

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias
produtoras de KPC no Brasil**

Leonardo Neves de Andrade

Ribeirão Preto

2011

RESUMO

ANDRADE, L. N. **Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil**. 2011. 68f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) são β -lactamases da classe A de Ambler globalmente disseminadas, com 10 variantes, sendo predominantes KPC-2 e KPC-3. O objetivo deste trabalho foi estudar a genética e epidemiologia molecular de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas no Brasil. Sessenta e quatro enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram analisadas: 57 *Klebsiella pneumoniae* (Kp), 5 *Enterobacter cloacae* (Ecl), 1 *Serratia marcescens* (Sm) e 1 *Citrobacter freundii* (Cf), de diferentes pacientes, em seis hospitais e em duas distintas regiões do Brasil. Identificação e testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados por sistemas semi-automáticos e métodos padronizados. A relação clonal foi estabelecido por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e também por tipagem por sequenciamento de *multilocus* no caso de *K. pneumoniae*. A presença de genes que codificam carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido foi pesquisada. A caracterização de *bla*_{KPC-2}, do ambiente genético e de plasmídeos incluiu PCR e sequenciamento, análises de RFLP, S1-PFGE e hibridação. Os isolados Kp corresponderam a 5 pulsotipos, por PFGE, ligados a 6 tipos de sequência (ST): KPA-ST258 (n = 51 com 6 subtipos), KpA6-ST11 (n = 1), KPB-ST327 (n = 1), KPC-ST44 (n = 2), KPD-ST437 (n = 1) e KPE-ST48 (n = 1). Ecl foram agrupados em clones α e β e, Sm e Cf representam um clone cada. Todos os isolados foram resistentes aos β -lactâmicos, sensíveis à colistina e tigeciclina e mostraram fenótipos variáveis contra aminoglicosídeos, quinolonas, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetoprim. Heterorresistência a carbapenêmicos foi observada para isolados de Kp e Cf, conforme relatado anteriormente com produtores de KPC-2 e VIM. Esse estudo relata a disseminação do gene *bla*_{KPC-2} nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro facilitada por clones de *K. pneumoniae* pertencentes ao globalmente disseminado Complexo Clonal CC258 (ST258, ST437 e ST11) e uma diversidade de plasmídeos (IncFII-KpA, IncN-Kp e Ecl β , IncL/M-Sm e Cf e, dois plasmídeos não-tipáveis carregando Tn4401a ou Tn4401b) disseminados com sucesso entre as enterobactérias. Constitui também a primeira descrição do ST258 no Brasil associada a um surto em um hospital universitário da cidade de Ribeirão Preto. Este trabalho apontou a alta diversidade de elementos genéticos disponíveis abrigando *bla*_{KPC-2}. Isso poderia ampliar enormemente a disseminação desse gene no Brasil como também no continente.

Palavras-chave: KPC, plasmídeo, *K. pneumoniae*, ST258, Tn4401, IncFII, IncN, IncL/M

1. Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos é problema de saúde pública mundial, destacado em 2011 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a qual dedicou o Dia Mundial da Saúde, 7 de abril, ao combate à resistência aos antimicrobianos "...uma ameaça para a atenção aos pacientes e ao controle das doenças em todo o mundo..." (<http://eventos.opasbrasil.org/?tema=DMS> 2011). Segundo a OMS, a resistência aos antibióticos é um grave problema que limita a antibioticoterapia e facilita o aparecimento de "Super Bactérias", resistentes aos principais antibióticos, levando a necessidade de tratamentos novos, mais caros e mais complexos.

Bactérias resistentes a antibióticos estão "se movimentando" entre diferentes ecossistemas, em reservatórios naturais e em meio ambientes modificados, encontrando rotas de transmissão para o homem. Essas bactérias já foram descritas: no trato gastrointestinal (como comensais/opportunistas), no meio ambiente (água e solo), em animais domésticos (cães e gatos), em animais para consumo humano (gado, aves e peixes) e em outros alimentos (vegetais, ovos, leite e derivados). A presença dessas bactérias em diversos ambientes contribui para selecionar, introduzir e manter bactérias envolvidas em infecções humanas. No entanto, o hospital é o principal ambiente onde são isoladas bactérias resistentes a antibióticos. Devido à necessidade de instituição de antibioticoterapia em muitas situações há uma pressão que seleciona bactérias resistentes. Bactérias que anteriormente eram encontradas somente em pacientes hospitalizados, atualmente colonizam e causam infecções em pacientes da comunidade (BAQUERO 1998; BOERLIN; REID-SMITH, 2008; HAWKEY, 2008).

Infecções por bactérias resistentes a antibióticos demonstram aumento significativo na falha de tratamento, morbidade e mortalidade em comparação com infecções por bactérias sensíveis. Esse é um fator crítico para o gerenciamento da terapêutica em pacientes com infecções por essas bactérias (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; QUEENAN; BUSH, 2007).

1.1. Mobilização de genes de resistência

A dinâmica do surgimento e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos envolve diversos fatores que interagem e contribuem para a seleção de bactérias. No entanto, como chave para a evolução bacteriana, talvez, o principal fator seja a impressionante capacidade das bactérias em mobilizar genes de resistência (FROST et al., 2005).

A mobilização de genes de resistência pode ocorrer de uma célula bacteriana para outra (transmissão horizontal), por plasmídeos e transposons mobilizáveis/conjugativos, como também num mesmo genoma (recombinação), por transposons, cassetes gênicos em integrons e sequências de inserção. Esses últimos elementos podem estar inseridos em plasmídeos ou transposons, sendo assim, transferíveis para outras bactérias (BOERLIN; REID-SMITH, 2008).

A resistência aos antibióticos pode ser devida a eventos genéticos, como mutação em genes que passam a conferir resistência e transmissão horizontal de genes de resistência. Embora a mutação tenha papel importante e muitas vezes primordial, a disseminação de genes de resistência por transmissão horizontal é determinante, pois contribui marcadamente para selecionar bactérias com múltiplas resistências (HAWKEY, 2008; SNYDER; CHAMPNESS, 2007).

Elementos genéticos móveis possibilitam a mobilização de múltiplos genes permitindo a sobrevivência de bactérias sob pressão seletiva de antibióticos de diferentes classes (SNYDER; CHAMPNESS, 2007; THOMAS; NIELSEN, 2005).

1.2. Plasmídeos

Como elementos genéticos móveis mais importantes, os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas que possuem capacidade de replicação independente, possuindo como função evolutiva principal a transmissão horizontal de genes entre bactérias, não se limitando à transferência intraespécie (FROST et al., 2005).

Plasmídeos constituem-se de uma região constante que contém os genes responsáveis por funções essenciais como replicação, manutenção e transferência. Em adição, possuem uma região variável onde se localizam os genes responsáveis por funções adaptativas e que conferem vantagens às bactérias, como por exemplo, produção de bacteriocinas, fatores de virulência, e resistência aos antibióticos (CARATTOLI, 2009).

A classificação dos plasmídeos pode ser realizada baseando-se em diferentes critérios: (i) número de cópias na célula, (ii) tamanho do plasmídeo, (iii) faixa de bactérias hospedeiras, (iv) grupo de incompatibilidade e (v) capacidade de transferências entre as células.

Esta última característica permite diferenciar os plasmídeos em conjugativos, mobilizáveis e não-conjugativos. Os conjugativos são assim denominados porque possuem a capacidade intrínseca de se transferir de uma célula para outra, o que foi chamado de “fator F”. Os mobilizáveis não possuem o “fator F”, porém existe a capacidade de transferirem-se à

outra célula na dependência de um plasmídeo conjugativo. Já os não-conjugativos são carentes das características de conjugação e mobilização (FROST et al., 2005).

A classificação mais utilizada é baseada na propriedade universal dos plasmídeos, que é a replicação. Esta classificação utiliza o princípio que plasmídeos com mesmo controle de replicação não podem estar presentes em uma mesma célula, o que foi chamado de "incompatibilidade de plasmídeos" (DATTA; HEDGES, 1971). Com base nessa informação, plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc) não podem ser propagados em uma mesma linhagem celular (DATTA; HUGHES, 1983).

Couturier et al. (1988) desenvolveram a identificação dos principais *replicons* de plasmídeos presentes em bactérias da família *Enterobacteriaceae* baseado em experimentos de hibridação com sondas de DNA que reconhecem diferentes *replicons* (*rep*) (CARATTOLI et al., 2005).

Carattoli et al. (2005) propuseram a detecção de plasmídeos baseada em amplificação de segmentos específicos do DNA plasmideal (pDNA), para pesquisa de *rep* responsáveis pelos principais grupos Inc de plasmídeos que circulam entre enterobactérias. Essa proposta tem sido ferramenta importante para investigar plasmídeos carreando genes de resistência e também para seguir a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes (CARATTOLI, 2009).

Plasmídeos que conferem resistência a antibióticos foram inicialmente descritos em 1960 por Watanabe e Fukasawa (1960) e foram detectados em *Shigella flexneri* multirresistentes isoladas no Japão no início da década de 1950, sendo demonstrado pouco depois sua transmissibilidade entre bactérias. Posteriormente crescentes relatos relacionaram a disseminação de genes de resistência por plasmídeos, de diferentes tamanhos e origens, em bactérias gram-negativas e gram-positivas, no hospital, na comunidade e em outros ambientes, por todo o mundo.

1.3. β -lactamases

Como artifício de escape da atividade dos antibióticos, as bactérias possuem mecanismos de resistência diversos, como: (i) alteração na permeabilidade da membrana externa que dificulta ou impede a entrada do antibiótico na célula, (ii) hiperexpressão de bombas de efluxo que excretam o antibiótico da célula, (iii) alteração do sítio alvo que dificulta ou impede a ligação do antibiótico e (iv) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico (TENOVER, 2006).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, sendo a produção de enzimas, denominadas β -lactamases, de grande interesse em enterobactérias. Essas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando, assim, a ação de vários antibióticos pertencentes a esse grupo (BUSH; FISHER, 2010).

As β -lactamases são classificadas utilizando diferentes critérios. As classificações mais difundidas são baseadas essencialmente na estrutura molecular, proposta por Ambler (1980) e, nas características enzimáticas, propostas por Bush, Jacob e Medeiros (1995).

Ambler (1980) dividiu as β -lactamases nas classes moleculares (A, B, C e D), de acordo com a estrutura molecular da proteína (enzima), sendo assim, conhecida como classe molecular de Ambler. As enzimas pertencentes às classes A, C e D, são seria- β -lactamases, as quais possuem um aminoácido serina no centro ativo da enzima. As enzimas da classe B são metalo- β -lactamases (MBL), as quais são dependentes de zinco (Zn^{+2}), como cofator para a atividade enzimática.

Bush, Jacob e Medeiros (1995) estabeleceram diferentes grupos de β -lactamases (grupos de 1 a 4, com subdivisões), segundo o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de β -lactamases, conhecidos como grupos de Bush.

O esquema de classificação baseado na associação da classe molecular de Ambler e grupos de Bush foi recentemente revisado e atualizado por Bush e Jacob (2010), resumidamente apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das principais β -lactamases produzidas por enterobactérias

Grupo Bush-Jacob ⁱ	Classe Molecular ⁱⁱ	Enzimas representativas	Característica ⁱⁱⁱ	Substratos ^{iv}	Inibição por:	
					Ácido clavulânico	EDTA ^v
1; 1e	C	CMY-2; CMY-37	AmpC	Cfs	Não	Não
2be	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M-2, 14, 15	ESBL	Oxiamino-Cfs e monobactams	Sim	Não
2bre	A	TEM-50	IRT-ESBL	Oxiamino-Cfs e monobactams	Não	Não
2de; 2df	D	OXA-11, 15; OXA-23, 48	ESBL; Carbapenemase	Oxiamino-Cfs e carbapenêmicos	Variável	Não
2f	A	GES-2, KPC-2, 3	Carbapenemases	Oxiamino-Cfs, cefamicinas, monobactams e carbapenêmicos	Variável	Não
3a	B (MBL)	SPM-1, IMP-1, VIM-1, NDM-1	Carbapenemases	Oxiamino-Cfs, cefamicinas e carbapenêmicos, mas não monobactams	Não	Sim

ⁱBush e Jacob (2010); ⁱⁱAmbler (1980); ⁱⁱⁱESBL (do inglês, Extended Spectrum β -Lactamase): β -lactamase de espectro estendido; IRT: TEM resistente a inibidor; MBL (Metallo- β -lactamases); ^{iv}Cfs: Cefalosporinas; Oxiamino-Cfs: Cefalosporinas de amplo espectro; ^vEDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*): ácido etilenodiamino tetra-acético.

Giske et al. (2009) propuseram um esquema alternativo de classificação de β -lactamases baseado na atividade hidrolítica das enzimas frente às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos. Os autores dividiram as β -lactamases em três grupos: ESBL_A, ESBL_M e ESBL_{CARBA}, com diferentes subclasses, de acordo com as características fenotípicas (potencial de: hidrólise e inibição das enzimas), genotípicas (localização: cromossomo ou plasmídeo) e epidemiológicas (prevalência e incidência). Essa classificação foi proposta, principalmente, para resumir o fenótipo de resistência demonstrado, melhorar o entendimento clínico e facilitar o controle epidemiológico.

Nos últimos 60 anos, o uso sucessivo de novas gerações de antibióticos β -lactâmicos tem selecionado sucessivas gerações de β -lactamases, cada qual com espectro de hidrólise mais potente que a anterior (LIVERMORE; WOODFORD, 2006), somando, atualmente, mais de 920 enzimas conhecidas (JACOB, 2006; <http://www.lahey.org/studies/>).

1.4. Carbapenemases

A partir do final da década de 1980, os antibióticos β -lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, como imipenem (1987), meropenem (1996) e ertapenem (2001), foram

instituídos como alternativas terapêuticas de última escolha para tratamento de infecções graves provocadas, principalmente, por bactérias gram-negativas multirresistentes produtoras ESBL, como também pelas hiperprodutoras de β -lactamases AmpC (SHAH, 2008).

Estáveis à hidrólise por essas enzimas, os carbapenêmicos ainda apresentavam o mais potente e excepcional espectro de atividade antibacteriana, agindo contra a maioria das bactérias gram-negativas e gram-positivas, aeróbias e anaeróbias (ZHANEL et al., 2007).

A dependência da utilização de carbapenêmicos está crescendo pelo fato de muitas bactérias gram-negativas produtoras de ESBL, como também as hiperprodutoras de AmpC, serem resistentes a antibióticos não β -lactâmicos, como aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina, quinolonas e fluoroquinolonas (PATERSON; BONOMO, 2005).

Com o uso e abuso de carbapenêmicos, não surpreendentemente, a seleção e disseminação de bactérias resistentes a esses antibióticos ocorreu. Entre outros mecanismos, a resistência é devida à produção de enzimas, denominadas "carbapenemases" (GUPTA et al., 2011; WALSH, 2010).

As carbapenemases constituem o grupo mais versátil de β -lactamases, com espectro de atividade mais amplo que as ESBL. Embora conhecidas como "carbapenemases", esse grupo de enzimas hidrolisa praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, com destaque para a classe dos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007).

Inicialmente, as carbapenemases foram descritas como β -lactamases codificadas somente por genes cromossômicos em algumas espécies bacterianas, como L1 em *Stenotrophomonas maltophilia* e BcII em *Bacillus cereus* (GARAU; GUILMI; HALL, 2005). No entanto, na década de 90, foram relatados genes codificadores de carbapenemases em plasmídeos. Atualmente, as carbapenemases adquiridas, codificadas por genes plasmídeos, têm sido frequentemente reportadas em bactérias gram-negativas, possuindo importante papel na disseminação da resistência aos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007).

Bactérias produtoras de outras enzimas (não carbapenemases) como ESBL CTX-M, TEM, SHV (PATERSON; BONONO, 2005) e hiperprodutoras de β -lactamases AmpC CMY, ACT, FOX (JACOB, 2009), entre outras, podem apresentar diminuição de sensibilidade ou resistência aos carbapenêmicos quando ocorrer associação com outros mecanismos, como hiperexpressão de sistemas de efluxo ou alteração na permeabilidade da membrana externa (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

1.4.1. Metallo-carbapenemases

Bactérias produtoras de metallo-carbapenemases, MBL, são resistentes a todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam (CORNAGLIA et al., 2007; WALSH, 2005). São conhecidas nove famílias de MBL adquiridas: IMP (Imipenemase) (OSANO et al., 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et al., 1999), SPM (São Paulo metallo- β -lactamase) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al., 2005), AIM (Austrália Imipenemase) (YONG et al., 2007), KHM (Kyorin University Hospital Metallo- β -lactamase) (SEKIGUCHI et al., 2008), DIM-1 (Dutch Imipenemase) (POIREL et al., 2009) e NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) (YONG et al., 2009).

As MBL mais relatadas são IMP e VIM, disseminadas mundialmente. SPM é de destaque no Brasil, uma vez que, por motivos ainda não muito bem conhecidos, essa enzima é quase restrita (endêmica) ao território brasileiro, detectada frequentemente em *P. aeruginosa*. Relato dessa enzima ocorreu na Europa, por turista suíço que regressou do Brasil, não ocorrendo disseminação (QUEENAN; BUSH, 2007). NDM, a mais recente MBL relatada, se disseminou rapidamente da Índia para a Inglaterra, outros países da Europa e para os Estados Unidos. Existe uma relação muito estreita do chamado "turismo médico" na Índia, infecção/colonização dos pacientes com bactérias produtoras de NDM e disseminação dessas nos países de origem (PITOUT, 2010).

Os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} são encontrados, em sua maioria, como cassetes gênicos em integrons; *bla*_{SPM} não está associado com integron e sim com uma sequência de inserção (*ISCR4*); *bla*_{NDM} foi localizado em ambientes genéticos que também carregavam genes de fatores de virulência presentes em plasmídeos de diferentes tamanhos (WALSH et al., 2005).

1.4.2. Serina-carbapenemases

As serina-carbapenemases mais disseminadas são: OXA, carbapenemases da classe D de Ambler (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006), GES (Guiana-extended spectrum) (POIREL et al., 2001) e KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) (YIGIT et al., 2001). GES e KPC são carbapenemases da classe A de Ambler (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007).

As carbapenemases OXA e GES são derivadas de genes codificadores de ESBL. Os genes *bla*_{OXA} e *bla*_{GES} têm sido encontrados como cassetes gênicos em integrons, transposons

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

