

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Rafael Oliveira dos Reis

**RESISTÊNCIA A CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM DOIS RELATOS EM UMA
CIDADE DO SUL DO BRASIL**

Porto Alegre

2020

Rafael Oliveira dos Reis

**RESISTÊNCIA A CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM DOIS RELATOS EM UMA
CIDADE DO SUL DO BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Reis, Rafael Oliveira dos
Resistência a Ceftazidima-avibactam: dois relatos
em uma cidade do sul do BrasilBRASIL / Rafael Oliveira
dos Reis. -- 2020.
35 f.
Orientador: Afonso Luis Barth.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Microbiologia Clínica,
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Ceftazidima-avibactam. 2. MDR. 3. Klebsiella
pneumoniae. 4. Multirresistente. I. Barth, Afonso
Luis, orient. II. Título.

RESUMO

Infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR) são cada vez mais comuns dentro e fora do ambiente hospitalar. O antibiótico Ceftazidima-avibactam (CAZ-AVI) é uma nova combinação inibidor de beta-lactamase não beta-lactâmico associado à cefalosporina, aprovada para o tratamento de infecções por bacilos Gram negativos multirresistentes (MDR). O objetivo desse estudo foi caracterizar dois isolados clínicos originados de urina e escarro de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC, resistentes a este novo antibiótico em uma cidade do sul do Brasil. Os isolados foram avaliados quanto a presença de genes de carbapenemases pela técnica de PCR bem como pela técnica de imunoensaio de fluxo lateral cromatográfico. O teste de susceptibilidade foi realizado em sistema VITEK 2 bioMeriuex e por microdiluição em caldo para o antimicrobiano colistina. O antibiótico CAZ-AVI foi testado através do método de fita gradiente. Os dois isolados clínicos foram obtidos de pacientes hospitalizados sendo que o isolado proveniente de amostra de urina apresentou susceptibilidade *in vitro* somente amicacina e colistina, enquanto o isolado de amostra escarro foi sensível apenas a amicacina e gentamicina. Ambos isolados s apresentaram MIC de 16 µg/mL para CAZ-AVI. A possível emergência da resistência a antibióticos recentemente liberados para uso clínico traz preocupação para o tratamento de bactérias MDR. É de extrema importância a vigilância de cepas resistentes a estas drogas a fim guiar seu uso no tratamento de infecções, em particular, de origem hospitalar.

Palavras-chave: Ceftazidima-avibactam.MDR.*Klebsiella pneumoniae*. Multirresistente.

ABSTRACT

Multidrug-resistant bacterial infection (MDR) is common in community and hospital environment. Ceftazidime-avibactam (CAZ-AVI) is a new combination of non beta-lactamase inhibitor associated with cephalosporin, approved for the treatment of multidrug-resistant bacteria (MDR) infections. The isolates were tested against carbapenemase by polymerase chain reaction and phenotypic lateral flow tests. The susceptibility test was performed in VITEK 2 bioMeriuex system and broth microdilution for antimicrobials colistin. In this study we described two *Klebsiella pneumoniae* strains producing KPC, resistant to this new drug in a southern Brazilian city. We demonstrated the susceptibility profile of these bacterial isolates as well as the minimum inhibitory concentration (MIC) levels. The isolate from urine sample showed in vitro susceptibility only to Amikacin and colistin, while the sputum sample isolate was sensitive to Amikacin and gentamicin. Both isolates were from nosocomial patients. Both strains presented MIC of 16 µg/mL CAZ-AVI by the gradient tape method. The concern is even greater with the isolated sputum strain, because even resurgent antibiotics such as colistin did not show efficacy when tested in vitro for this strain of *K. pneumoniae*. The possible emergence of antibiotic resistance recently released for clinical use brings concern for the treatment of MDR bacteria. It is of extreme importance to monitor strains resistant to these drugs in order to prolong their use in the treatment of MDR bacteria.

Keywords: Ceftazidime-avibactam. MDR. *Klebsiella pneumoniae*. Multidrug-resistant .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	3
1.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	4
1.2	RESISTÊNCIA A CARBAPENÊMICOS E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	5
1.3	TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARBAPENEMASES.....	8
1.4	OBJETIVOS.....	10
1.4.1	Objetivo geral.....	10
1.4.2	Objetivos específicos.....	10
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
3	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	18
	REFERÊNCIAS.....	19
	APÊNDICE A – RESULTADOS ANÁLISE MOLECULAR.....	22
	ANEXO A –NORMAS AUTORES REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Doença causadas por bactérias, em particular os bacilos Gram-negativos (BGN), multirresistentes (MDR, *multidrug resistant*) são um grande problema atual na prática médica devido à alta morbimortalidade além de aumentar extensivamente os gastos em saúde pública. Com a falta de opções terapêuticas, novas abordagens têm sido avaliadas para o tratamento de cepas de BGN MDR. Um dos novos antibióticos aprovados no Brasil é Ceftazidima/Avibactam (CAZ-AVI), com ação frente a bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos, com capacidade de inibir principalmente enzimas (carbapenemases) da classe A e C de Ambler. Entretanto, a emergência e a descrição de cepas com baixa susceptibilidade ou resistentes à esta droga em outros países trazem um alerta para a possibilidade da resistência ao CAZ-AVI o que poderia implicar em baixa efetividade no uso deste medicamento no Brasil. Com isso, este trabalho teve como finalidade reportar dois casos de resistência a CAZ-AVI e descrever as características *in vitro* (perfil de suscetibilidade e análise molecular dos genes de resistência a carbapenêmicos) nos isolados resistentes ao CAZ-AVI.

1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A descoberta e utilização de antibióticos na clínica médica revolucionou os procedimentos médicos na história, sendo determinante para a expressiva diminuição da mortalidade nas diversas formas de intervenções médicas, principalmente em atividades complexas com alto risco de morte por infecções. Entretanto, a incorreta utilização deste recurso por décadas, tanto na área médica quanto em outras especialidades, como a produção animal, em conjunto com o grande aumento populacional e a elevada migração global, obrigaram a World Health Organization (WHO) a decretar resistência bacteriana como uma das três mais importantes ameaças à saúde pública do século XXI (Sarmah et al., 2006; Martinez, 2014; Wang *et. al*, 2018).

Ainda, as doenças que podem ser causadas por agentes multirresistente têm emergido continuamente no mundo todo, com grande preocupação para bacilos Gram-negativos. Estimativas apontam que infecções por MDR são responsáveis por 50 mil mortes por ano nos Estados Unidos (EUA) e Europa, chegando a 700 mil mortes em todo planeta (O'Neill *et al.*, 2015). Estimativas apontam que infecções por MDR serão a principal causa de morte em todo o mundo. A disseminação de mecanismos de resistência já conhecidos e a introdução de novos mecanismos de resistência está levando à diminuição das opções ou até mesmo acabando com as possibilidades terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas. Doenças que até pouco tempo eram facilmente tratadas, como pneumonia, tuberculose, gonorreia e gastroenterite, atualmente trazem apreensão médica pela falta de opções terapêuticas eficazes (Spellberg *et al.*, 2008; Rolain *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Neil, 2014; Amann, 2019).

A magnitude do problema vai além do aumento da mortalidade e morbidade, trazendo ao mundo todo um importante impacto na economia mundial, elevando altamente o custo com a saúde, obrigando a países como EUA a gastar bilhões de dólares anualmente em ações contra resistência bacteriana ou bactérias denominadas “*superbugs*” (O'Neill *et al.*, 2015). Este termo se refere a micróbios com maior morbimortalidade devido a múltiplas mutações que proporcionam altos níveis de resistência às classes de antibióticos especificamente recomendadas para seu tratamento. Um exemplo típico atual é a resistência de bacilos gram-negativos a carbapenêmicos e polimixinas, não havendo possibilidades rotineiras para o tratamento (Davies, 1996; Munita e Arias, 2016; Amann, 2019).

A falta de opção terapêutica para o tratamento desse tipo de infecção tem estimulado a pesquisadores do mundo todo na procura de novas drogas que tenham ação frente aos agentes

bacterianos de alta prevalência, principalmente em unidades hospitalares (Munita e Arias, 2016).

1.2 RESISTÊNCIA A CARBAPENÊMICOS E AS NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Diversas bactérias podem apresentar resistência a carbapenêmicos, entre as mais comuns estão *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumannii* e bactérias da ordem *Enterobacterales*. No entanto, este último grupo tem causado maior preocupação para os órgãos de saúde devido à elevada ubiquidade. Exemplos desta ordem são *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumoniae*, principais bactérias encontradas apresentando resistência aos carbapenêmicos. Isso se deve extensamente à alta capacidade que estes microorganismos têm de causar infecções nos mais variados sítios anatómicos (Zanski *et al.*, 2002; Moradigaravand *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018).

Em relação às doenças adquiridas em hospitais, os mecanismos de resistência, comprometem os tratamentos já complicados como a infecção respiratória por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística. Por ser um patógeno altamente persistente e não sendo neutralizado pelas defesas imunológicas humanas, a *P. aeruginosa* vem sendo continuamente descrita como problema em unidades hospitalares. Juntamente, *Acinetobacter baumannii* é dito como patógeno Gram-negativo associado a infecções nosocomiais, devido sua capacidade de sobrevivência e biodegradação no ambiente, mantendo-se persistente por longos períodos em unidades de terapia intensiva, por exemplo (Hong *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2017).

Contudo, a preocupação é ainda maior com a ordem das *Enterobacterales*, por ser responsável por altas taxas infecções comunitárias e hospitalares e altas taxas de resistência aos antibióticos no Brasil e no mundo. É composta por diversos bacilos Gram-negativos fermentadores da glicose, entre eles estão a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. entre outros, que frequentemente são descritos causando as mais variadas formas de como pneumonia, infecções relacionadas à assistência à saúde, infecções do trato urinário e infecções de corrente sanguínea, entre outras. Essas doenças têm ocasionando em altos índices de mortalidade, devido à escassez de arsenal terapêutico, visto que os carbapenêmicos representam as principais drogas de escolha para tratamentos de infecções graves por microorganismos multirresistentes, principalmente nos casos de infecções por esta gama de bactérias (Gales *et al.*, 2012; Neil, 2014; Logan *et al.*, 2017).

O mundo tem observado o crescente aumento dos níveis de ERC (*Enterobacterales* Resistentes aos Carbapenêmicos) devido a mecanismos de transmissão altamente eficazes

mediados por plasmídeos, além da disseminação clonal que contribuem para o aumento contínuo da incidência dessas bactérias, principalmente no ambiente hospitalar. A resistência pode estar associada a uma variedade de mecanismos. Os principais são redução da permeabilidade transmembrana (diminuição das porinas), beta-lactamases e bombas de efluxo. A resistência fenotípica aos carbapenêmicos é causada normalmente pela atividade da beta-lactamase combinada com mutações estruturais e com a produção de carbapenemases, enzimas que hidrolisam antibióticos carbapenêmicos, que possuem genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, que propiciam rápida disseminação em âmbito mundial e têm o impacto mais significativo na saúde humana (Spellberg *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2018; Amann *et al.*, 2019).

Além disso, a presença de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), que geralmente são codificadas por plasmídeos, e AmpC cefalosporinases (AmpC), cuja expressão nesta ordem é mais frequentemente associada à hiperprodução de enzimas de codificadas por genes cromossômicos induzíveis ou desprimidos. ESBLs e AmpC são capazes de conferir resistência ao carbapenêmicos quando combinados com a mutação de porinas, levando à diminuição da expressão das mesmas, retardando a difusão de antibióticos através da membrana bacteriana que facilita ação das enzimas ESBL e AmpC. Outros mecanismos associados à resistência ao carbapenêmicos incluem bombas de efluxo de drogas e alterações nas proteínas de ligação à penicilina (Meletis *et al.*, 2016; Rodriguez-Baño *et al.*, 2018).

Já as classes de beta-lactamases do tipo carbapenemases que conferem à resistência a carbapenêmicos em *Enterobacteriales* pertencem a três delas: Classe A (*K. pneumoniae* carbapenemases, KPC), Classe B (Metalobetalactameses, MBL, incluindo as de Nova Délhi, NDM) e Classe D (Carbapenemases do tipo OXA-48) definidas pelo sistema de classificação de Ambler (Ivovlev e Doi, 2018).

Com a evolução da resistência aos carbapenêmicos foi necessária a utilização de drogas não comumente usadas na prática clínica devido à sua elevada toxicidade. Drogas comercializadas desde a década de 1950, a polimixina E (colistina E) e polimixina B são uma família de antibióticos polipeptídicos catiônicos com uma cadeia lateral de ácidos graxos lipídicos. As polimixinas são a última linha de tratamento antes da opção dos novos inibidores de beta-lactamase contra Gram-negativos multirresistentes. Entretanto, as polimixinas, bem como a tigecilina (outra droga usada contra ERC), não possuem as propriedades farmacocinéticas mais desejáveis, portanto a mortalidade de pacientes com infecções invasivas é alta. No entanto, os estudos apontam a rápida emergência de cepas resistentes às polimixinas, provavelmente este mecanismo associado ao uso da colistina como fator de crescimento na produção animal. Não obstante, a disseminação da resistência a estas drogas é

motivada principalmente pela disseminação do gene *mcr-1*, que confere resistência a polimixinas através de um elemento genético móvel, fato este que trouxe preocupação aos diversos órgãos de saúde do mundo inteiro e incentivou ainda mais a necessidade de novas drogas contra ERC (Gao *et al.*, 2016; Giamarellou *et al.*, 2016; Rodriguez-Baño *et al.* 2018, Amann *et al.*, 2019).

Entretanto, tem havido a inclusão de novas drogas antibacterianas como avibactam (novo inibidor de beta-lactamase), que, associadas a ceftazidima, podem auxiliar na ação frente a bactérias gram-negativas MDR. Avibactam apresenta ação inibitória em dois processos. Inicialmente ocorre uma ligação não covalente o sítio de ligação à beta-lactamase suscetível, seguida de uma acilação covalente no resíduo serina da beta-lactamase. Além disso, o avibactam apresentou uma característica peculiar em relação aos outros inibidores de beta-lactamase, por se ligar de forma reversível as beta-lactamase, permitindo sua ação em células adicionais de beta-lactamase. O avibactam se liga de maneira reversível às beta-lactamases, permitindo a sua ação cíclica de inibição de moléculas adicionais de beta-lactamase. Além do mais, o Avibactam tem se mostrado eficaz na inibição de enzimas da classe A, incluindo ESBL (enzima beta-lactamase de espectro ampliado) e KPCs (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenamase) e classe C, sem induzir a produção da AmpC cromossômica de forma significativa. No entanto, não apresenta ação frente aos diversos tipos de MBLs. Devido ao seu potencial inibidor destas enzimas, o avibactam foi então associado a uma cefalosporina de terceira geração, sendo recentemente aprovado pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA), (EMA) European Medicine Administration e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para tratamento de várias infecções por gram-negativos devido ao atual cenário de limitação nas opções terapêuticas contra este grupo de bactérias (Sharma *et al.*, 2016; Shirley, 2018; Van Duin *et al.*, 2018).

Humphries *et al.* (2015) descrevem o primeiro caso de resistência a ceftazidima/avibactam (CAZ/AVI) em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* em um paciente sem história de terapia com esta droga. Os mecanismos de resistência a esta droga, ainda não são totalmente entendidos, mas a deficiência de determinadas porinas com aumento da atividade efluxo, combinada com o aumento da expressão de blaKPC-3 e blaSHV-12, podem determinar um fenótipo e resistência a CAZ/AVI. Além disso, uma mutação do gene *blaKPC-2* também pode conferir a diminuição da susceptibilidade a esta droga, mas interessantemente esta mutação confere maior sensibilidade aos carbapenêmicos, quando comparados com a cepas *blaKPC-2* não mutada (Humphries *et al.* 2015; Nelson *et al.* 2017; Hemarajata e Humphries, 2019).

1.3 TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARBAPEMASES

A pesquisa de carbapenamase, principalmente em ambiente hospitalar tem grande importância para fins epidemiológicos, permitindo monitorar a evolução da disseminação de cepas MDR, sendo uma ferramenta auxiliar proteção contra eventuais surtos de bactérias resistentes aos medicamentos comumente utilizados. O surgimento de novas drogas como CAZ-AVI que não apresenta ação frente a beta-lactamases de classe B de Ambler, obrigou os laboratórios realizarem a pesquisa não só da presença carbapenemases, como também do tipo de carbapenamase quando detectada, devido a necessidade em determinar a potencialidade do uso desta droga. Vários métodos atualmente estão disponíveis para a identificação de carbapenemases, sendo eles fenotípicos ou moleculares, no qual sua realização é fundamental na seleção de pacientes que possam se beneficiar com a terapia de CAZ-AVI (Wong et al., 2017).

Os ensaios disponíveis podem ser fenotípicos ou moleculares para a detecção de bactérias produtoras carbapenamase. Os ensaios fenotípicos consistem em ensaios baseados no crescimento que verificam a resistência da micro-organismo, utilizando como base o crescimento de bactérias na presença de um antibiótico ou inibidores específicos de cada classe de beta-lactamase. Métodos como Teste de Hodge modificado, teste com inibidores podem ser utilizados, entretanto com sensibilidades e especificidades variadas. Além disso outros métodos têm sido apresentados na literatura como o método da inativação de carbapenêmicos e sua variante modificada (mCIM) (BRASIL, 2013; Tamma e Simmer *et al.*, 2018).

Entre os demais métodos fenotípicos, que são baseados em hidrólise de carbapenêmicos seguidos por reações colorimétricas que detectam o produto desta hidrólise que é catalisado por enzimas carbapenamase (Carba NP, Blue Carba). Mais recentemente métodos que utilizam o advento da espectrofotometria de massa com tempo de voo (MALDI-TOF MS) e finalmente testes imunocromatográficos que detectam enzimas carbapenamase através do uso de anticorpos específicos contra os principais tipos de carbapenemases como KPC, OXA-48 e NDM (Choquet *et al.*, 2018; Pancotto *et al.*, 2018)

Já os testes moleculares baseados em ácidos nucleicos, que identificam diretamente os determinantes moleculares da produção de carbapenamase. Diversos testes comerciais ou *in house* estão disponíveis para a identificação de genes dos diversos tipos de carbapenemases, incluindo PCR, microarray e sequenciamento do genoma completo. Entre estes está o I Check-Direct CPE assay (CDCPE, Holanda), o ensaio da Roche (Berlim, Alemanha) tem capacidade de detectar seis genes de carbapenamase e consiste em duas PCRs em tempo real

separadas que detectam os genes de NDM, OXA-48-like, KPC, GES, IMP VIM genes.

Algumas variantes como Hyplex® -MBL ID Multiplex PCR-ELISA (AmplexDiagnostics, Alemanha) combinam PCR multiplex com hibridização reversa em microplacas (Lupo *et al.*, 2013; Rood *et al.*, 2017).

Outro ensaio automatizado está o Carba-R (Cepheid, USA) que pesquisa os genes para as sequências de genes *blaKPC* (KPC), *blaNDM* (NDM), *blaVIM*(VIM), *blaOXA-48* (OXA-48) e *blaIMP-1* (IMP-1) em um sistema automatizado que integra a preparação de amostras, a extração e amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo utilizando ensaios de PCR em tempo real (Traczewki *et al.*, 2018).

Mais atualmente, os métodos através de NGS (do inglês *next generation sequencing*), que além de identificar os genes das carbapenemases, pode ser de grande importância no auxílio da prevenção e conhecimento de controle de cepas emergentes de micro-organismos com resistência a múltiplos antibióticos. O sequenciamento de genoma completo pode auxiliar na resposta de vários questionamentos sobre um determinado micro-organismo emergente, como presença de mutações evolutivas, patogenicidade, identificação de genes de resistência a antibióticos e avaliação da disseminação de determinados clones bacterianos, além de possibilitar o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas. Este tipo de análise possibilita descrever as características genéticas de um isolado de XDR-*Klebsiella pneumoniae* usando sequenciamento de genoma inteiro e avaliar o seu contexto clínico-epidemiológico e susceptibilidade a combinações de antibióticos (Aires, 2017; Vilela *et al.*, 2019).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 **Objetivo geral**

Relatar a presença dois isolados clínicos resistentes a Ceftazidima/Avibactam em Hospital de Santa Maria, RS, Brasil.

1.4.2 **Objetivos específicos**

- a) Realizar a identificação fenotípica e molecular dos isolados clínicos;
- b) Avaliar a presença de genes de carbapenemase nos isolados clínicos com resistência a CAZ-AVI;
- c) Avaliar o perfil de resistência dos isolados clínicos resistentes a CAZ-AVI aos diversos antimicrobianos;
- d) Descrever os mecanismos de resistência a CAZ-AVI na literatura