

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES EM BASTONETESGRAM NEGATIVOS FERMENTADORES DA GLICOSE ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES ATENDIDOS NO HE-UFPEL-EBSERH

RÓGER GIUSTI MILLER¹; LUIZA OLIVEIRA LEMOS MILLER²; VICTOR DOS SANTOS BARBOZA ²; THOBIAS TONIOLO DE SOUZA²; JANICE LUEHRING GIONGO²; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – giustimiller9@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luiza.miller@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas –thobias.toniolo@gmail.com

²Faculdade Anhanguera – janicegiongo@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Segundo definição do *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*, as Beta-lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise de amidos, amidinas e outras ligações C-N, separando a base do substrato.

A primeira classificação para as Beta-lactamases foi proposta por AMBLER (1980), o qual classificou as enzimas de acordo com as suas características moleculares, agrupando-as em quatro classes definidas por letras (A,B,C e D). Posteriormente, BUSH et al. (1995), criaram uma classificação baseada em características funcionais e bioquímicas, dividindo as mesmas em quatro grupos numéricos (1,2,3 e 4) de acordo com seus substratos e sensibilidade aos seus inibidores. As classes A,C e D são Serino Beta-Lactamases e a classe B é conhecida como Metallo-Beta-Lactamase (MBL).

Em bactérias Gram-negativas, o principal mecanismo de resistência aos antibióticos Beta-lactâmicos é a produção de Beta-Lactamases, que são enzimas secretadas no espaço periplasmático dessas bactérias, as quais têm a capacidade de hidrolisar o anel Beta-lactâmico dessa classe de antibióticos, causando a sua inativação (MUNITA; J M, ARIAS; C A, 2015). A diferença no mecanismo de ação é que a classe B necessita de cátions divalentes como co-fator para exercer a sua ação catalítica, na maioria das vezes os íons Zinco (MURPHY, T. A. et al., 2003).

Os genes que causam este tipo de resistência bacteriana podem estar localizados tanto no cromossoma bacteriano (resistência intrínseca), quanto em pequenos pedaços extracromossômicos denominados plasmídeos, os quais podem passar de uma espécie bacteriana para outra (resistência adquirida) (ROSSI,F; ANDRE-AZZI, D., 2005).

Cabe ressaltar que a presença de genes de resistência adquiridos não significa necessariamente que estes genes estão sendo expressos. Em algumas situações, é possível detectar a presença destes genes em amostras sensíveis ao antimicrobiano. Portanto, seus resultados devem ser correlacionados com testes fenotípicos in vitro (ANVISA, 2020).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo inicial a aplicação de dois métodos fenotípicos, um automatizado e outro manual capazes de classificar as Beta-Lactamases presentes nestes isolados bacterianos de acordo com as suas características moleculares, funcionais e bioquímicas baseadas no perfil de substrato e susceptibilidade a inibidores e potencializadores enzimáticos, classificando-as em classes A,B ou D de AMBLER (método automatizado) e KPC, Metallo-Betalactamases e AmpC plasmidial (método manual), para posteriormente confrontá-las com um teste molecular como PCR ou LAMP (Amplificação Isotérmica mediada por Loop) , os quais são considerados o padrão ouro na detecção dos genes que expressam esse tipo de resistência.

1. METODOLOGIA

Foram analisados 80 isolados bacterianos obtidos de diferentes tipos de amostras clínicas oriundas de diferentes unidades hospitalares, bem como de pacientes atendidos nos ambulatórios do HE UFPEL-EBSERH, no período de 18/03/2021 a 18/09/2021.

Como citado na introdução duas metodologias foram utilizadas para classificar os diferentes tipos de Beta-Lactamases: a automatizada, na qual utilizou-se o equipamento Phoenix M50-BD para a detecção das Beta Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e das Carbapenemases das classes A,B ou D de Ambler e um método manual preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para medidas de prevenção e controle de Enterobactérias multirresistentes, conforme NT-01/2013. Para a detecção das ESBL(s) no equipamento Phoenix M50-BD utilizou-se dois painéis o UNMIC/ID-407 para amostras de urina e o NMIC/ID-406 para outros tipos de amostras de bactérias Gram-negativas. Esse método se baseia no bloqueio enzimático por ácido clavulânico em combinação com cefalosporinas de terceira geração (Cefotaxima, Ceftazidima e Ceftriaxona) e na triagem com Cefpodoxima-proxetil isoladamente. Segundo DRIEUX, L, et al (2008) a detecção fenotípica de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) realizada através desta metodologia apresenta uma sensibilidade que varia de 83,5% a 98,8% e uma especificidade de 52,2% a 78% quando todas as *Enterobacterales* são consideradas no cálculo. Já para a detecção das Carbapenemases das classes A, B e D de Ambler utilizou-se um outro painel , o NMIC-501-BD , o qual utiliza Meropenem, Doripenem, Temocilina e Cloxacilina isoladamente e em combinação com diferentes inibidores de carbapenemases. Segundo estudos de CROXATTO A, et al (2020), quanto à classificação este método foi capaz de alocar as carbapenemases nas classes A, B, e D em 81,3% dos casos, com acurácia de 94,6%. É um método que apresenta alta sensibilidade e relativamente baixa especificidade, requerendo métodos confirmatórios adicionais.

O método manual preconizado pela ANVISA fundamenta-se no método de Kirby e Bauer (disco-difusão), com a adição de soluções inibidoras (Ácido Fenilborônico (AFB) e Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)) e soluções potencializadoras (Cloxacilina) aos discos de Imipenem e Meropenem visando a potencialização ou inibição de carbapenemases específicas (KPC, Metallo-Betalactamases ou AmpC plasmidial).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1

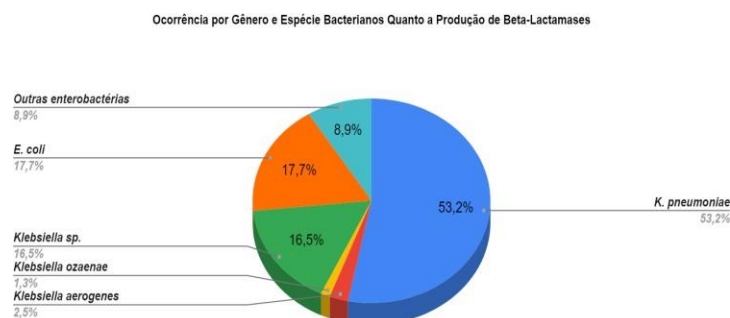
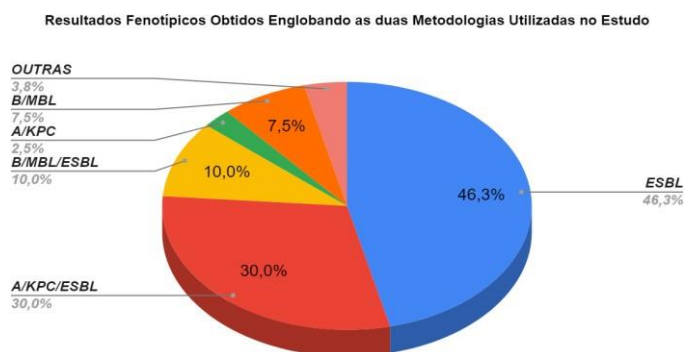


Figura 2



Conforme evidenciado na figura 1, o gênero bacteriano que apresentou o maior percentual de produção de Beta-lactamases foi o gênero *Klebsiella*. De acordo com CASEWELL, M.W., DESAI N. (1983), a predileção por este gênero é explicada devido ao fato de esses organismos apresentarem fatores para sobrevivência maior do que outras enterobactérias em tecidos como pele e superfícies, facilitando a disseminação da infecção de cepas com esse tipo de resistência.

De acordo com a figura 2 podemos evidenciar um maior percentual de produção de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)(46,3%), o que tem uma grande importância clínica, visto que esse mecanismo de resistência é mediado por plasmídeos, facilitando a transmissão horizontal (LIVERMORE D.M.,1995). Além disso, a extensão do espectro de resistência para cefalosporinas de espectro ampliado (3ª e 4ª geração) impõe limites para a utilização de drogas da classe dos beta-lactâmicos, podendo aumentar a prescrição de drogas de amplo espectro como os carbapenêmicos (BUSH K.,1996). Isto de certa forma evidencia ou explica o segundo maior percentual observado no gráfico, que seria de ESBL juntamente com carbapenemases da Classe A(30%), onde se incluiria as KPC(s), as quais podem ter adquirido este tipo de resistência devido a pressão seletiva sofrida devido ao uso exacerbado de antibióticos carbapenêmicos, principalmente durante a pandemia de SARS COV-2. Como terceiro maior percentual observamos as ESBLs, somadas as carbapenemases da classe B(10%), onde se incluiria as Metallo-Beta-Lactamases (MBL) que podem carrear o gene bla NDM, o qual teve o primeiro caso relatado no Brasil em 2013, segundo CARVALHO A. et al. (2013), e a partir de então se espalhou para diversos Estados Brasileiros. Uma das maiores preocupações atuais dos órgãos de controle sanitário é a propagação de bactérias que apresentam a coprodução de carbapenemases (KPC e NDM), o que dificulta bastante

o tratamento dos pacientes infectados. Porém essa coprodução ainda não foi evidenciada pelas duas metodologias utilizadas no nosso estudo.

3. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo conseguiremos fazer uma seleção das principais Beta-Lactamases encontradas na instituição e a partir daí partir para uma segunda etapa do projeto que é a de caracterização genotípica das amostras através da aplicação de um método de LAMP, descrita inicialmente por Notomi e colaboradores (2000), a qual apresenta grande especificidade quando comparada à técnica de PCR convencional e com isso relacionarmos a presença dos genes codificadores desse tipo de resistência com sua expressão.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBLER, R. P. The Structure of β -lactamases. In: Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, **Biological Sciences**. v. 289, n. 1036, p 321-331, 1980.
- ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Saúde. In: Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica. Mód. 10, 2020.
- BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Anti-microbial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.
- CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D.'Alincourt et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.
- CASEWELL, M. W.; DESAI, N. Survival of multiply-resistant *Klebsiella aerogenes* and other Gram-negative bacilli on finger-tips. **Journal of Hospital Infection**, v. 4, n. 4, p. 350-360, 1983.
- CROXATTO, A. et al. Evaluation of the BD Phoenix™ CPO Detect Test for the detection of carbapenemase producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 5, p. 644. e9-644. e15, 2020.
- DRIEUX, L. et al. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 90-103, 2008.
- NOTOMI, Tsugunori et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.
- MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2. 15, 2016.
- MURPHY, T. A. et al. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 2, p. 582-7, 2003.
- BARRETT, A. J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 3: corrections and additions (1995). **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n. 1, p. 1-5, 1996.
- ROSSI F., ANDREAZZI D. **Resistência bacteriana: Interpretando o Antibio-grama**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.