção de KPC, onde 47 isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos, sendo que 29 desses isolados pertenciam à espécie *K. pneumoniae*, 83% das amostras apresentaram resistência a Meropenem (SEIBERT *et al.*, 2014). Em geral, este microrganismo apresenta elevada CIM para carbapenêmicos, principalmente para ERT que é mais vulnerável à hidrólise pela produção de carbapenemases (CURY *et al.*, 2020). Em nosso estudo, na análise de disco-difusão (Tabela 1) para os carbapenêmicos, ERT foi o que mostrou a maior taxa de resistência (100%) para todos os isolados testados, corroborando esta teoria.

No presente estudo, foram analisados 58 isolados de Enterobactérias obtidos de diferentes sítios anatômicos, todos previamente identificados como portadores do gene *blaKPC* por meio de técnica de Reação em cadeia da polimerase - PCR. Diversas técnicas moleculares, como, por exemplo, PCR (Reação em cadeia da polimerase), têm oferecido ótimo desempenho na detecção dessas enzimas, porém, devido ao alto custo muitas vezes são inviabilizadas na rotina hospitalar. Tendo em vista todas essas questões devemos ressaltar a extrema importância da correta detecção dos mecanismos de resistência, a fim de auxiliar no controle da disseminação desses microrganismos, utilizando por exemplo, técnicas de detecção fenotípicas como disco-difusão, método de inibição de carbapenemases, concentração mínima inibitória, entre outros (DALMOLIN *et al.*, 2017). No teste de disco-difusão podemos identificar a quais antibióticos o microrganismo é resistente e a quais ele é sensível, sendo então uma opção para o tratamento deste paciente. Como podemos observar no estudo, os isolados mostraram-se resistentes à maioria dos antibióticos utilizados, incluindo os carbapenêmicos, o que é indicativo da presença de carbapenemases. Dessa forma, foram realizadas as metodologias de Inibição de carbapenemases com AFB e o Método de Inativação de Carbapenêmicos (MIC).

A Tabela 1 demonstra as espécies e o número (n) de isolados analisados, assim como o perfil de sensibilidade avaliado pelo método de disco-difusão. Nela é possível identificar a porcentagem dos isolados que se mostraram resistentes às 5 classes de antimicrobianos testados.

Tabela 1 - Perfil de resistência dos 58 isolados de *K. pneumoniae* (n = 35), *E. coli* (n = 4) e outras Enterobactérias (n = 19) determinado pelo método de disco-difusão.

Agentes	Resistente n (%)			Sensível - Aument. Exp. n (%)			Sensível - D. Padrão n (%)		
	K.pneum.	E.coli	Outros	K.pneum.	E.coli	Outros	K.pneum.	E.coli	Outros
MER	34 (97.1)	4 (100)	16 (84.2)	1 (2.9)	0	3 (15.8)	0	0	0
ERT	35 (100)	4 (100)	19 (100)	0	0	0	0	0	0
IMP	31 (88.6)	4 (100)	14 (73.7)	4 (11.4)	0	4 (21.1)	0	0	1 (5.2)
GEN	24 (68.6)	3 (75)	13 (68.4)	2 (5.7)	0	0	9 (25.7)	1 (25)	6 (31.6)
ATM	35 (100)	4 (100)	19 (100)	0	0	0	0	0	0
CAZ	30 (85.7)	3 (75)	14 (73.7)	2 (5.7)	0	1 (5.2)	3 (8.6)	1 (25)	4 (21.1)
CFL	35 (100)	4 (100)	18 (94.8)	0	0	0	0	0	1 (5.2)
COM	34 (97.1)	4 (100)	18 (94.8)	0	0	1 (5.2)	1 (2.9)	0	0
CTX	31 (88.6)	3 (75)	15 (79)	1 (2.3)	1 (25)	1 (5.2)	3 (8.6)	0	3 (15.8)
CRO	35 (100)	4 (100)	19 (100)	0	0	0	0	0	0
AMC	35 (100)	4 (100)	19 (100)	0	0	0	0	0	0
AMP	35 (100)	4 (100)	19 (100)	0	0	0	0	0	0

Outros: *Enterobacter cloacae*, *Shigella sonnei*, *Providencia rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*. MER: Meropenem; ERT: Ertapenem; IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CFL: Cefalotina; CPM: Cefepemine; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; AMC: Amoxicilina-Ácido Clavulânico AMP: Ampicilina.

De acordo com os valores de *breakpoint* preconizados pelo BrCast para os testes de disco-difusão, pode-se observar que todos os 58 isolados clínicos analisados no estudo apresentaram resistência ao carbapenêmico ERT, ao monobactâmico ATM, e aos agentes da classe das penicilinas (AMC e AMP). Em relação a classe das cefalosporinas, apenas a CRO apresentou 100% de resistência por todos os isolados analisados. A sensibilidade geral do método de disco-difusão em detectar a degradação dos carbapenêmicos envolvida no mecanismo de resistência promovido pela enzima KPC pelos isolados em análise, obtiveram-se os seguintes resultados: ERT (100%; IC: 93.7 - 100), MER (93.1%; IC: 83.5 - 97.2) e IPM (84.5%; IC: 73 - 91.6).

Os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram taxas variáveis de resistência aos carbapenêmicos testados, representadas por 88.6% (IPM), 97.1% (MER) e 100% (ERT). Contudo, nenhum isolado desta espécie apresentou sensibilidade (Sensível - Dose Padrão) a esta classe de agentes antimicrobianos, com 04 cepas (ML03, ML05, ML51, ML57; 11.4%) apresentando perfil sensível - aumentando exposição ao IPM, ressaltando-se que o isolado ML57 demonstrou sensibilidade concomitante à CAZ, CPM, CTX e GEN, além de perfil sensível - aumentando exposição à MER (dados não mostrados). O agente antimicrobiano GEN foi o que apresentou a menor taxa de resistência (68.6%) pelos isolados de *K. pneumoniae*, comparado a todos agentes antimicrobianos analisados. Já os isolados da espécie *E. coli* (n = 4) apresentaram resistência à grande maioria dos agentes testados, com exceção da cepa

ML50 a qual demonstrou sensibilidade à GEN e CAZ e perfil sensível - aumentando exposição à CTX (dado não mostrado).

Em relação às demais espécies identificadas, a grande maioria apresentou 100% de resistência aos agentes testados, com exceção dos agentes antimicrobianos, em ordem crescente de resistência: GEN (68.4%), CAZ e IPM (73.7%), CTX (79%), MER (84.2%), CFL e CPM (94.8%). As menores taxas de resistência aos agentes testados foram apresentadas pelos isolados de *P. vulgaris* (n = 8), principalmente frente aos agentes GEN (n = 5; 37.5%), CAZ (n = 4; 50%) e CTX (n = 4; 50%). O isolado de *P. vulgaris* ML43 apresentou perfil sensível - aumentando exposição aos carbapenêmicos MER e IPM assim como às cefalosporinas CAZ e CPM, ao mesmo tempo que demonstrou sensibilidade à GEN e CTX. Já os isolados de *P. vulgaris* ML41, ML48 e ML56 apresentaram sensibilidade aos agentes GEN, CAZ e CTX, sendo que os isolados ML41 e ML56 ainda apresentaram perfil sensível - aumentando exposição à MER e IPM, respectivamente. Um isolado de *S. liquefaciens* (ML42) apresentou sensibilidade ao carbapenêmico IPM, além dos agentes GEN e CAZ. Os isolados de *P. rettgeri* (ML21) e *E. cloacae* (ML22) apresentaram perfil sensível - aumentando exposição ao IPM, além do isolado de *S. sonnei* (ML08) que apresentou perfil semelhante ao MER (dados não mostrados).

Em estudo realizado com finalidade clínica e epidemiológica acerca de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERCs), foram analisados e identificados os resultados da cultura de ERCs de janeiro de 2015 a dezembro de 2016, sendo em 2015, 1590 Enterobacteriaceae isoladas de amostras clínicas, das quais 5 (0,3%) foram registradas como ERCs, enquanto 1,2% (17) de 1402 isolados de Enterobacteriaceae em 2016 foram ERCs. Os isolados identificados por meio da morfologia do cultivo bacteriano em ágar MacConkey, teste de oxidase e testes bioquímicos básicos, a identificação do gênero bacteriano foi realizada usando sistema Vitek 2® (bioMérieux, Hazelwood, MO, EUA). Foi realizado teste de disco-difusão com confirmação por E-teste, e, também foi realizada metodologia molecular, reação em cadeia da polimerase, para identificar os genes NDM-1, KPC, OXA-48, VIM e IMP. Os resultados mostraram que a maioria (81,8%) dos isolados foram *Klebsiella pneumoniae*, seguida por *Serratia marcescens* (9,1%), *Escherichia coli* (4,5%), e *Citrobacter koseri* (4,5%). Todos os isolados foram resistentes à ampicilina, amoxicilina-clavulonato, ceftazidima, cefepima, cefotaxima, ertapenem, imipenem, meropenem, cefoperazona e ampicilina-sulbactam. Os resultados para gentamicina mostraram que aproximadamente metade dos isolados foram resistentes ao antimicrobiano (MOHAMED *et al.*, 2018).

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASE

Uma vez detectada sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos nos testes de sensibilidade de rotina, os métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases devem ser aplicados. Em nosso estudo, foram comparadas as respostas dos métodos TDC e MIC na confirmação da produção de carbapenemase (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação dos métodos de análise fenotípicos TDC e MIC para a detecção da produção de KPC de acordo com as espécies identificadas.

Isolados	N	TDC		MIC	
		Pos	Neg	Pos	Neg
<i>K. pneumoniae</i>	35	35	0	31	4
<i>E. coli</i>	4	4	0	3	1
Outros	19	19	0	17	2
TOTAL	58	58/58		51/58	
Sensibilidade (%)		100		89,2	
IC 95%		(93.7-100)		(77.1-94)	

N: Número de isolados. TDC: Teste do disco combinado. MIC: Método de inativação de carbapenêmicos.

Pos: Positivo. Neg: Negativo. IC: Intervalo de confiança.

De acordo com a Tabela 2, na análise fenotípica de resistência baseada no TDC, pode-se observar 100% de sensibilidade na detecção dos organismos produtores de KPC. A interpretação do teste foi realizada avaliando-se a presença dos halos de inibição com diferença superior a 5mm em relação ao disco de MER e MER+AFB. O TDC utilizando Ácido Fenilborônico empregado em nosso estudo, apresentou 100% de sensibilidade na detecção da resistência a carbapenêmicos. Este método foi descrito por Coudron em 2005, sendo aplicado para a identificação fenotípica do primeiro isolado produtor de KPC na Grécia, posteriormente através de análises com vários isolados produtores de KPC, observou-se um claro efeito sinérgico entre o AFB e carbapenêmicos, inferindo uma aparente interação da molécula de AFB com o sítio ativo das enzimas KPC de classe A. Segundo Borba e colaboradores (2012) estudos que combinaram imipenem, cefepime e meropenem com AFB mostraram alta sensibilidade e especificidade para detecção de KPC, cujo AFB aumentou de 8 a 11 mm o halo de inibição do meropenem para a maioria dos isolados KPC positivos. O Ácido Borônico e seus derivados (Ácido Fenilborônico e Ácido 3-aminofenilborônico) inibem principalmente carbapenemases do tipo KPC, um estudo realizado por Pasteran e colaboradores (2008) detectou uma sensibilidade de 80 - 100% e especificidade de 79 - 100% para detecção de KPC, utilizando disco de Imipenem, Meropenem e Ertapenem (PASTERAN *et al.*, 2008). Entretanto, o estudo realizado por Tsakris e colaboradores (2009) detectou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 95,3 - 100%.

Por meio do MIC podemos observar que em nosso estudo que 89,2% dos isolados obtiveram um aumento maior do que 5 mm no tamanho do halo. Quando o disco de MER é combinado com AFB, ocorre o bloqueio enzimático da enzima carbapenemase, permitindo com que o antibiótico penetre na parede celular bacteriana e ligue-se às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), resultando na inativação do inibidor de enzimas autolíticas (transpeptidase) na parede celular, levando à morte das bactérias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). O MIC utiliza discos de teste de sensibilidade à antibióticos que estão disponíveis mundialmente, portanto, mais acessíveis aliados a um baixo custo. Os resultados obtidos por meio de teste Anova ($p=0,02$) e teste de Friedman ($p=0,010$), confirmam que existe diferença significativa nos resultados encontrados comparando o teste TDC e teste MIC.

Estudos como o realizado por Zwaluw e colaboradores (2015) demonstraram que o método de MIC não é afetado por mudanças em variáveis como temperatura ou tempo de incubação, fabricante do disco, tempo de cultura ou suspensão bacteriana, tornando-o um método de triagem fenotípico altamente robusto e de baixo custo que pode detectar com segurança a atividade de carbapenemases. O estudo mostrou que o MIC é capaz de detectar a produção de carbapenemases em Gram-negativos, permitindo a distinção entre a resistência a carbapenêmico, devido à atividade enzimática, e permeabilidade reduzida, apresentando alta concordância (100% para *Enterobacterales* e 98,8% para não fermentadores) com o método de PCR para detecção de genes de resistência (ZWALUW *et al.*, 2015). No estudo proposto por Pierce e colaboradores (2017), foi avaliada a eficácia do MIC modificado, os autores realizaram algumas alterações, como, por exemplo, usar TSB (caldo tríptico de soja) em vez de água e estender o tempo de incubação de 2 para 4 horas. De acordo com os autores, 91 dos 92 isolados previamente caracterizados como portadores de genes para carbapenemases foram positivos no experimento (99% de sensibilidade) e todos os 23 isolados caracterizados como não portadores de genes para carbapenemases foram negativos (100% de especificidade) (PIERCE *et al.*, 2017).

Em contrapartida, os resultados demonstrados pela análise fenotípica baseada no MIC indicaram que 7 dos 58 isolados apresentaram resultado negativo na detecção da produção de KPC. A redução na sensibilidade de detecção da produção de carbapenemase deu-se especificamente pelos isolados de *K. pneumoniae* (ML01, ML04, ML06 e ML51), *E. cloacae* (ML22), *P. vulgaris* (ML40) e *E. coli* (ML52), os quais não demonstraram a habilidade de degradar o carbanepêmico MER pela produção da enzima KPC, após breve incubação à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, como preconizado pela metodologia. Todos os isolados citados apresentaram resistência ao MER pelo teste de disco-difusão (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolados demonstrando divergência nas respostas dos métodos fenotípicos de detecção da produção de KPC.

Isolados	Espécie	DD			TDC	MIC
		ERT	MER	IPM		
ML01	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	Pos	Neg
ML04	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	Pos	Neg
ML06	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	Pos	Neg
ML22	<i>E. cloacae</i>	R	R	I	Pos	Neg
ML40	<i>P. vulgaris</i>	R	R	R	Pos	Neg
ML51	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	Pos	Neg
ML52	<i>E. coli</i>	R	R	R	Pos	Neg

DD: disco-difusão. TDC: Teste do disco combinado. MIC: Método de inativação de carbapenemicos. ERT: Ertapenem. MER: Meropenem. IPM: Imipenem. Pos: Positivo. Neg: Negativo. R: Resistente. I: Sensível - Aumentando Exposição.

Neste estudo, alguns isolados que mostraram-se resistentes no teste de disco-difusão e positivos no TDC, apresentaram resultados negativos no MIC. Alguns estudos, como descrito por Soares (2012), mostram que a resistência a carbapenêmicos no antibiograma de *K. pneumoniae* não prediz a presença da enzima KPC, pois outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos. A presença de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) associada a β -lactamases de classe C (AmpC), gera

uma pequena hidrólise de carbapenêmicos e alteração nos canais de porina, modificando a ação e a penetração desses fármacos (SOARES, 2012).

Alguns estudos relatam falhas na identificação de isolados produtores de carbapenemases, apresentando resultados discrepantes para uma variedade de espécies entéricas, incluindo produtores e não produtores de carbapenemases, principalmente frente aos antimicrobianos Imipenem e Meropenem. A falsa sensibilidade em isolados produtores de KPC reportada nesses estudos foi atribuída a variações na densidade do inóculo bacteriano (TENOVER *et al.*, 2006).

O Ertapenem é considerado o carbapenêmico mais sensível na detecção de KPC. Em 2007 Anderson e colaboradores demonstraram que a sensibilidade no método de disco-difusão foi superior a 90%, porém, também é reconhecido que a resistência a esse antimicrobiano não indica necessariamente a produção de carbapenemases, pois a resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer devido a outros mecanismos, como, por exemplo, a alteração das porinas de membranas associadas à produção de ESBL ou AmpC (ANDERSON *et al.*, 2007).

A análise fenotípica foi considerada menos confiável do que a caracterização genotípica na identificação de cepas resistentes à carbapenêmicos, porém, metodologias moleculares têm suas próprias limitações: precisam de equipamentos e reagentes caros, profissionais especializados, primers projetados em regiões de baixa taxa de mutação, e, além disso, o uso de primers específicos impede a identificação de novos genes de resistência, possivelmente relatando resultados falsos negativos (BARTOLINI *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Neste estudo, podemos concluir que os isolados apresentaram um elevado perfil de resistência, visto que esses isolados são de origem hospitalar é de extrema importância a necessidade de mais estudos epidemiológicos de vigilância para tentar controlar a disseminação destes microrganismos no ambiente hospitalar. O teste de disco-difusão continua sendo a principal metodologia de triagem utilizada para detecção fenotípica, porém para a confirmação da resistência enzimática é necessário a utilização de outras metodologias. Como podemos observar no estudo, o teste de Disco-Combinado reproduziu resultados compatíveis com os observados no teste de disco-difusão, apresentando alta sensibilidade e especificidade, sendo considerado uma excelente opção para detecção dessas enzimas, visto que todas as cepas foram analisadas através de metodologia molecular, confirmando a produção de carbapenemase. O Método de Inativação de carbapenêmicos apresentou uma menor similaridade com o teste de disco-difusão em comparação ao teste de Disco-Combinado.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Esta pesquisa apresentou limitações em função de não pesquisar outros mecanismos de resistência a carbapenêmicos, os quais podem interferir com a sensibilidade dos métodos de análise fenotípica.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, K. F. *et al.* Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, 2007.

ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecção por enterobactérias multirresistentes. Brasília, 2013.

ALVIM, A.; COUTO, B. R. G. M.; GAZZINELLI, A. Risk factors for Healthcare-Associated Infections caused by KPC-producing Enterobacteriaceae: a case-control study. **Enfermería Global**, v. 19, n. 2, p. 257-286, 2020.

BARTOLINI, A. *et al.* Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 13, p. 1-11, 2014.

BORBA, C. M. de A. *et al.* Validação do teste de inibição pelo ácido aminofenilborônico para triagem de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 427-433, 2012.

BRCAST, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2017.

COUDRON, P. E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4163-4167, 2005.

CURY, A. P. *et al.* KPC-producing Enterobacterales with uncommon carbapenem susceptibility profile in Vitek 2 system. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 118-120, 2020.

DALMOLIN, T. V. *et al.* Detection and analysis of different interactions between resistance mechanisms and carbapenems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 493-498, 2017.

DIENSTMANN, R. *et al.* Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 37, p. 1-21, 2019.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, n. 3, v. 33, p. 667-679, 2010.

LAVAGNOLI, L. S. *et al.* Factors associated with acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 25, p. 1-7, 2017.

MOHAMED, N. A. *et al.* Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Clinico Epidemiological Perspective. **Tropical biomedicine**, n. 2, v. 35, p. 300-307, 2018.

MIRANDA, I. F. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC: Disseminação mundial e situação atual no Brasil. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, v. 25, n. 2, p. 113-119, 2018.

NICOLA, F. G.; NIEVAS, J.; SMAYEVSKY, J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, n. 4, p. 290-302, 2012.

PASTERAN, F. G. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1178-1180, 2008.

PIERCE, V. M. *et al.* Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2321-2333, 2017.

RADA, A. M. *et al.* Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. **Biomédica**, v. 39, p. 199-220, 2019.

SEIBERT, G. *et al.* Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Klebsiella pneumoniae carbapenemase em um hospital escola. **Einstein**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SOARES, V. M. Emergência de Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251-253, 2012.

TENOVER, F. C. *et al.* Carbapenem Resistance in Klebsiella pneumoniae Not Detected by Automated Susceptibility Testing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1209-1213, 2006.

TSAKRIS A. *et al.* Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing Klebsiella pneumoniae isolates in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 362-367, 2009.

ZWALUW, K. V. D. *et al.* The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. 1-13, 2015.