

## **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):

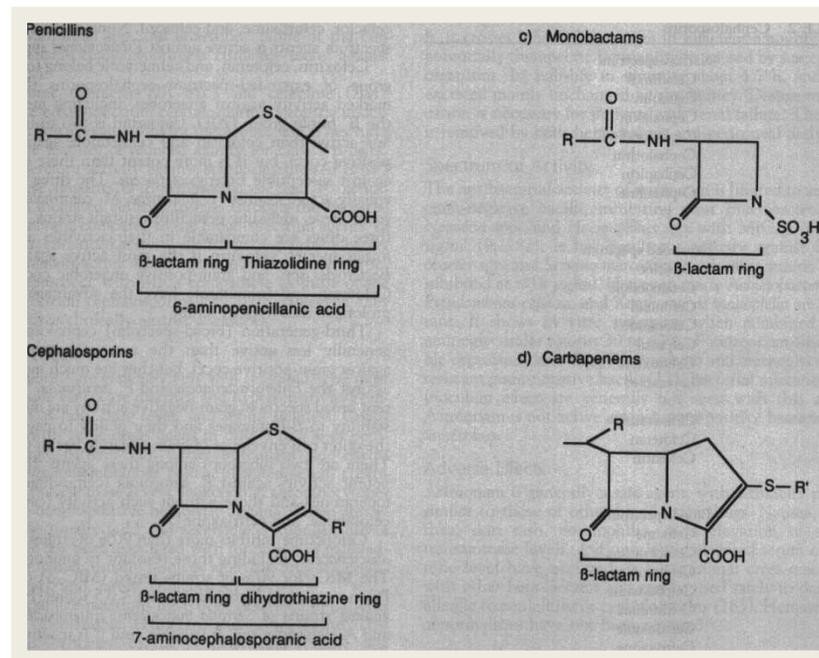
- Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC)
- *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp resistentes aos carbapenêmicos
- MRSA e VRE



# $\beta$ -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



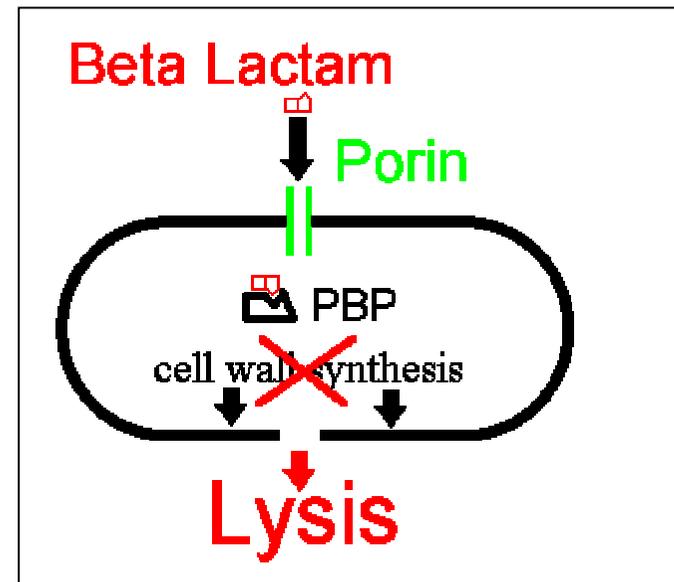
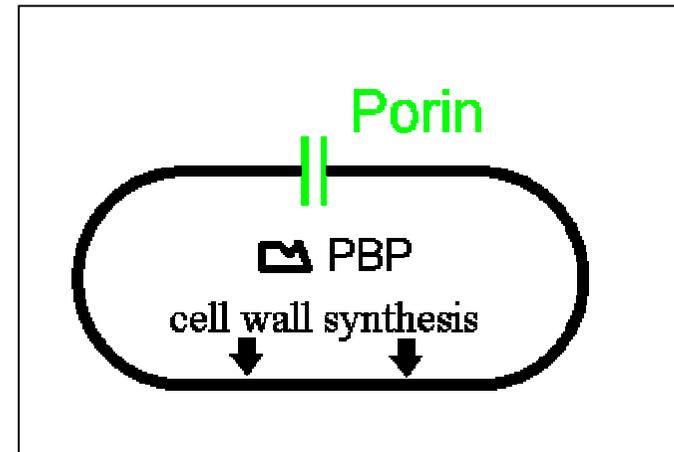
Ligam-se às PBPs\* – espaço periplasmático



Inibem a síntese da parede celular

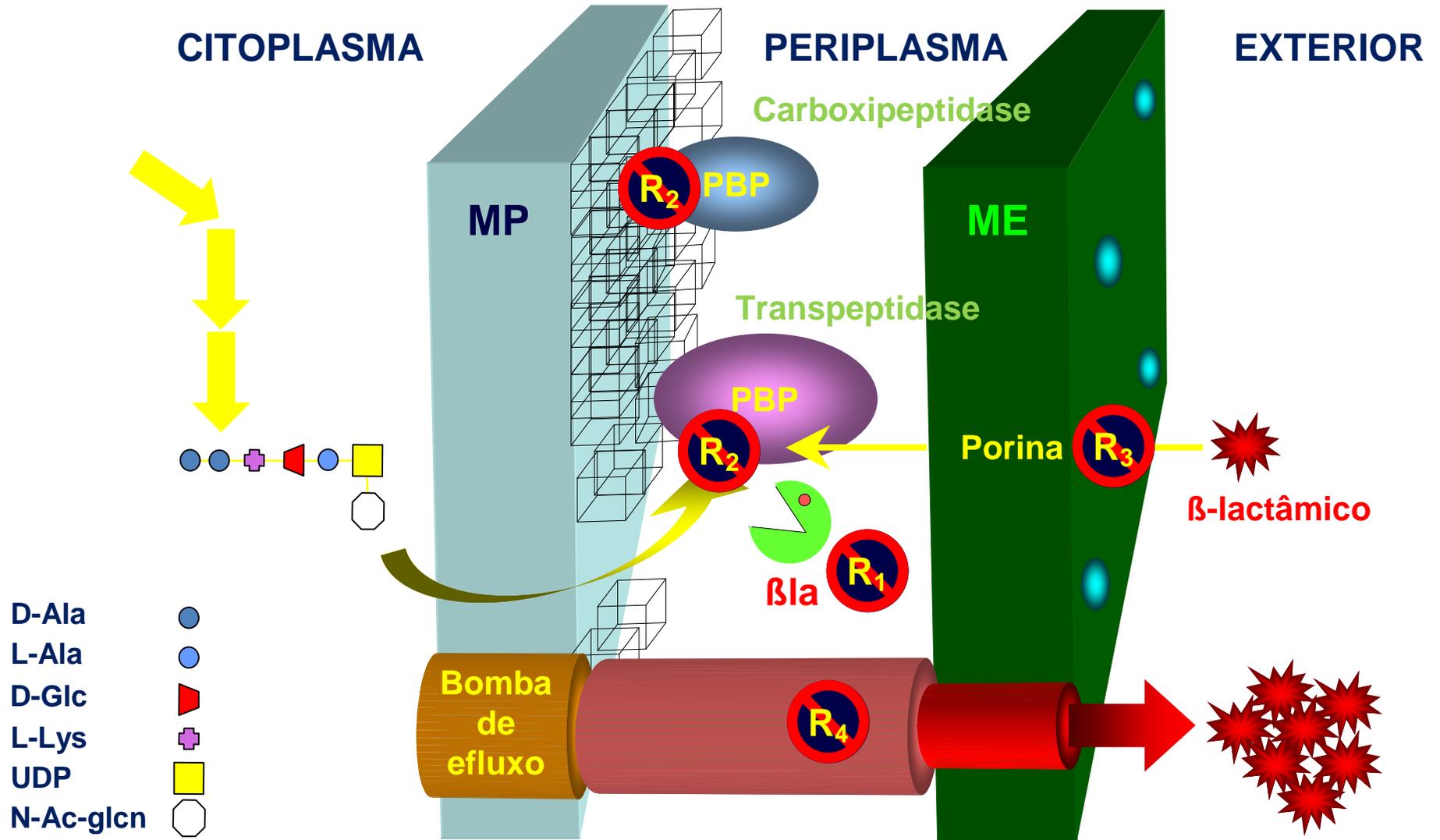


Lise celular



\* - 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

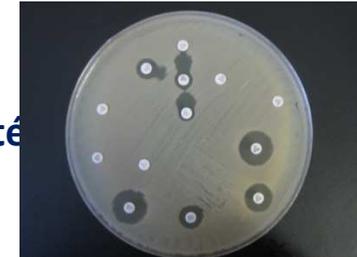
$\beta$ -lactamases

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

BGN-Não

Fermentador

**Carbapenemases:**

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

## 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               | Carbenicilinas - inibidas por ác. clavulânico           |
| <b>D</b>            | 2d               | Oxacilinas  |
| <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)

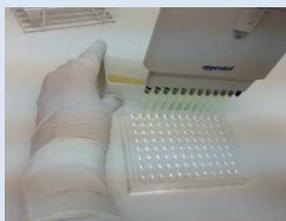
<sup>2</sup> – Funcional (Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. AAC 39: 1211-33, 1995)

**Carbapenemases**

## Screening inicial para a detecção de carbapenemases

### Testes de sensibilidade aos antimicrobianos:

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



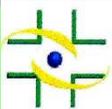
**Resistência ou sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos**

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<br>(µg/mL) | Intermediário<br>(µg/mL) | Resistente<br>(µg/mL) | Potência<br>do disco<br>(mg) | Sensível<br>(mm)  | Intermediário<br>(mm) | Resistente<br>(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<br>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**

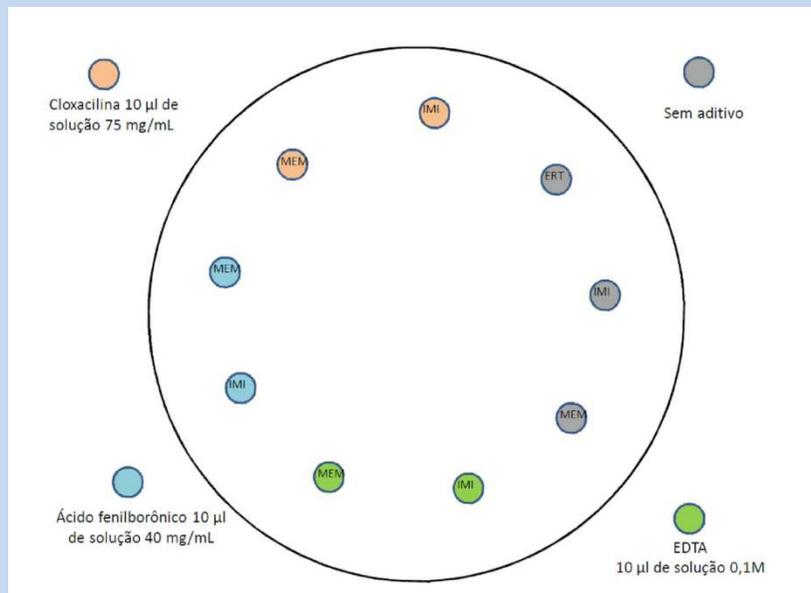
| <b>Classificação da enzima (Ambler/BJM)</b> | <b>Principais Enzimas</b>   | <b>Micro-organismos</b>  |
|---|-----------------------------|--|
| <b>Classe A – grupo 2</b>                   | <b>AmpC, KPC</b>            | <b>Fam. <i>Enterobacteriaceae</i></b>  |
| <b>Classe B – grupo 3*</b>         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



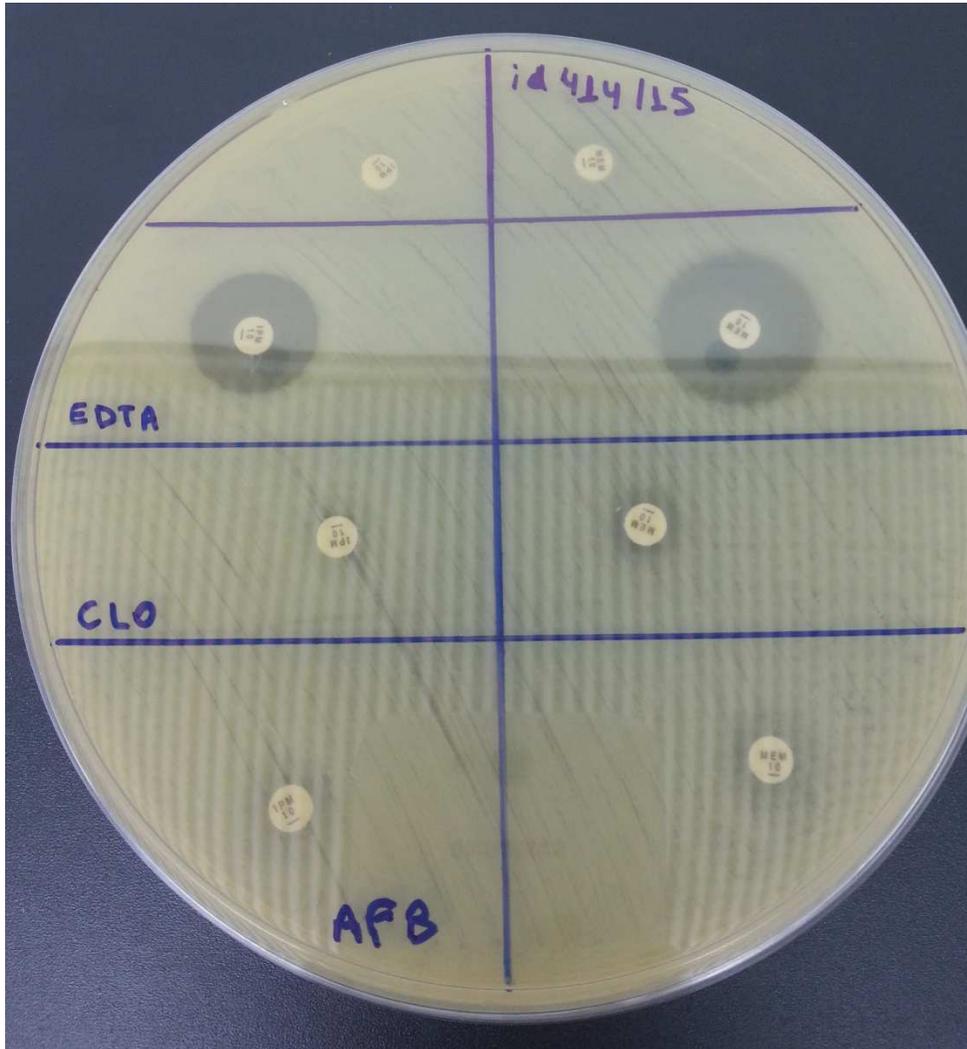
KPC – inibida pelo AFB

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

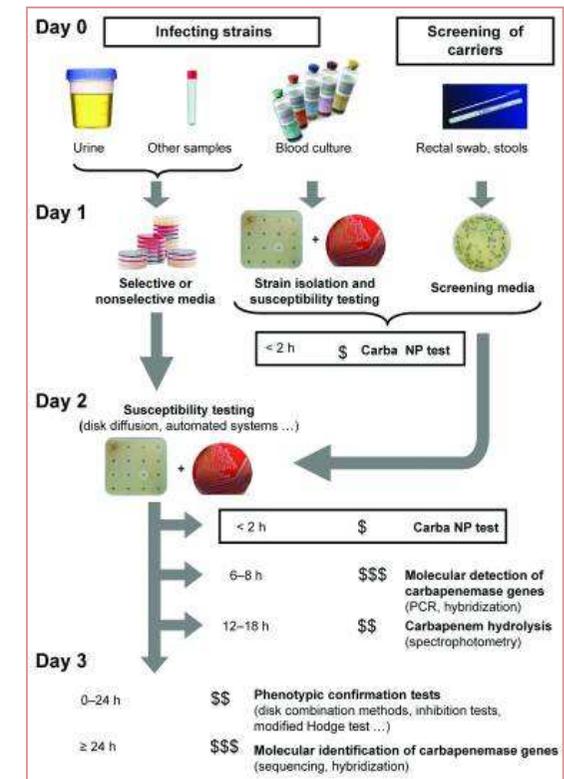
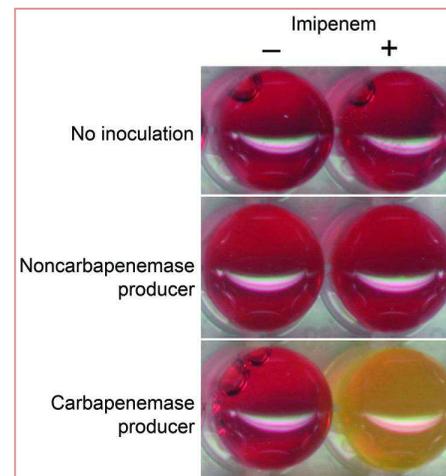
Centrifugação 10.000 g/5 min



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

↓ Incubação a 37°C até 2 h

Leitura do teste



### 3) Métodos colorimétricos

#### Blue-CARBA

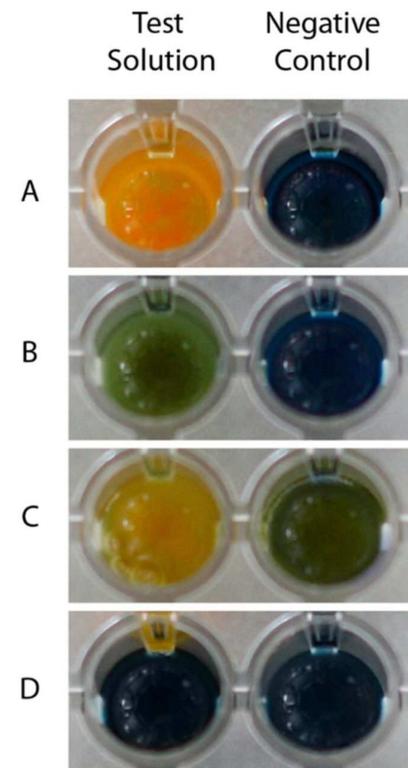
Detecção da hidrólise do carbapenêmico

Indicador: azul de bromotimol

Substrato: Imipenem

Massa bacteriana: uma alçada, correspondendo a 5 microlitros

Incubação com agitação a 37°C por 2 horas



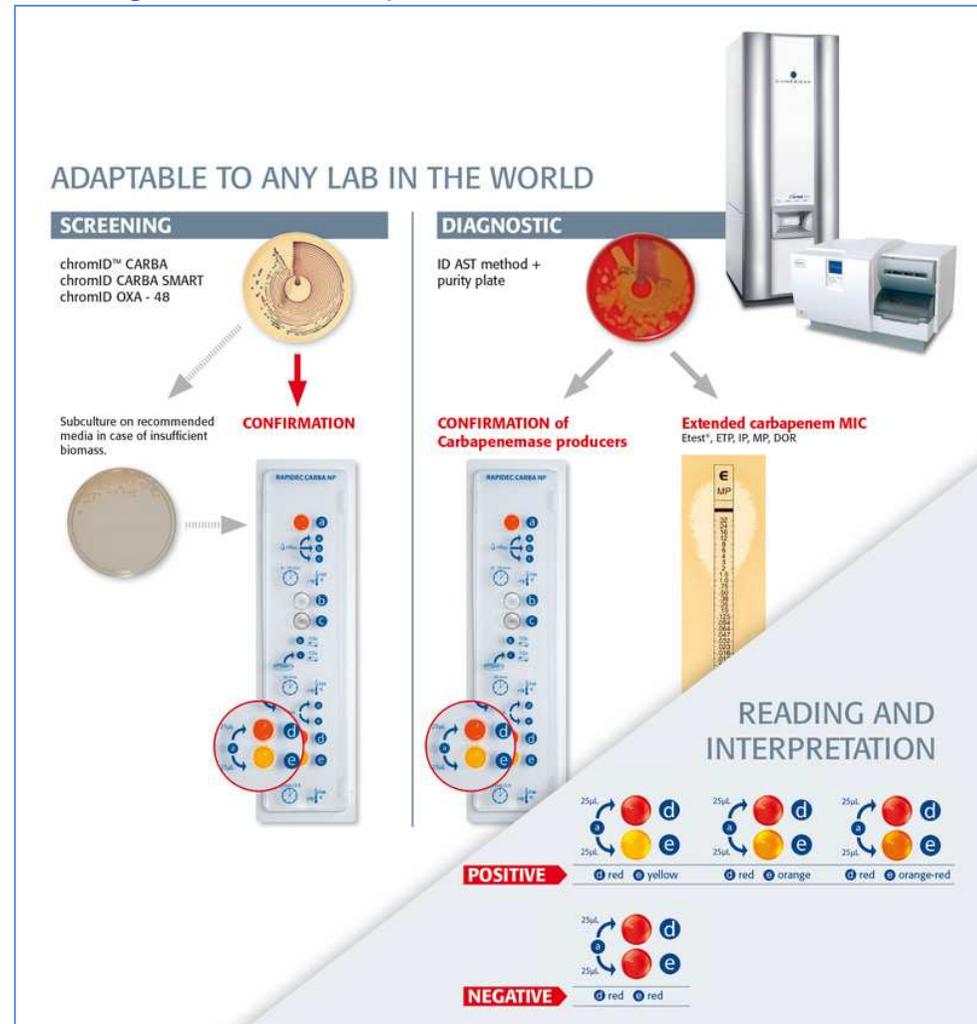
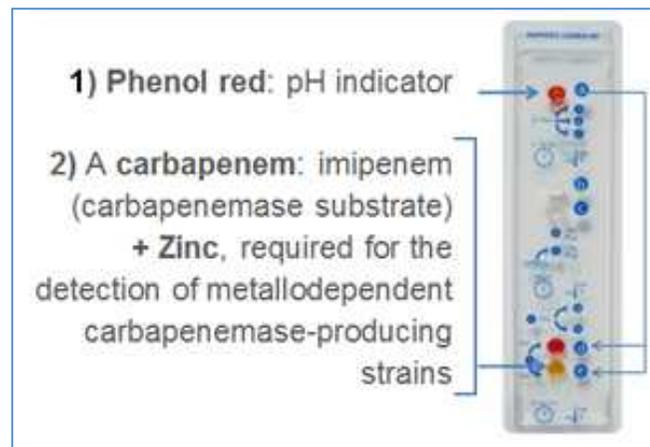
Representative results of the Blue-Carba test obtained from carbapenemase producers (A, B, and C) and non-carbapenemase producers (D) with test solution (left) and negative control solutions (right).

## 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

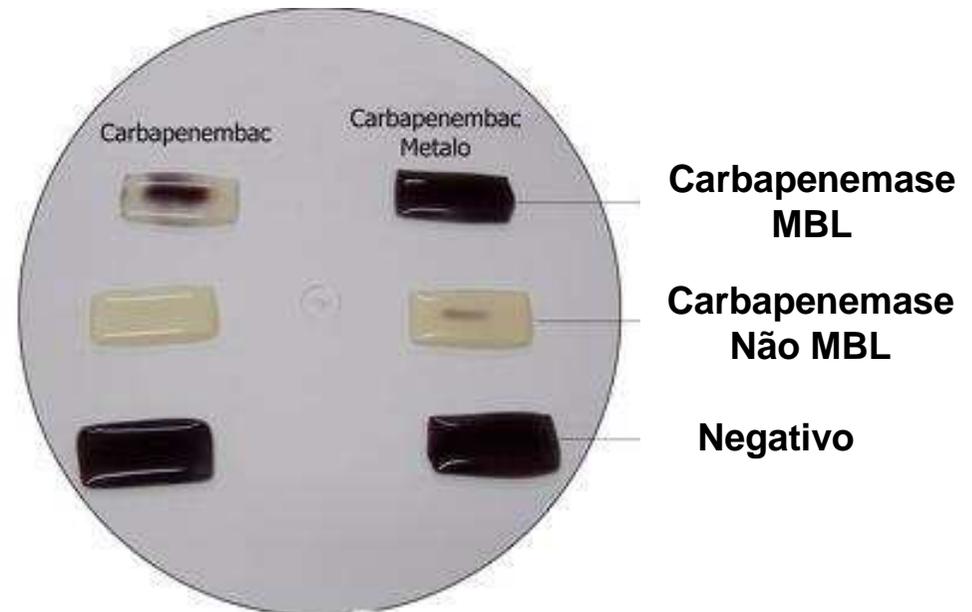
**Conservação:** Fitas: Conservar ≤ -20°C. **Solução de Iodo Especial e Solução EDTA:** Conservar entre 10° e 30°C.

**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 - Insc. 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)



Carbapenemase  
MBL

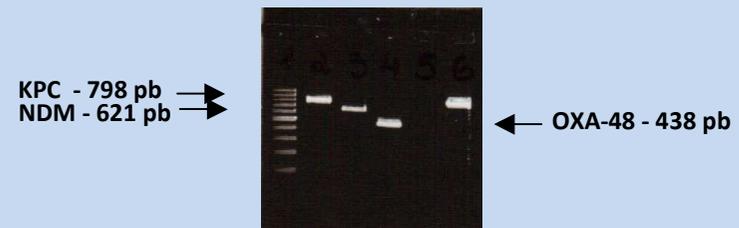
Carbapenemase  
Não MBL

Negativo

## Métodos genotípicos

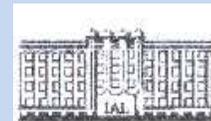
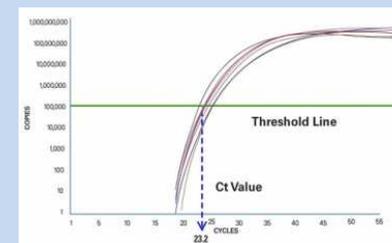
### - PCR convencional

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

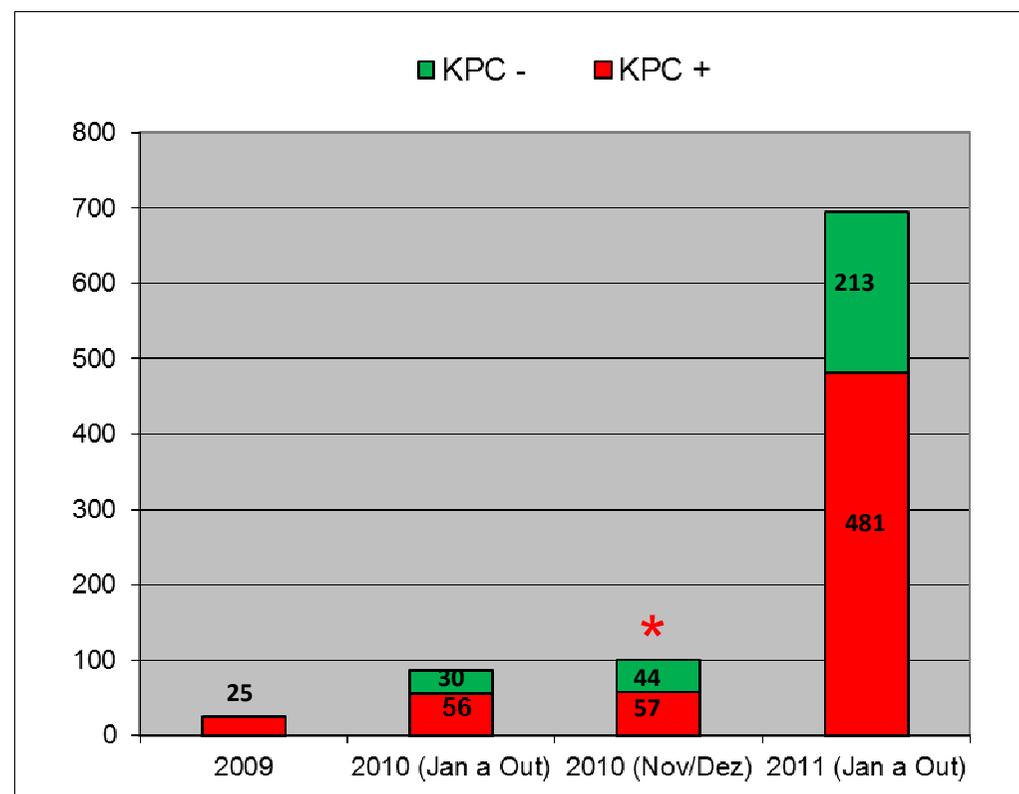
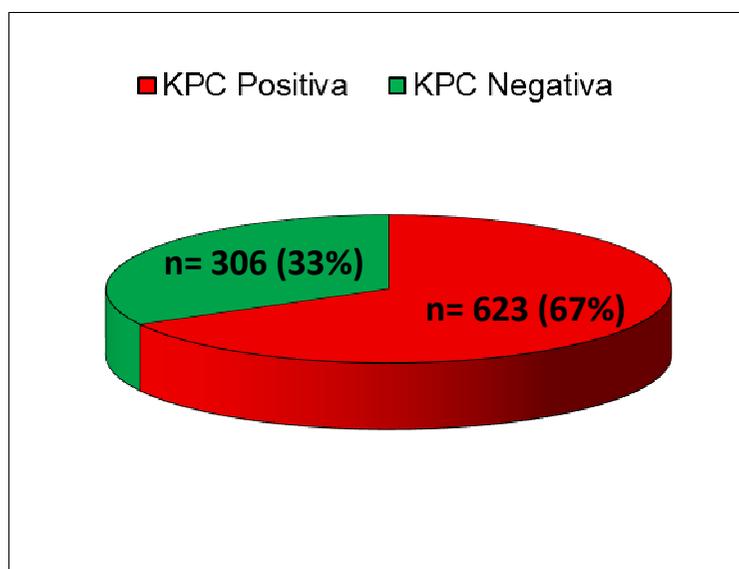


### - PCR em tempo real

- ✓ 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

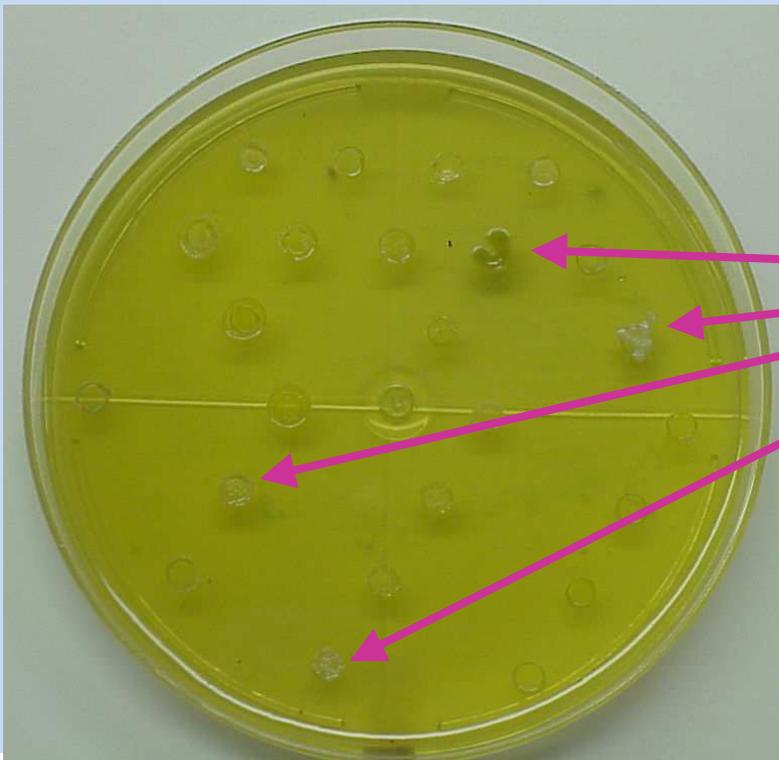
**Situação atual:  
+ de 3400 cepas confirmadas como produtoras de KPC**



# DILUIÇÃO EM ÁGAR

## Teste presuntivo para resistência à Vancomicina

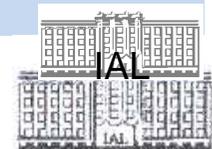
- Suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF
- Ágar BHI com 6  $\mu\text{g/mL}$  de Vancomicina
- Semear 10  $\mu\text{L}$  da suspensão
- Incubar 24 h, 35-37°C



*Enterococcus spp.*

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

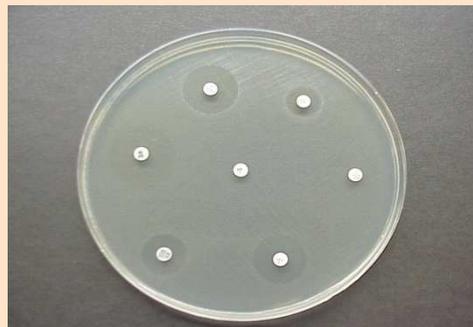
R  $\rightarrow$   $\geq$  32  $\mu\text{g/mL}$



# ANTIBIOGRAMA

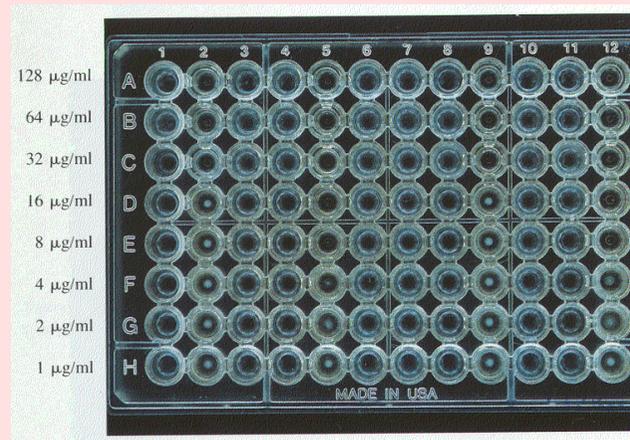
- meio: Mueller Hinton
- suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF
- semeadura: swab ou inundação

- 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



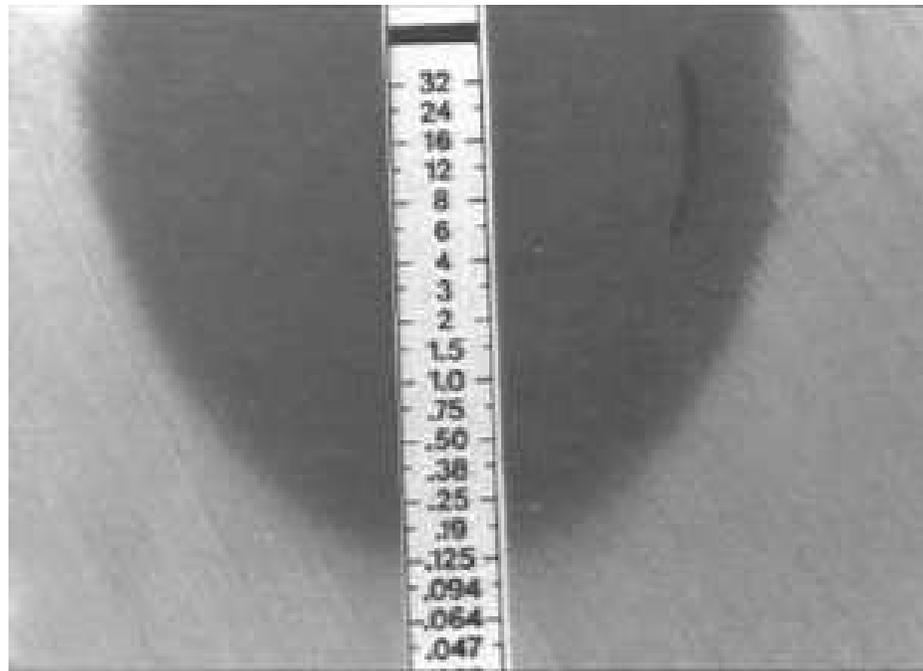
# CIM E-test

meio: Mueller Hinton

suspensão direta da colônia: escala 0,5 MF

semeadura: swab

incubação: 24 h, 35-37°C

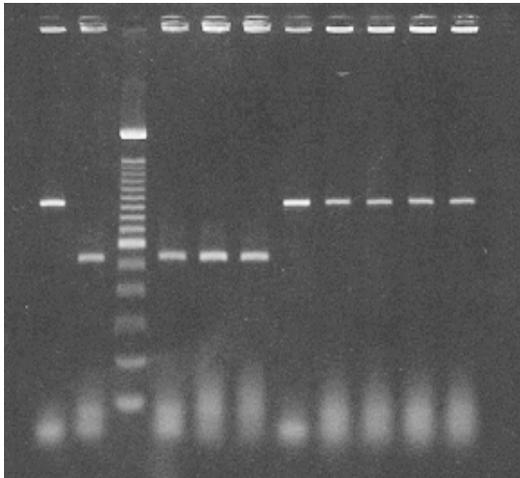


# Identificação Genotípica - PCR

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*

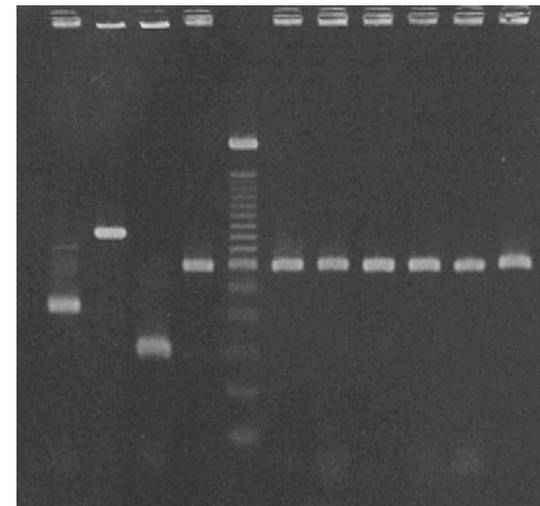
*E. gallinarum*

*vanA*

*E. casseliflavus*

*vanB*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



*vanA*

# Métodos Rápidos para detecção de MRSA

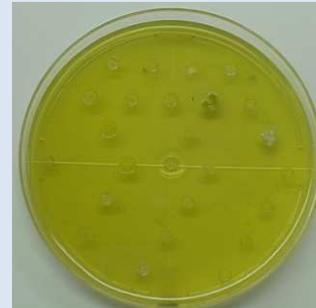
- Meios seletivos para Gram positivo + oxacilina 6µg/mL
- Meio Cromogênico MRSA - detectam a produção de enzimas com o uso de substratos cromogênicos incorporados aos meios de cultura
- Detecção de PBP2 por aglutinação em látex



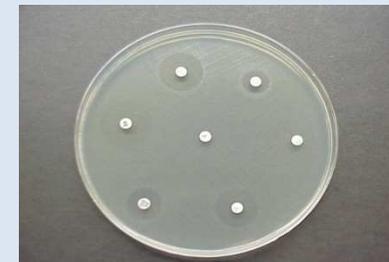
# Métodos fenotípicos para detecção de MRSA



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

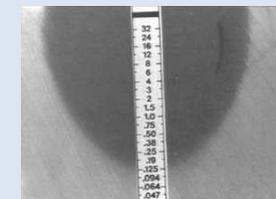
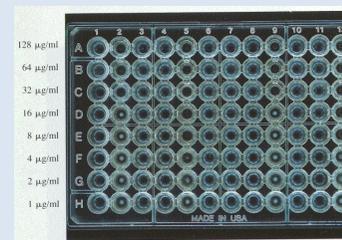


Qualitativo (S,I,R)



- **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

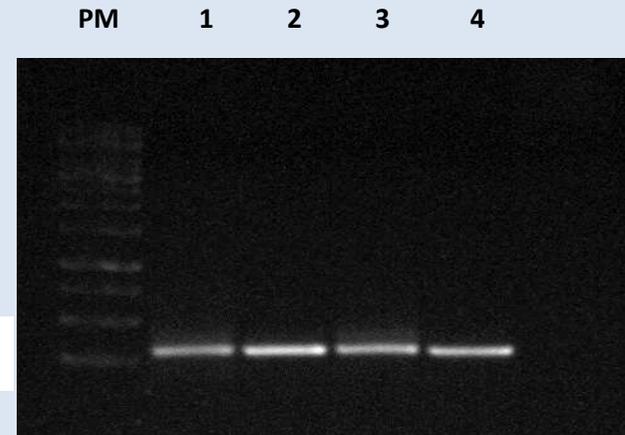


- **Métodos automatizados**: vários sistemas e substituição da oxacilina pela cefoxitina

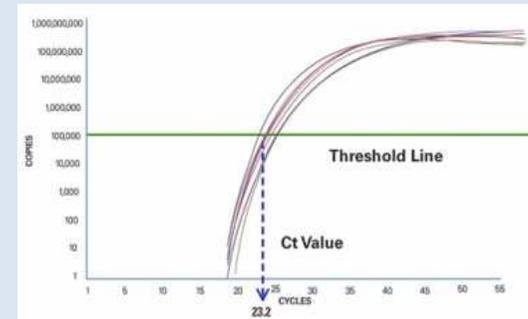
# Métodos genotípicos para detecção de MRSA

- 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 /<br>Nasofaringe             |
| <b>VRE</b>   | Retal                              |
| <b>Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos</b>  | Retal                              |
| <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i>/<i>Acinetobacter</i> spp<br/>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<br>GVE Osasco<br>GVE Franco da Rocha<br>GVE Mogi das Cruzes |
| IAL Araçatuba             | GVE Araçatuba   |
| IAL Bauru                 | GVE Bauru<br>GVE Botucatu   |
| IAL Campinas              | GVE Campinas<br>GVE São João da Boa Vista                               |
| IAL Marília:              | GVE Marília<br>GVE Assis  |
| IAL Presidente Prudente   | GVE Presidente Prudente<br>GVE P. Venceslau                             |
| IAL Ribeirão Preto        | GVE Araraquara<br>GVE Ribeirão Preto<br>GVE Barretos<br>GVE Franca      |
| IAL Rio Claro             | GVE Piracicaba  |
| IAL Santo André           | GVE Santo André   |
| IAL Santos                | GVE Santos<br>GVE Registro  |
| IAL São José do Rio Preto | GVE São José do Rio Preto<br>GVE Jales                                  |
| IAL Sorocaba              | GVE Sorocaba<br>GVE Itapeva   |
| IAL Taubaté               | GVE São Jose dos Campos<br>GVE Taubaté<br>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)**

