

## **XIII Simpósio Estadual de Infecção Hospitalar**

### **Plano para Eliminação de Bactérias Multirresistentes nos hospitais do estado de São Paulo**

#### **Mesa II – Plano Estadual para eliminação de bactérias multirresistentes**

#### **O papel do laboratório de microbiologia no controle de bactérias multirresistentes**

**Doroti de Oliveira Garcia  
Pesquisadora científica VI  
Instituto Adolfo Lutz**



Principais micro-organismos multirresistentes a serem monitorados (prevenção, detecção e controle de surtos):

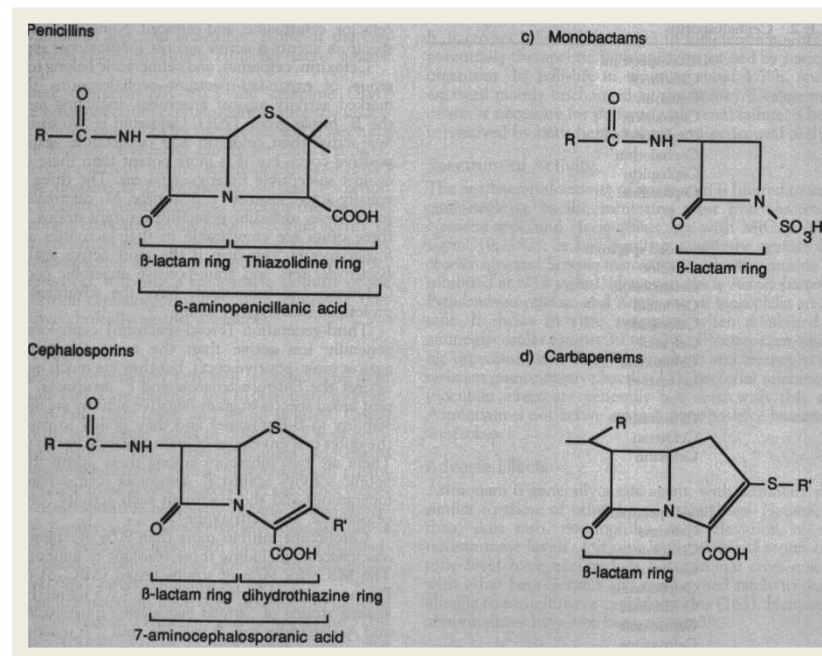
- Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC)
- *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp resistentes aos carbapenêmicos
- MRSA e VRE



# $\beta$ -lactâmicos – atuam na parede celular

## Anel $\beta$ -lactâmico

- Penicilinas
- Cefems
- Monobactâmicos
- Carbapenêmicos  
(Ertapenem, Imipenem, Meropenem)



# Mecanismo de ação dos $\beta$ -lactâmicos

$\beta$ -lactâmicos



Atravessam a Porina – parede celular



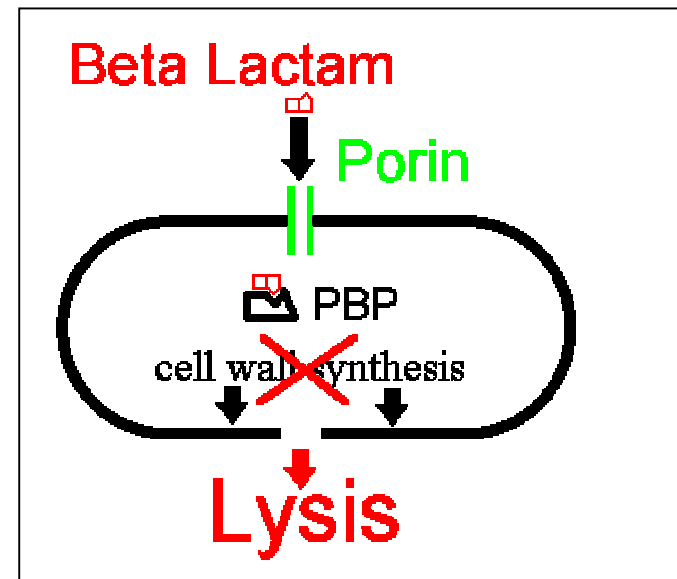
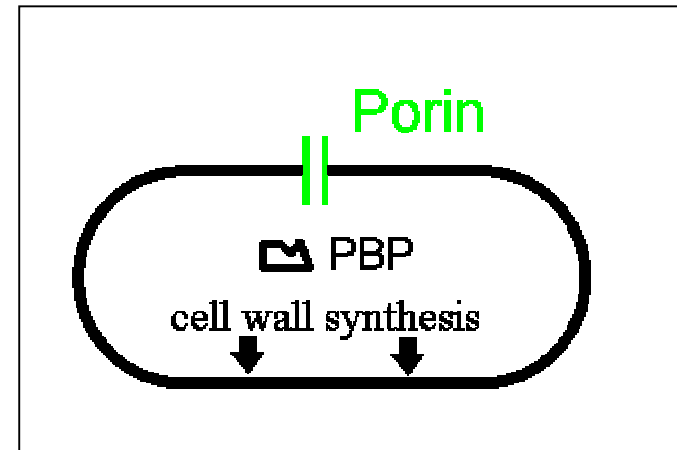
Ligam-se às PBPs\* – espaço periplasmático



Inibem a síntese da parede celular

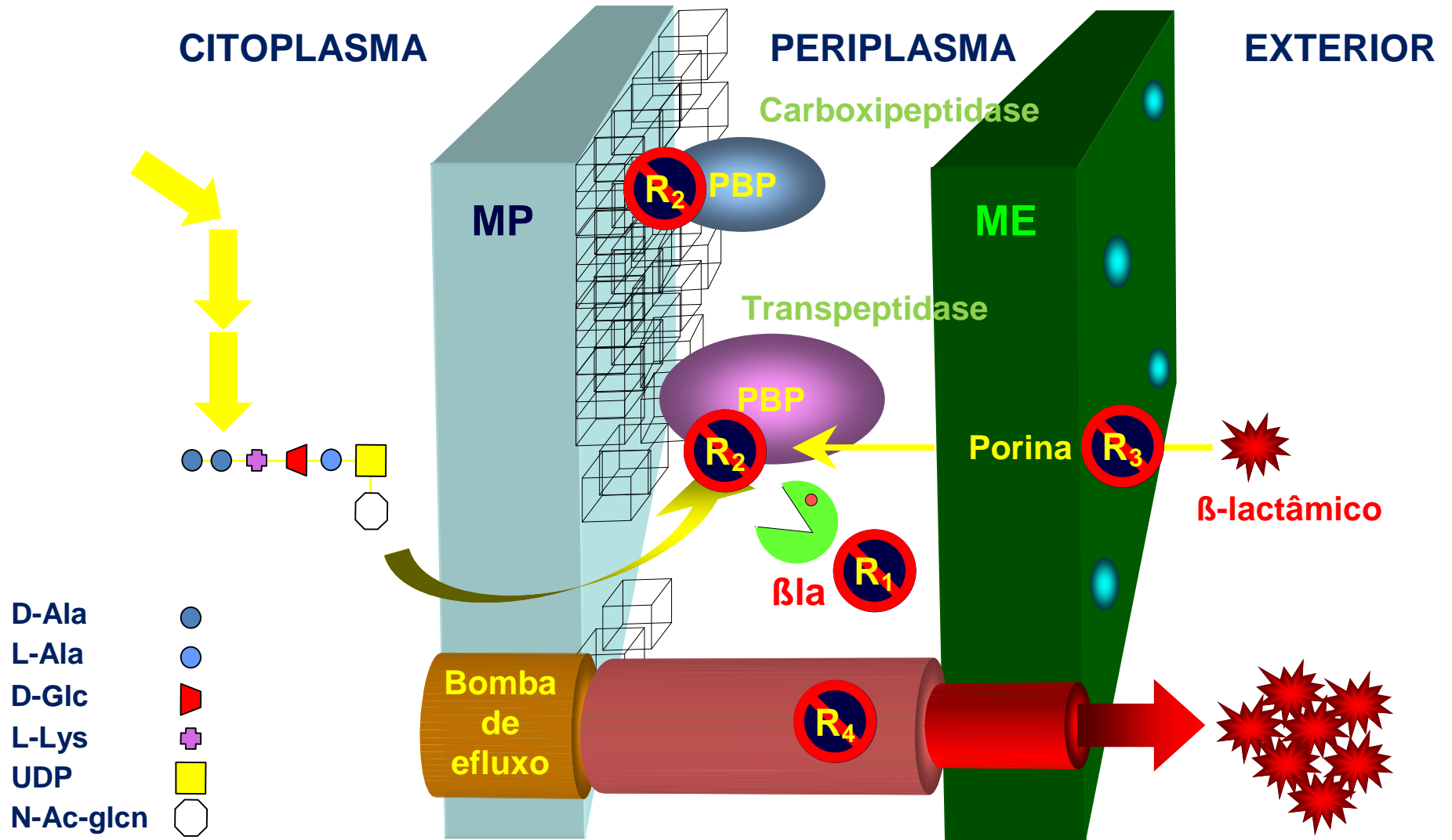


Lise celular



\* - responsáveis pelo transporte de peptídeos para a síntese proteica

## Mecanismos de ação e resistência a antibióticos $\beta$ -lactâmicos



# Bacilos Gram-negativos - Resistência aos $\beta$ -lactâmicos



Produção

de

$\beta$ -lactamases

Enterobactérias

ESBL

No Brasil:

até



Carbapenemases:

- KPC - a partir de 2009
- MBLs (NDM\*) - a partir de 2011 (ALERTA)
- OXA-48 - a partir de 2013

\* New Deli Metalo- $\beta$ -lactamase

Carbapenemases:

- MBLs (SPM, IMP) – *Pseudomonas aeruginosa*
- OXA-23 e OXA-143 – *Acinetobacter baumannii*

BGN-Não

Fermentador

## Classificação de $\beta$ -lactamases, segundo Ambler e Bush

Ambler <sup>1</sup>	BJM <sup>2</sup>	Características
<b>C</b>	1	Cefalosporinases não inibidas por ác. clavulânico
	2a	Penicilinases inibidas por ác. clavulânico
<b>A</b>	2b	$\beta$ -lactamases de amplo espectro
	2be	ESBL - inibidas por ác. clavulânico
	2c	Carbenicilinases - inibidas por ác. clavulânico
<b>D</b>	2d	Oxacilinases
<b>A</b>	2e	Cefalosporinases inibidas por ác. clavulânico
	2f	Carbapenemases: Não MBLs (KPC)
<b>B</b>	3	MBLs – NÃO inibidas por ác. clavulânico (IMP, SPM, NDM)
<b>ND</b>	4	Penicilinases não inibidas por ác. clavulânico

A, C e D– utilizam serina para a hidrólise do  $\beta$ -lactâmico

B – requer íons zinco divalentes para a hidrólise do substrato

<sup>1</sup> – Molecular (Ambler RP. PTRLB 289: 321-31, 1980)

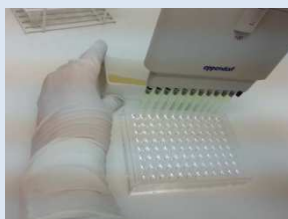
<sup>2</sup> – Funcional (Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. AAC 39: 1211-33, 1995)

**Carbapenemases**

## Screening inicial para a detecção de carbapenemases

### Testes de sensibilidade aos antimicrobianos:

Disco- difusão, CIM (microdiluição, agar-diluição e Etest) ou Métodos Automatizados



**Resistência ou sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos**

MEM e IPM  $\leq 19$  mm - R (CLSI)

ETP  $\leq 21$  mm – R (NT 01/2013, ANVISA)





# Leitura e interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

## NOTA TÉCNICA Nº 01/2013

MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE  
INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS  
MULTIRESISTENTES.

Brasília, 17 de abril de 2013

### PARA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

A identificação de uma enterobactéria resistente aos carbapenêmicos já deve levar a adoção de medidas específicas de acordo com a epidemiologia local.

Utilizar os critérios interpretativos para avaliação da sensibilidade de enterobactérias contidos no item C da Nota Técnica nº 01/2013 da ANVISA, em sua Tabela 1:

[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)

Tabela 1 – Critérios interpretativos a serem utilizados em substituição/complementação àqueles definidos nos documentos do CLSI para testes de sensibilidade de enterobactérias

Antimicrobiano	CIM			Disco-Difusão			
	Sensível (µg/mL)	Intermediário (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Potência do disco (mg)	Sensível (mm)	Intermediário (mm)	Resistente (mm)
Aztreonam	≤ 1	2-4	≥ 8	30	≥ 24	21-23	≤ 20
Cefepima	≤ 1	2-4	≥ 8	30	≥ 24	21-23	≤ 20
Ceftazidima <sup>A</sup>	≤ 1	2-4	≥ 8	10 <sup>A</sup>	≥ 22 <sup>A</sup>	19-21 <sup>A</sup>	≤ 18 <sup>A</sup>
Ertapenem	≤ 0,5	1	≥ 2	10	≥ 25	22-24	≤ 21
Colistina ou Polimixina B	≤ 2	–	≥ 4	– <sup>B</sup>	–	–	–
Tigeciclina	≤ 1	2	≥ 4	15	≥ 18 <sup>C</sup>	15-17 <sup>C</sup>	≤ 14 <sup>C</sup>

•A concentração do disco difere daquele usualmente comercializado pela maioria dos fabricantes.

•O método de Kirby-Bauer (disco-difusão) não é adequado para a avaliação da susceptibilidade às polimixinas.

•Os critérios interpretativos para tigeciclina, quando testada pelo método de Kirby-Bauer, estão disponíveis apenas para *E. coli*. Para outras espécies bacterianas deve ser determinada a concentração inibitória mínima. A tigeciclina tem atividade reduzida contra enterobactérias dos gêneros *Morganella*, *Providencia* e *Proteus*.

**DETECÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES**

**BASEADA NA ESTRUTURA FUNCIONAL DAS BETA-LACTAMASES**

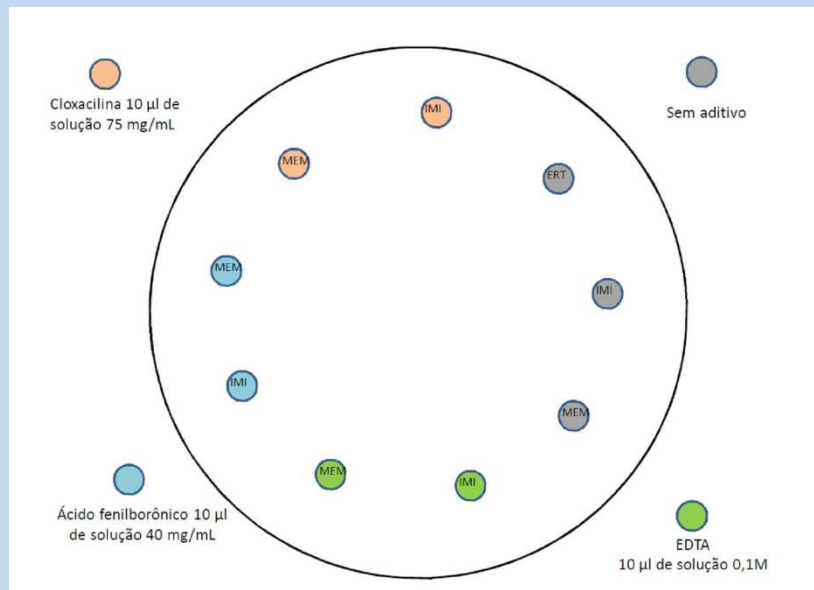
<b>Classificação da enzima (Ambler/BJM)</b>	<b>Principais Enzimas</b>	<b>Micro-organismos</b>
<b>Classe A – grupo 2</b>	<b>AmpC, KPC</b>	<b>Fam. <i>Enterobacteriaceae</i></b>
<b>Classe B – grupo 3*</b>	<b>NDM, SPM, IMP</b>	<b>Fam <i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i></b>
<b>Classe D – grupo 2</b>	<b>OXA (OXA-23, OXA-48)</b>	<b><i>Acinetobacter</i> Fam <i>Enterobacteriaceae</i></b>

\* Metallo-beta-lactamases – possuem íons Zn<sup>++</sup> na estrutura da enzima – utilizado como cofator para a atividade da enzima

# SCREENING INICIAL PARA A DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES

## TESTES FENOTÍPICOS PARA A DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES

### 1) Nota Técnica 01/2013 da ANVISA – testes com inibidores/potenciadores de beta-lactamases



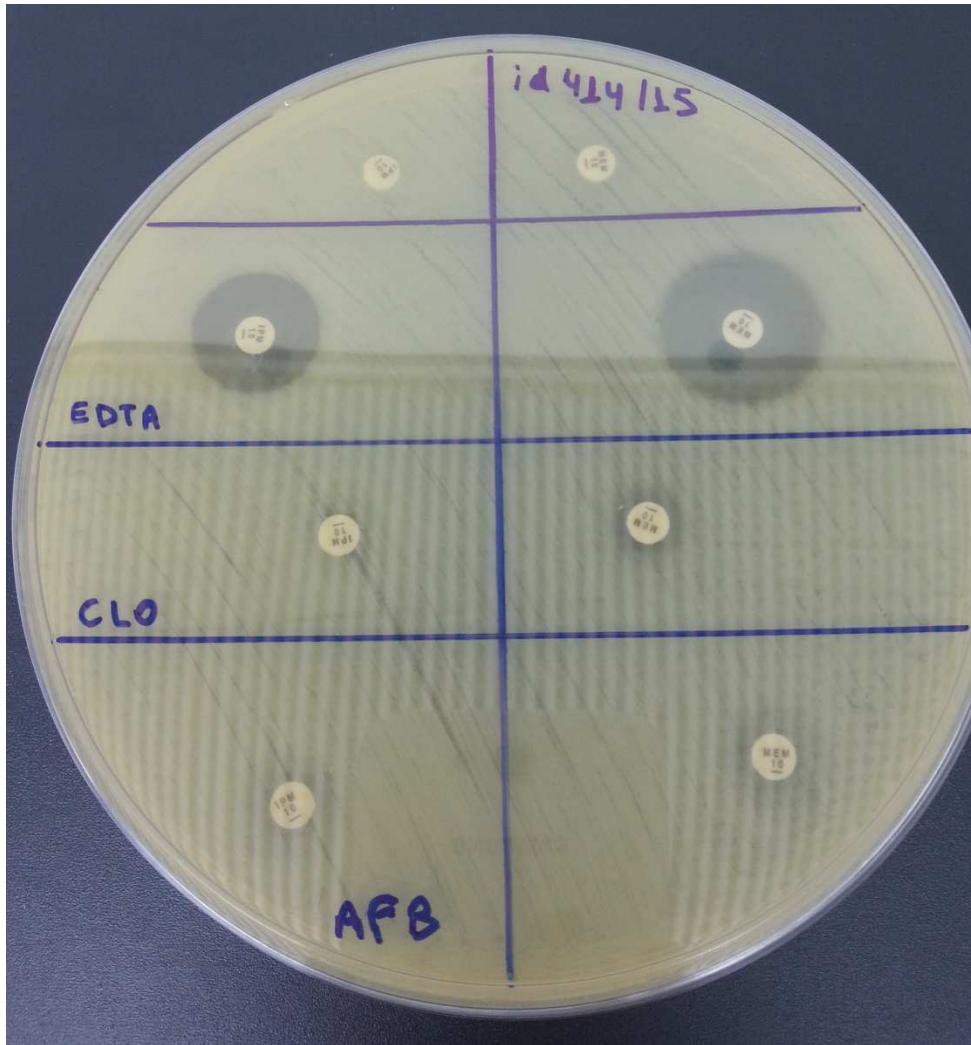
KPC – inibida pelo AFB

MBL – inibida pelo EDTA

AmpC – potencializada pela cloxacilina



1) Nota Técnica 01/2013 da ANVISA – testes com inibidores/potenciadores de beta-lactamases



***Providencia rettgeri***

IPM – 6 mm

MEM – 6 mm

IPM + EDTA = diferença > 5 mm  
em relação ao IPM sozinho

MEM + EDTA = diferença > 5 mm  
em relação ao IPM sozinho

**MBL Positivo**

Insumos *in house* ou comercial (CECON)

## 2) Métodos colorimétricos

### CARBA-NP

Detecção da hidrólise do carbapenêmico

Alça bacteriana (10 microlitros)  
ressuspensa em tampão B-PERII

↓ Vórtex + incubação - TA/30 min

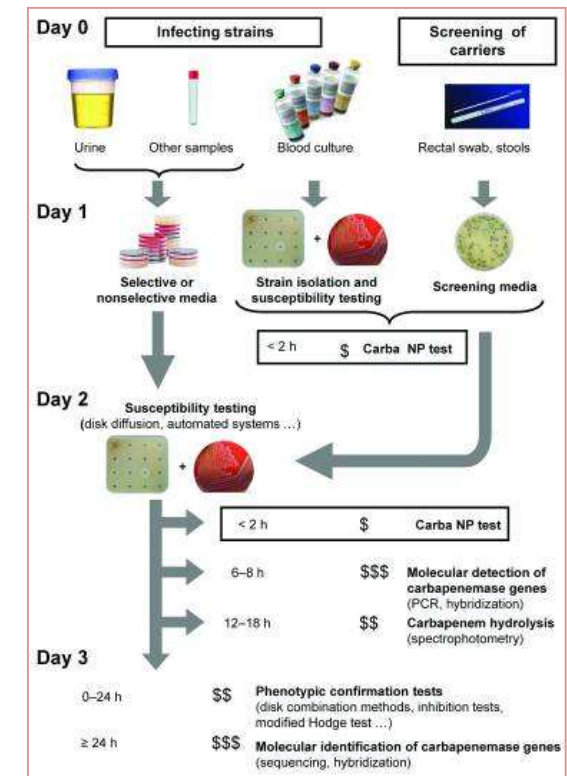
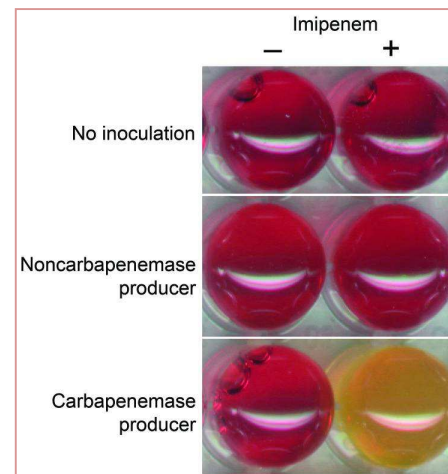
Centrifugação 10.000 g/5 min



Sobrenadante (30 microlitros) + Sol.  
Vermelho de fenol + imipenem

↓ Incubação a 37°C até 2 h

Leitura do teste



### 3) Métodos colorimétricos

#### Blue-CARBA

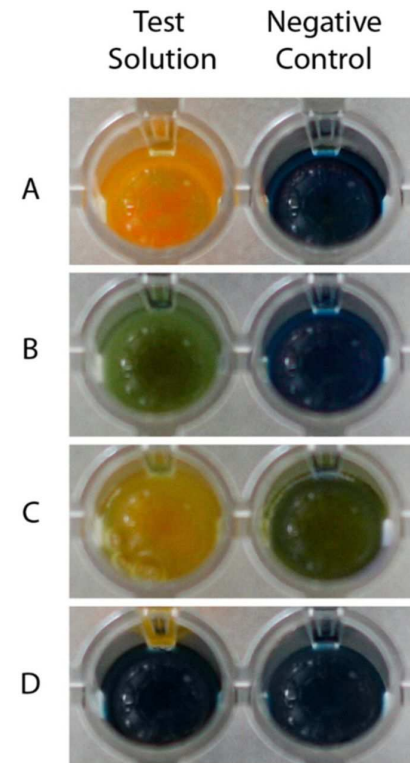
Detecção da hidrólise do carbapenêmico

Indicador: azul de bromotimol

Substrato: Imipenem

Massa bacteriana: uma alçada, correspondendo a 5 microlitros

Incubação com agitação a 37°C por 2 horas



Representative results of the Blue-Carba test obtained from carbapenemase producers (A, B, and C) and non-carbapenemase producers (D) with test solution (left) and negative control solutions (right).

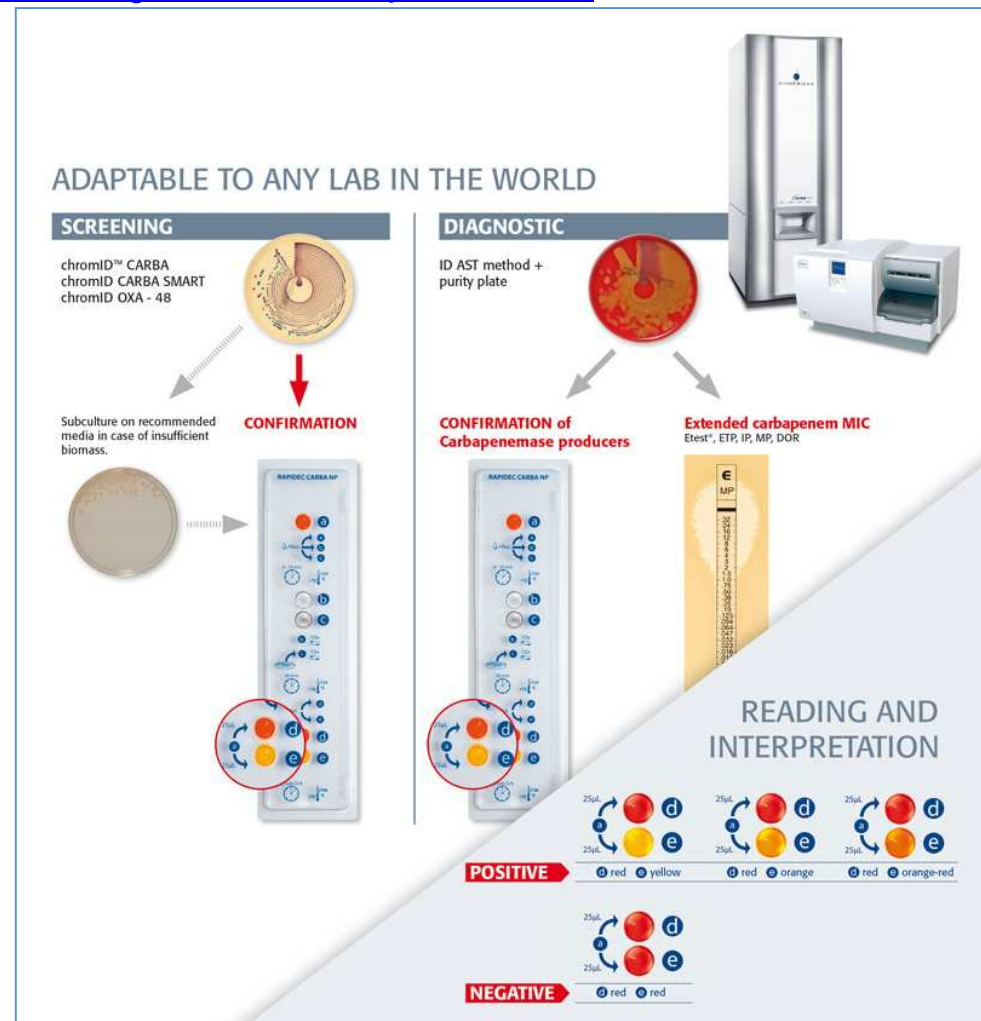
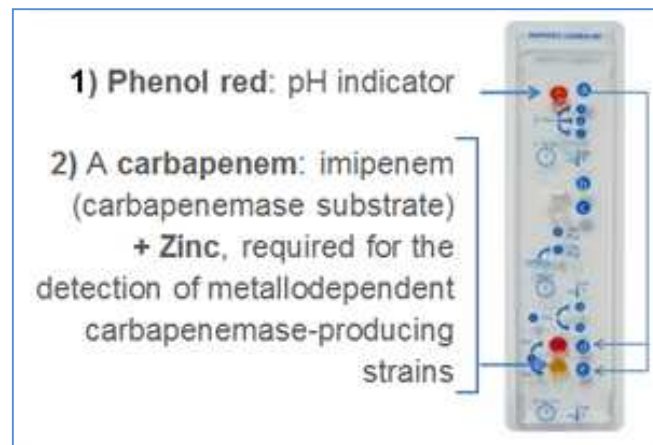


## 4) Métodos colorimétricos

### RAPIDEC® CARBA NP

The ready-to-use RAPIDEC® CARBA NP kit contains all you need to conduct the test in a few easy steps. After bacterial lysis, which enables the extraction of the enzyme, the lysate is added to a detection solution which contains... - See more at: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/rapidec-carba-np#sthash.UFDW1TvM.dpuf>

After incubation, readings are done by visually comparing a control well, starting at 30 minutes, and after no more than 2 hours.



## 5) Carbapenembac e Carbapenembac Metalo



### CARBAPENEMBAC METALO®

#### Indicação:

O produto destina-se a identificação rápida de bactérias produtoras de metalocarbenemases, quando usadas em conjunto com as fitas Carbapenembac®. As fitas possuem em sua composição carbapenêmicos em concentração adequada para que as enzimas (carbapenemases) provoquem a hidrólise destes compostos. A pesquisa de cepas produtoras de metalocarbenemases deve ser feita em cepas que deram resultado positivo com as fitas de Carbapenembac®.

**Composição:** Fitas: Solução de Carbapenêmicos, Agente Revelador e Água Deionizada; **Solução de Iodo Especial:** Iodo, Iodeto de potássio e Água Deionizada e **Solução EDTA.**

#### Procedimento:

**Preparo do Inóculo:** - Retirar a fita do frasco com auxílio de uma pinça flambada e fria e colocá-la no interior de uma placa de Petri vazia.

- Suspender<sup>(1,2)</sup> o equivalente a turvação 10 na escala de McFarland no tubo de Solução EDTA.

**Inoculação:** - Aplicar com auxílio de uma micropipeta 150 µL da suspensão na fita Carbapenembac Metalo®.

- Incubar entre 35° e 37° por 60 minutos a fita dentro de uma placa de Petri tampada.

**Leitura:** - Retirar a placa da estufa e colocar sobre a fita, com auxílio de uma micropipeta, 200 µL da Solução de Iodo Especial. A fita adquirirá uma cor roxa. Tampar a placa e manter a temperatura ambiente.

- Entre 15 a 20 minutos à temperatura ambiente, nas fitas embebidas com cepas carbapenemases positivas, aparecerá inicialmente nas bordas uma cor amarela esbranquiçada, o que indica hidrólise dos carbapenêmicos presentes na fita. A hidrólise será evidenciada até sumir quase totalmente a cor roxa, ficando apenas a amarela. Este tempo pode variar de 15 a 60 minutos, após a colocação da Solução de Iodo Especial.

- A leitura da reação<sup>(3)</sup> positiva pode ser feita quando as bordas estão amarelas esbranquiçadas sem necessidade de esperar a cor branca total da fita (leitura com 15 a 30 minutos). Na reação negativa as fitas permanecem de cor roxa podendo apresentar leve cor branca nas bordas.

**Interpretação:** - Nas bactérias produtoras de metalocarbenemases a reação será negativa (roxa) na fita Carbapenembac Metalo® e positiva (esbranquiçada a branca) na fita Carbapenembac®.

- Se a bactéria produzir uma carbapenemase não metalo a reação será positiva nas duas fitas, sendo um pouco mais demorado na fita Carbapenembac Metalo®.

**Notas:** 1. Podem ser utilizados repiques a partir de meios de Sementeira primária (Sangue, Chocolate ou CLED), Seletivos e/ou Diferenciais (MacConkey, Cromogênicos) e Agar Mueller Hinton. Para isolados no URIBAC podem ser utilizadas as colônias tanto do meio CLED modificado, como do meio I. Os resultados mais rápidos são obtidos a partir de placas de Muller Hinton ou Agar Sangue.

2. Recomendamos usar culturas com não mais de 24 a 48 horas de incubação

3. Realizar o teste **sempre** comparando com os resultados produzidos por cepas conhecidamente carbapenemases positivas e negativas. A utilização de controles positivo e negativo é fundamental para garantir a correta interpretação dos resultados.

**Apresentação:** Caixa com frasco com 10 fitas, frasco com 3 mL de Solução de Iodo Especial e 10 tubos com 1 mL de Solução EDTA

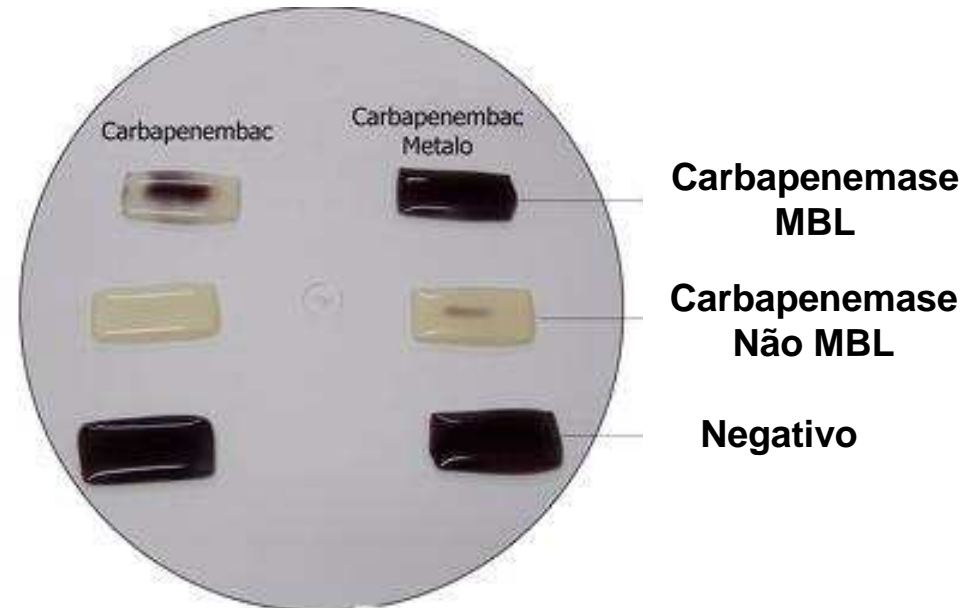
**Conservação:** Fitas: Conservar ≤ -20°C. **Solução de Iodo Especial e Solução EDTA:** Conservar entre 10° e 30°C.

**Validade:** 3 meses

**Precauções:** Após o uso, o produto deverá ser descartado seguindo-se as normas vigentes de resíduos de serviços de saúde.

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.: 01

**PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.**  
Rua Jaguaribe, 35 – Sta. Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001  
Fone: 55 11 3222-4777 - Fax: 55 11 3223-8368  
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Ins. Est. 110.485.842.111  
Site: [www.probac.com.br](http://www.probac.com.br) E-mail: [probac@probac.com.br](mailto:probac@probac.com.br)

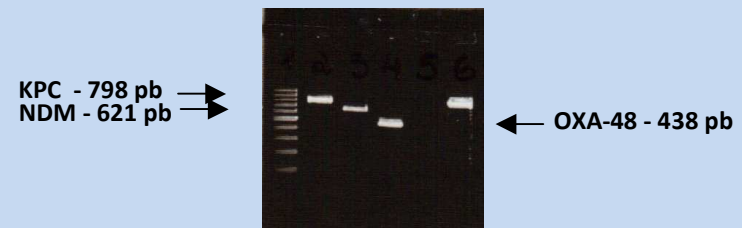




## Métodos genotípicos

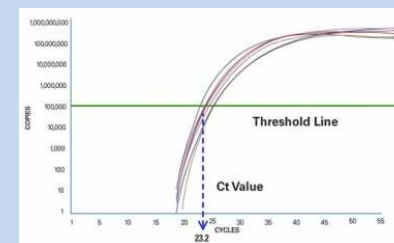
### - PCR convencional

- ✓ PCR multiplex para a detecção de *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>



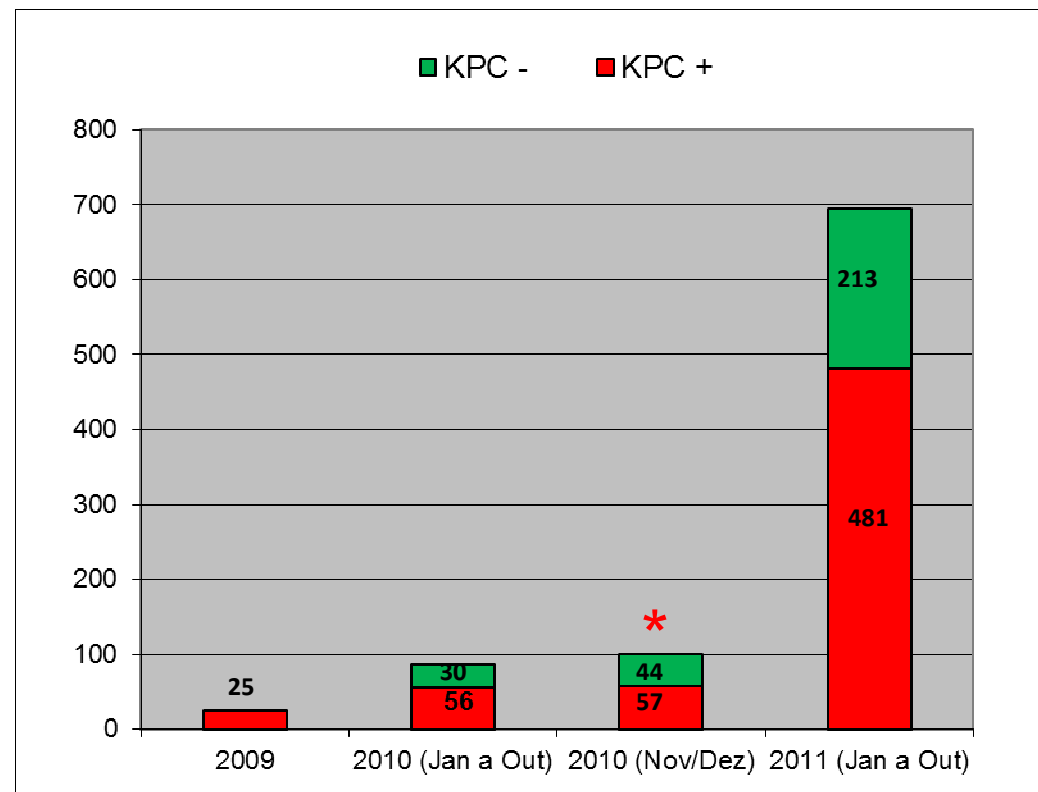
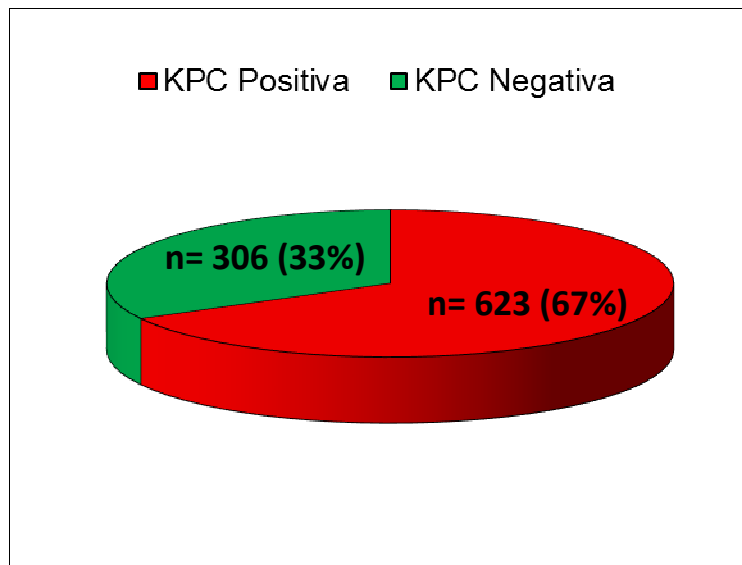
### - PCR em tempo real

- ✓ PCR multiplex para a detecção de 16S rDNA, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>



# Confirmação de cepas produtoras de KPC pelo IAL Central

## Período: 2009 a out/2011 (N= 929)



\* Nota Técnica 01/2010 ANVISA – outubro de 2010

**Situação atual:**  
**+ de 3400 cepas confirmadas como produtoras de KPC**



# DILUIÇÃO EM ÁGAR

## Teste presuntivo para resistência à Vancomicina

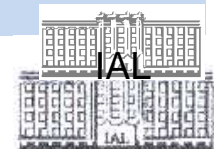
- Suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF
- Ágar BHI com 6  $\mu\text{g/mL}$  de Vancomicina
- Semear 10  $\mu\text{L}$  da suspensão
- Incubar 24 h, 35-37°C



*Enterococcus spp.*

I  $\rightarrow$  8-16  $\mu\text{g/mL}$

R  $\rightarrow$   $\geq$  32  $\mu\text{g/mL}$



# ANTIBIOGRAMA

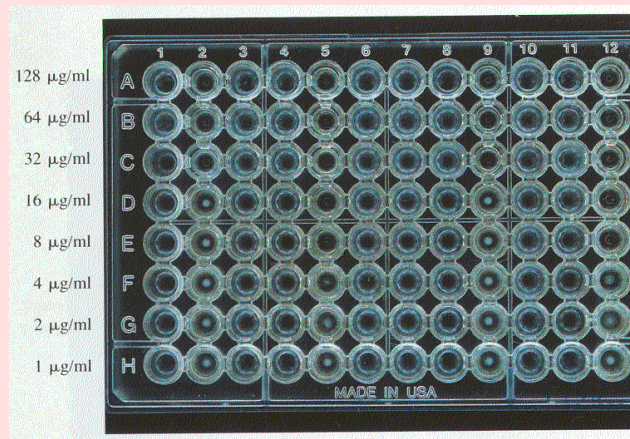
- meio: Mueller Hinton
- suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF
- semeadura: swab ou inundação

- incubação: 24 h, 35-37°C



# MICRODILUIÇÃO EM CALDO

- caldo MH cátion ajustado
- suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF
- diluição 1:100 em meio de cultura
- vol. de inóculo: 50  $\mu$ l
- incubação: 24 h, 35-37°C



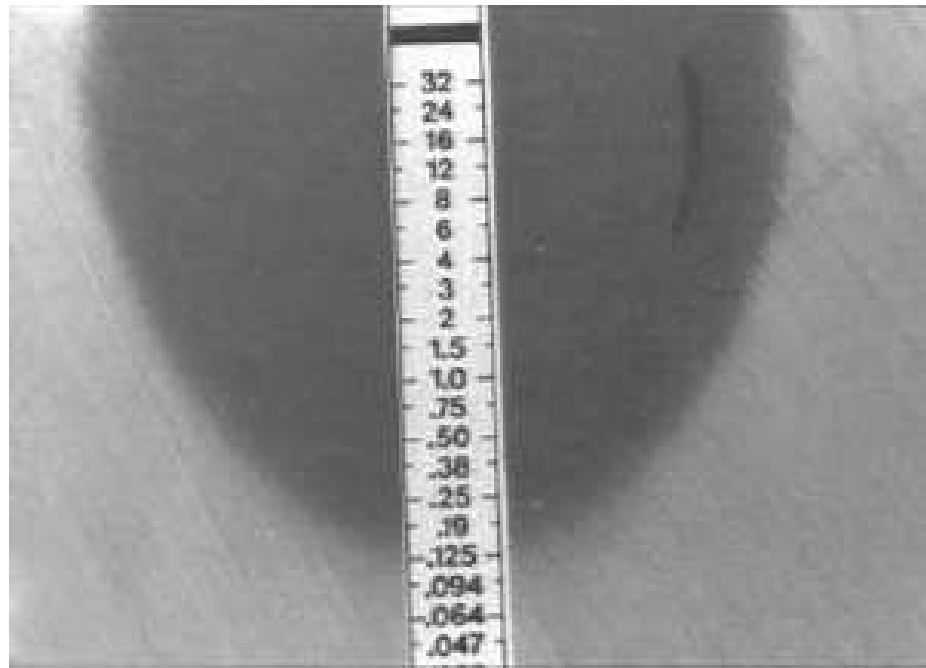
# CIM E-test

meio: Mueller Hinton

suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF

semeadura: swab

incubação: 24 h, 35-37°C

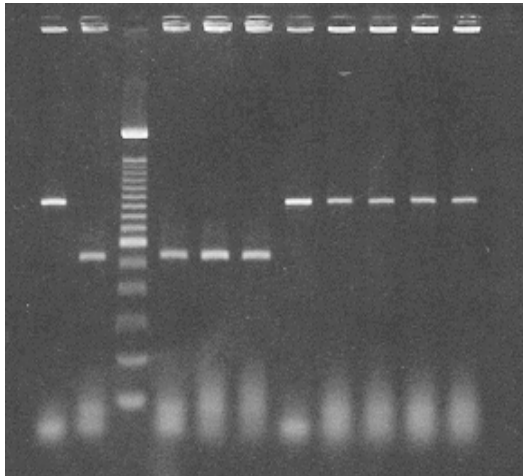


# Identificação Genotípica - PCR

Amplificação do Gene *ddl*, espécie-específico para *Enterococcus* e dos Genes de Resistência à Vancomicina

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

941 pb  
550 pb



*E. faecalis*

*E. faecium*

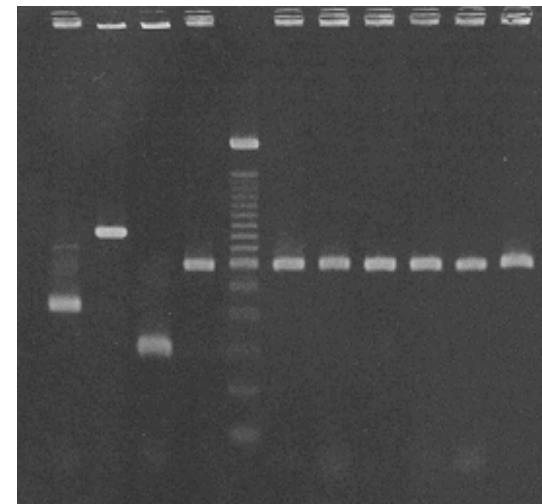
*E. gallinarum*

*vanA*

*E. casseliflavus*

*vanB*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



*vanA*

# Métodos Rápidos para detecção de MRSA

- Meios seletivos para Gram positivo + oxacilina 6µg/mL
- Meio Cromogênico MRSA - detectam a produção de enzimas com o uso de substratos cromogênicos incorporados aos meios de cultura
- Detecção de PBP2 por aglutinação em látex





# Métodos fenotípicos para detecção de MRSA



- **Ágar Diluição** : Agar Mueller Hinton + 4% de NaCl + Oxacilina 6µg/mL



**Qualitativo (S,I,R)**

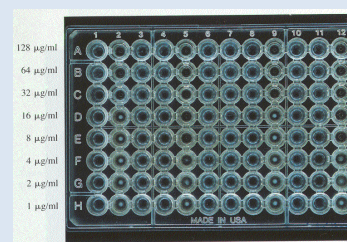


- **Disco Difusão**: disco de cefoxitina 30µg (MRSA  $\leq$  21mm)

- **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

- microdiluição em caldo
- teste de gradiente de difusão

**Quantitativo: µg/mL**

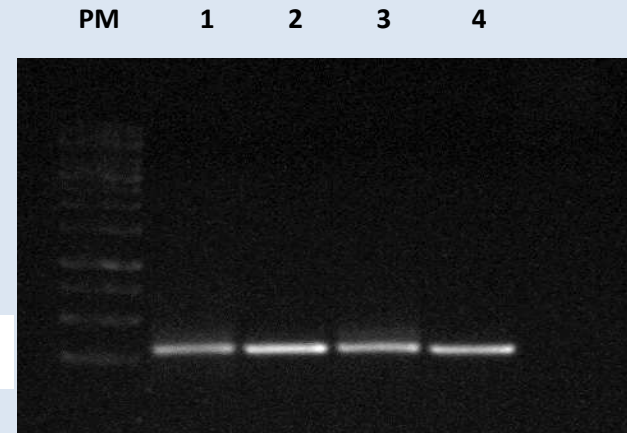


- **Métodos automatizados**: vários sistemas e substituição da oxacilina pela cefoxitina

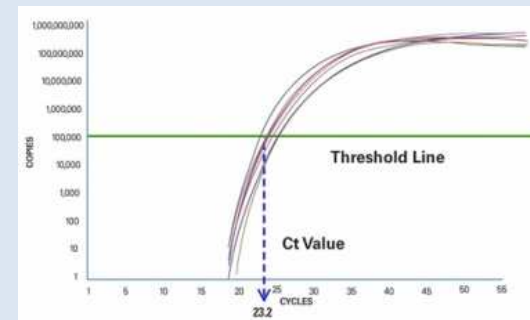
# Métodos genotípicos para detecção de MRSA

- Detecção gene *mecA*
  - PCR convencional

Gene *mecA* (286 pb)



- qPCR (PCR em tempo real)



**Orientação para o envio de cepas de enterobactérias, *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, ao Instituto Adolfo Lutz**

**MAIO/2016**

**RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS  
PELA PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES**

**ORIENTAÇÃO PARA A COLETA DE CULTURAS DE VIGILÂNCIA A SEREM PROCESSADAS NOS LABORATÓRIOS DE ORIGEM**

<b>Micro-organismo Multirresistente</b>	<b>Sítio de Coleta<sup>1</sup></b>
<b>MRSA</b>	Nasal / Nasofaringe
<b>VRE</b>	Retal
<b>Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos</b>	Retal
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i>/<i>Acinetobacter</i> spp Resistentes aos Carbapenêmicos</b>	Retal

**Orientação para o envio de cepas de Enterococos resistentes a vancomicina (VRE) ao Instituto Adolfo Lutz**

**Maio/2016**

**Acesso pelo site do CVE**

**<http://cve.saúde.sp.gov.br>**

## **Documentos a serem encaminhados com os isolados bacterianos:**

### **Solicitações de exames**

Encaminhar memorando junto com a lista de remessa que se encontra na página do IAL: [www.ial.sp.gov.br](http://www.ial.sp.gov.br)

Serviços → Exames – Amostras Biológicas → Formulário de relação de remessa (download)

### **Memorando:**

Com o timbre da instituição, carimbo e assinatura do profissional responsável pelo pedido e os seguintes dados:

Nome completo do paciente

Data de nascimento

Hospital de origem

Fonte de isolamento do isolado bacteriano

Suspeita bacteriana (gênero, espécie, mecanismo de resistência, etc)

-Especificar se foram realizados testes preliminares (por ex: testes com inibidores de beta-lactamases, tais como, EDTA, ácido fenilborônico, cloxacilina, etc)

Surto de IRAS: Sim ( ) Não ( )

Se sim:

Foi notificado para a vigilância epidemiológica? Sim ( ) Não ( )

## REGIONALIZAÇÃO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL)



CLR – Centro de Laboratório Regional do IAL

IAL	GVE
IAL Central – São Paulo	GVE Capital GVE Osasco GVE Franco da Rocha GVE Mogi das Cruzes
IAL Araçatuba	GVE Araçatuba
IAL Bauru	GVE Bauru GVE Botucatu
IAL Campinas	GVE Campinas GVE São João da Boa Vista
IAL Marília:	GVE Marília GVE Assis
IAL Presidente Prudente	GVE Presidente Prudente GVE P. Venceslau
IAL Ribeirão Preto	GVE Araraquara GVE Ribeirão Preto GVE Barretos GVE Franca
IAL Rio Claro	GVE Piracicaba
IAL Santo André	GVE Santo André
IAL Santos	GVE Santos GVE Registro
IAL São José do Rio Preto	GVE São José do Rio Preto GVE Jales
IAL Sorocaba	GVE Sorocaba GVE Itapeva
IAL Taubaté	GVE São Jose dos Campos GVE Taubaté GVE Caraguatatuba

## REGIONALIZAÇÃO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Fluxo de envio de cepas de bactérias multirresistentes aos Laboratórios do Instituto Adolfo Lutz (IAL), Central e Regionais, de acordo com as GVEs





**Muito Obrigada !!!!**

**[dogarcia@yahoo.com](mailto:dogarcia@yahoo.com)**

