



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PECEU MAGYVE RAGAGNIN DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla*_{KPC-2}
EM *Serratia marcescens***

DOURADOS/MS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL
DA GRANDE DOURADOS

PECEU MAGYVE RAGAGNIN DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla*_{KPC-2}
EM *Serratia marcescens***

Trabalho de Conclusão de Curso III
apresentado à Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Simone
Simionatto.

Coorientadora: Msc. Kesia Esther Silva

DOURADOS/MS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O48i Oliveira, Peceu Magyve Ragagnin De

Isolamento e identificação molecular do gene blaKPC-2 em *Serratia marcescens* / Peceu Magyve Ragagnin De Oliveira -- Dourados: UFGD, 2016.
47f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Dra. Simone Simionatto

Co-orientadora: Msc. Kesia Esther Silva

TCC (graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Infecção hospitalar. 2. blaKPC-2. 3. Resistência bacteriana. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Peceu Magyve Ragagnin de Oliveira

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla*_{KPC-2}
EM *Serratia marcescens***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, com a comissão formada por:

Prof.^a Dr.^a Simone Simionatto
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Prof.^a Dr.^a Silvana Beutinger Marchioro
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências da Saúde

Msc. Nathalie Gaebler
Universidade Federal da Grande Dourados

Msc. Kesia Esther Silva
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, de Maio de 2016

Dedico este trabalho...

*A minha família, amigos, colegas de laboratório e a
minha orientadora pelo apoio, incentivo e confiança durante
a realização do mesmo.*

Agradecimentos

Venho com esse agradecimento lembrar de algumas pessoas que me apoiaram durante a graduação e o desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso.

Agradeço primeiramente a minha mãe Neide Ragagnin, por ser um exemplo de esforço e trabalho. Por todo apoio e confiança em mim investidos desde o começo da graduação, sem ela nada disso seria possível.

Aos meus irmãos Michel e Marcelo, pelo companheirismo, presença, confiança ou de qualquer outra forma me ajudaram durante a graduação.

À minha orientadora, Dra. Simone Simionatto, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, pelo voto de confiança no desenvolvimento desse trabalho e por todo conhecimento transmitido como orientadora e professora do curso de Biotecnologia.

À minha coorientadora Kesia Esther Silva, por ter sido minha guia no laboratório, ter me ajudado muito durante a realização dos experimentos e por todos os ensinamentos conduzidos durante a realização da pesquisa.

À Wirlaine Glauce Maciel (Nani), por sempre ter me ajudado e tirado qualquer dúvida quando eu precisei, sendo um exemplo no laboratório.

Aos meus melhores amigos, Matheus Fernandes, João Assis Gobbo, Elismary Martins (Mary), Renata Mello e José Lourenço, que sempre estiveram presentes durante o período de graduação. Sejam no dia-a-dia ou mesmo distantes, me

aconselhavam e me ajudavam de alguma forma a seguir em frente e não desistir.

Aos meus companheiros de laboratório do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular de Microrganismos, que sempre estiverem presentes e nunca negaram ajuda quando eu precisei.

Aos colegas da 3ª Turma de Biotecnologia, pela união e todos os momentos em que passamos juntos.

Aos professores, por todo o conhecimento e experiência passados a mim durante todo o período da graduação.

À Universidade Federal da Grande Dourados, ao CNP2 e a Fundect-MS, pelo espaço cedido, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

*"A reader lives a thousand
lives before he dies. The man
who never reads lives only one."*

George R. R. Martin

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Infecções Hospitalares	3
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	4
2.3. Antibióticos β-lactâmico	5
2.4. Resistência bacteriana	6
2.5. Produção de β-lactmases	8
2.5.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	9
3. Objetivos	12
3.1. Geral	12
3.2. Específicos	12
4. Material e métodos	13
4.1. Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-UFGD)	13
4.2. Coleta e isolamento das cepas bacterianas	13
4.3. Identificação microbiológica das enterobactérias produtoras de carbapenemases	13
4.4. Teste modificado de Hodge	14
4.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	14
4.6. Detecção do gene <i>bla</i>_{KPC-2}	14
5. Resultados	16
5.1 Identificação bacteriana	16
5.2 Teste modificado de Hodge	17
5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	18
5.4 Avaliação da presença do gene <i>bla</i>_{KPC-2}	20
6. Discussão	21
7. Conclusão	24
8. Referências	25
9. Anexos	32

Índice De Siglas e Abreviaturas

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Type Culture Collection* / Coleção de Cultura do tipo Americana
- bla* – Gene codificador das β -lactamases
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention / Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
- CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute* / Instituto de Padronização de Laboratório Clínico
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ERT – Ertapenem
- ESBL – β -lactamases de espectro estendido
- IMI – *Imipenem hydrolyzing β -lactamase*
- IMP – *Imipenase*
- IPM – Imipenem
- KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
- MBL – Metallo- β -lactamase
- MER – Meropenem
- MHT – Modified Hodge Test / Teste Modificado de Hodge (TMH)
- MIC – Minimum inhibitory concentration / Concentração Inibitória Mínima (CIM)
- MS – Mato Grosso do Sul
- NDM – *New Delhi metallo- β -lactamase*
- NMC – *Not metalloenzyme carbapenemase*
- OXA – Oxacilinase
- PCR – Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase
- SIM – *Seoul imipenemase*
- SME – *Serratia marcescens enzyme*
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva
- VIM – *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** – Sequência de *primers* utilizados para amplificação do gene *bla*_{KPC-2}. p. 15
- Tabela 2.** – Amostras clínicas das quais as cepas de *Serratia marcescens* foram isoladas. p. 16
- Tabela 3.** – Critérios utilizados para interpretação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) como sensível, intermediário ou resistente, respectivamente, segundo os critérios preconizados pelo CLSI (2015). p. 18
- Tabela 4.** – Variação da efetividade dos carbapenêmicos no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). p. 19
- Tabela 5.** – Resultado do perfil de sensibilidade das amostras de *Serratia marcescens* produtoras de carbapenemase frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem. p. 20

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** – Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos. p. 6
- Figura 2.** – Mecanismos de transferência horizontal de genes por células bacterianas. p. 7
- Figura 3.** – Mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas e os antibióticos afetados. p. 8
- Figura 4.** – Estrutura do transposon Tn4401. p. 11
- Figura 5.** – Número de pacientes com cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase distribuídas por grupos segundo faixas etárias de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS. p. 17
- Figura 6.** – Teste modificado de Hodge utilizando o antibiótico ertapenem (10 μ g/ml). Testes positivos (S3, S6 e S7), teste negativo (S2). p. 18
- Figura 7.** – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do resultado da amplificação por PCR do gene *bla*_{KPC-2} em cepas de *Serratia marcescens*. p. 21

RESUMO

Enterobactérias do gênero *Serratia* têm sido associadas a uma série de infecções hospitalares, principalmente do trato urinário e respiratório. Cepas de *Serratia* sp. já foram identificadas carreando enzimas carbapenemases, principalmente do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), a qual confere resistência aos antibióticos carbapenêmicos. Os genes codificadores de enzimas KPC estão localizados em estruturas genéticas móveis, o que permite a sua fácil disseminação entre bactérias da mesma e de outras espécies. Este trabalho teve como objetivo, identificar cepas de *Serratia marcescens* produtoras de carbapenemase do tipo KPC, isoladas de pacientes internados em um Hospital de ensino em Dourados/MS. As cepas bacterianas foram coletadas durante outubro de 2011 a maio de 2012 e identificadas pelo sistema automatizado Vitek®2 (BioMérieux). Cepas resistentes a carbapenêmicos foram submetidas ao teste modificado de Hodge e o perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos foi avaliado pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). A presença do gene *bla*_{KPC-2} foi avaliada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste estudo, foram identificadas 27 cepas de *S. marcescens*, provenientes de secreção traqueal, urocultura, hemocultura, swab retal, swab nasal, úlcera de decúbito e ponta de cateter. Destas, 96,29% apresentaram resultado positivo no teste modificado de Hodge, consideradas possivelmente produtoras de carbapenemases. Na determinação da CIM, 100% das cepas foram resistentes ao antibiótico ertapenem (>2 µg/mL) e imipenem (>4 µg/mL), 92,6% foram resistentes ao meropenem (>4 µg/mL). Das 27 cepas, 24 cepas (88,88%) apresentaram resultado positivo na PCR para o gene *bla*_{KPC-2}. Estes dados demonstram uma alta prevalência de cepas de *S. marcescens* produtoras de KPC em um Hospital de Ensino em Dourados/MS. Acredita-se que estes resultados irão contribuir para ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por microrganismos multirresistentes de interesse clínico.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, *bla*_{KPC-2}, Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Enterobacteria of the genus *Serratia* have been associated with a number of nosocomial infections, mainly in urinary and respiratory tract. Strains of *Serratia* sp. were identified with enzymes of carbapenemases, especially *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) type. This enzyme confers resistance to carbapenem antibiotics. KPC genes are located on mobile genetic structures, that allows its easy spreading among bacteria from the same and other species. This study aimed to identify strains of *Serratia marcescens* producing KPC carbapenemase type, that were isolated from patients admitted into a teaching hospital in Dourados/MS. The strains were collected during October 2011 to May 2012. They were identified by the automated system Vitek®2 (BioMérieux). The strains which were resistant to carbapenems, were subjected to the modified Hodge test. The sensitivity to carbapenems was evaluated by using minimum inhibitory concentration (MIC). The presence of *bla*_{KPC-2} gene was measured by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). In this study, it was identified 27 strains of *S. marcescens*, from tracheal aspirates, urine culture, blood culture, rectal swab, nasal swab, eschar and catheter. In these strains, 96.29% were positive in the modified Hodge test, being considered possibly producing carbapenemases. In the MIC determination, 100% of strains were resistant to imipenem (>2 µg/mL) and ertapenem (>4 µg/mL) antibiotics and 92.6% were resistant to meropenem (>4 µg/mL). In the total of 27 strains, 24 (88,88%) were positive by PCR for *bla*_{KPC-2} gene. These data demonstrate a high prevalence of strains of *S. marcescens* producing KPC in a teaching hospital in Dourados/MS. It is believed that these results will contribute to preventive actions in the control of nosocomial infections caused by multiresistant microorganisms of clinical interest.

Keywords: Nosocomial infection, *bla*_{KPC-2}, Bacterial resistance.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as infecções hospitalares são consideradas um grande desafio para os órgãos públicos, devido ao aumento das taxas de mortalidade e morbidade dos pacientes, tempos de internação prolongados e aumento de gastos para o sistema de saúde. A terapia antimicrobiana praticada, muitas vezes de forma indiscriminada, associada à falha nos protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar, resulta em um crescente número de microrganismos resistentes a diferentes classes de antibióticos. As infecções hospitalares são consideradas um problema, principalmente para pacientes imunocomprometidos e alojados em unidades de terapia intensiva, além de se tornar um desafio para o poder público na execução de ações de prevenção e controle de infecção nas instituições hospitalares (NORDMANN et al., 2012; OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008).

Bactérias da Família Enterobacteriaceae estão entre os patógenos mais comuns responsáveis por surtos ligados às infecções hospitalares, pois apresentam resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Os carbapenêmicos foram por muito tempo considerados medicamentos de última escolha na terapia contra infecções causadas por microrganismos Gram-negativos devido a sua estabilidade. Porém, o aumento significativo do uso terapêutico dos carbapenêmicos associado à exposição a outros medicamentos e a ausência de medidas de controle e prevenção adequadas, resultou em um crescente número de enterobactérias resistentes a esses compostos. (POIREL et al., 2007; NORDMANN et al., 2011).

Esta resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer devido à produção de enzimas do tipo carbapenemases. Sendo este um dos principais mecanismos de resistência bacteriana. Essas enzimas foram divididas, segundo Ambler et al. (1991), em quatro classes de acordo com a similaridade entre as sequências dos aminoácidos, sendo identificadas como classe A, B, C e D. Na classe A estão incluídas as enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbapenemases do tipo serina, como a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Na classe B estão as metalo- β -lactamases, como as NDM-1, IMP, VIM. Na classe C, encontram-se as cefalosporinas (AmpC) e na classe D, as oxacilinas, como a OXA-48.

A KPC é considerada a enzima mais frequente, sendo codificada pelo gene *bla*_{KPC} (YIGIT et al., 2001), o qual está inserido em uma estrutura genética móvel, o transposon Tn4401 (NAAS et al., 2008), que pode carrear vários genes de resistência, contribuindo para sua fácil disseminação (CUZON et al., 2010). Embora o gene *bla*_{KPC} tenha sido isolado

primeiramente em *K. pneumoniae*, o mesmo já foi encontrado em outros gêneros da Família Enterobacteriaceae, dentre eles bactérias do gênero *Serratia* spp (DIENSTMANN et al., 2010). Com o surgimento de vários surtos da KPC, esta passou a compor um importante mecanismo de resistência no contexto de infecção hospitalar mundial e a sua pesquisa se tornou um fator relevante a fim de restringir sua disseminação. Assim, o conhecimento do perfil de sensibilidade dessas cepas e seu modo de disseminação são de suma importância para auxílio na escolha do procedimento terapêutico adequado e para o monitoramento da disseminação dos microrganismos resistentes em ambientes hospitalares (DIENSTMANN et al., 2010).

O perfil de resistência dos microrganismos varia de acordo com a complexidade do hospital, características dos pacientes atendidos, doenças subjacentes e frequência do uso dos antimicrobianos nos ambientes hospitalares. Na região da grande Dourados observa-se a necessidade de realizar levantamentos sobre a ocorrência de cepas produtoras de carbapenemases, bem como intensificar as pesquisas com KPC na clínica médica, por ser uma região que atende pacientes de diversas cidades da região.

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização de cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase do tipo KPC, isoladas de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS, e contribuir para o monitoramento da ocorrência de cepas produtoras de KPC de interesse clínico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções Hospitalares

A infecção hospitalar é conceituada como qualquer infecção adquirida em ambientes hospitalares durante a internação ou após a alta do paciente, quando este esteve hospitalizado ou passou por procedimentos médicos (ANVISA, 2004). Ela contribui para maiores índices de morbidade e mortalidade, tempos de internação prolongados e alto custo. Quando causadas por bactérias multirresistentes representam um sério problema para o setor de saúde pública e ações de prevenção e controle de infecção nas instituições hospitalares devem ser tomadas, devido ao constante risco de propagação e resistência desses microrganismos (NORDMANN, 2009; OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008).

Os pacientes considerados mais susceptíveis aos quadros de infecções hospitalares são aqueles que passaram por algum procedimento invasivo, como a utilização de cateteres venosos ou urinários, procedimentos cirúrgicos e exposições a antibióticos por longos períodos (SINGH, et al. 2006). Um relatório divulgado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013) indicou que, nos Estados Unidos, as bactérias Gram-negativas são responsáveis por 36,3% das infecções hospitalares, onde as mesmas são as causadoras de infecções no trato urinário (59,3%), seguido da pneumonia associada à ventilação mecânica (47,2%) e infecções na corrente sanguínea (23,5%) (SIEVERT et al., 2013). Um relatório divulgado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2014) indicou que, no estado de São Paulo, as bactérias Gram-negativas estavam presentes em 47% dos microrganismos isolados em hemocultura. Nas unidades de terapia intensiva (UTIs) o número de infecções causadas por estes microrganismos é de aproximadamente 70% (PELEG, et al., 2010).

Dentre as bactérias multirresistentes, se destacam as Enterobacteriaceae. Elas são consideradas um problema frequente para a saúde pública devida sua prevalência em infecções hospitalares e seu alto potencial de resistência (AGUILAR, M. A. P., 2009). Assim, as infecções hospitalares causadas por Enterobacteriaceae são consideradas, de acordo com CDC, 2012, um desafio crescente para a comunidade médica.

2.2 Enterobacteriaceae

Os membros da Família Enterobacteriaceae são classificados como bastonetes Gram-negativos anaeróbicos facultativos, onde na maioria das espécies a locomoção é realizada por flagelo peritríqueo. Trata-se de um importante grupo bacteriano também conhecido como entérico. A maioria desses microrganismos são fermentadores ativos da glicose e de outros carboidratos e oxidase-negativos. (SHANMUGAM, 2013). As enterobactérias possuem fímbrias que permitem a aderência a superfícies ou membranas mucosas. Os *pili* sexuais auxiliam na troca de informação genética entre células, que frequentemente inclui resistência a antibióticos. Enterobactérias também produzem proteínas chamadas bacteriocinas, que causam a lise de espécies de bactérias intimamente relacionadas podendo ajudar a manter o equilíbrio ecológico de vários microrganismos no intestino (TORTORA et al., 2012).

É considerada a maior e mais heterogênea família de bacilos Gram-negativos relacionados a infecções hospitalares (KONEMAN et al., 2010). Sua principal característica é a resistência natural ou adquirida a antibióticos, podendo causar infecções urinárias, infecções do trato respiratório, gastrointestinal, bacteremias, septicemias, dentre outras (PITOUT, 2010). Os principais gêneros relacionados à infecção hospitalares são: *Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., dentre outros (BRATU et al., 2005).

Bactérias do gênero *Serratia*, estão presentes na água, solo, plantas, insetos e no intestino de homens e animais. As principais espécies são *S. marcescens*, *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* e *S. odifera*. (KHANAFARI, et al. 2006). Bactérias deste gênero são consideradas emergentes em infecções hospitalares em todo o mundo (POLLETT et al., 2014; PENA et al., 2014). Por serem importantes patógenos dotados de propriedades invasoras e com tendência de resistência a muitos antibióticos de uso comum, o seu estudo é considerado fundamental para melhoria dos indicadores de saúde (VASCONCELOS et al., 2006). *S. marcescens* é a espécie considerada mais importante, estando associada a uma variedade de infecções humanas, sobretudo a pneumonia e septicemia em pacientes imunocomprometidos (KONEMAN et al., 2010). Estes microrganismos já foram isolados de cateteres, soluções salinas para irrigação e outras soluções supostamente estéreis (MAHLEN, 2011).

2.3 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, caracterizam-se pela presença de um anel β -lactâmico em sua estrutura (Figura 1), o que é fundamental para sua atividade antimicrobiana. O espectro de ação dos β -lactâmicos inclui bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e espiroquetas. Não são ativos contra micoplasmas porque estes não apresentam parede celular. (BABIC, 2006).

Os β -lactâmicos atuam inibindo a síntese da parede celular das bactérias em crescimento, atuando na inibição da produção de peptidoglicano, que é um heteropolímero rígido e insolúvel na água, constituído por cadeias lineares de dois açúcares aminados: NAG (ácido n-acetilglucosamina) e NAM (ácido n-acetilmurâmico), ligados entre si por ligações glicosídicas. Os componentes do peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana citoplasmática para o espaço que existe entre esta e a parede celular (espaço periplasmático). Neste nível existem proteínas com atividade enzimática (transpeptidases e carboxipeptidases), responsáveis pelo estabelecimento de pontes interpeptídicas entre cadeias vizinhas de peptidoglicano em crescimento, denominadas de *Penicilin Binding Proteins* (PBPs). Os antibióticos ligam-se às PBPs e impedem a síntese do peptidoglicano causando sua lise osmótica. Especificamente, bloqueiam a reação de transpeptidação que ocorre fora da membrana celular, impedindo a união de cadeias que formam o mucopeptídeo da parede celular (MARCH, 2013; BABIC, 2006; MARÍN & GUDIOL, 2003).

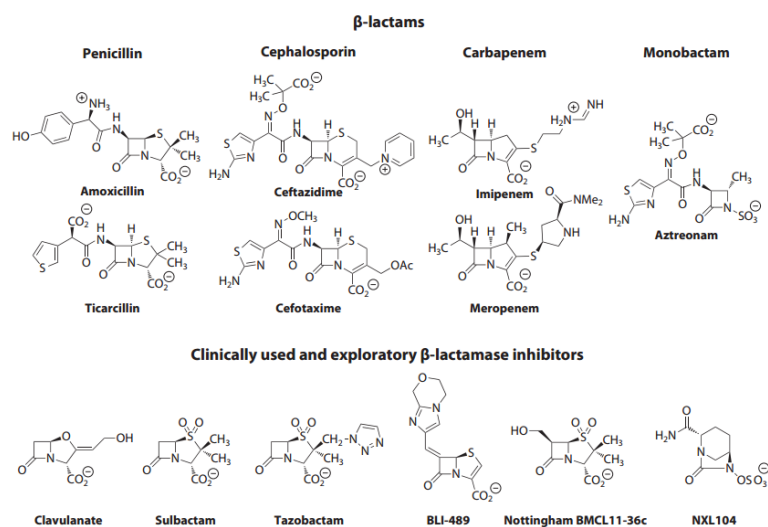


Figura 1. – Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos.*

*Fonte: Adaptado de Bush e Fisher, 2011.

A emergência de enterobactérias resistentes a β -lactâmicos constitui um dos principais desafios enfrentados pelo sistema de saúde, devido ao alto índice de disseminação desses microrganismos. Torna assim necessário o estudo para a identificação de mecanismos de resistência bacteriana (NORDMANN, 2009; OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008).

2.4 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana refere-se a um fenômeno biológico natural de espécies a modificações no ambiente, no entanto, com a introdução e uso irregular de agentes antimicrobianos na prática médica, observou-se um aumento no índice de resistência antimicrobiana no mundo inteiro (WANNMACHER, 2004).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é resultante da genética, estrutura e fisiologia normal do micro-organismo. Já na resistência adquirida ocorre uma modificação na informação genética do micro-organismo, devido ao recebimento de elemento móvel com algum gene de resistência, tornando-o assim resistente a algum antibiótico que anteriormente era eficaz (ALANIS, 2005).

Os genes de resistência bacteriana aparecem muitas vezes associados a elementos genéticos móveis, como: plasmídeos (elementos extracromossomais circulares que se autorreplicam e podem ser transferidos para outra célula por conjugação); *transposons* (sequências de DNA que tem a capacidade de se mover dentro do genoma e também realizarem conjugação); *integrons* (elementos de DNA que adquirem e mobilizam genes contidos em cassetes) e os bacteriófagos (vírus que infectam células bacterianas). (CARATTOLI, 2009).

A forma mais comum de adquirir resistência é através da aquisição de DNA exógeno, também conhecido como transferência horizontal de genes. Os mecanismos envolvidos são: transformação, onde a bactéria adquire DNA do meio-ambiente; transdução, processo mediado por bacteriófagos que ao recombinar o seu material genético com o DNA bacteriano, adquirem genes de resistência bacterianos, transportando-os no seu genoma e transferindo-os para outras bactérias quando as infectam e conjugação, transferência de plasmídeos ou outros elementos conjugativos entre células de cepas ou espécies bacterianas diferentes (FURUYA, 2006). Esses mecanismos são exemplificados na Figura 2.

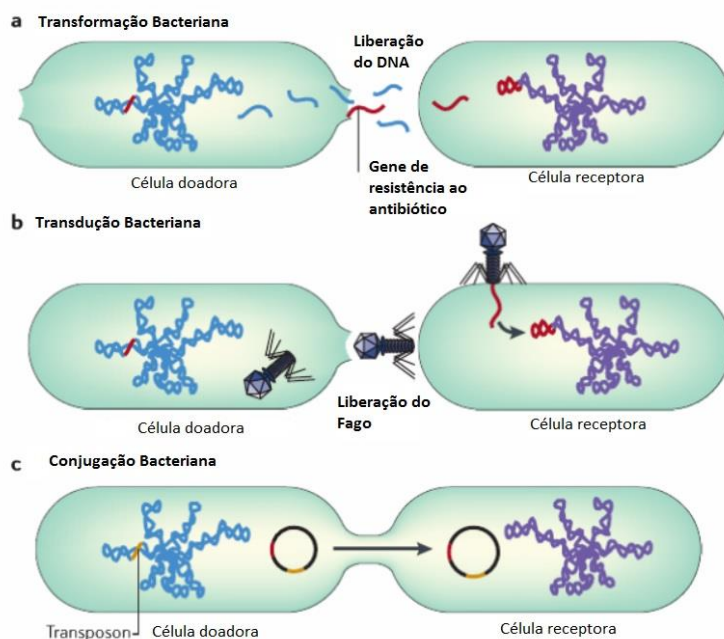


Figura 2. – Mecanismos de transferência horizontal de genes por células bacterianas.*

*Fonte: Adaptado de Furuya & Lowy, 2006.

Com a prática da terapia antimicrobiana os mecanismos de resistência a β -lactâmicos tornaram-se cada vez mais comuns, principalmente em ambientes hospitalares. Esses mecanismos incluem: perda ou expressão reduzida de porinas, que são proteínas localizadas na membrana externa responsáveis pelo transporte de substâncias para o interior da célula, que impede a entrada do antibiótico na célula. Hiper-expressão de bombas de efluxos, são sistemas que realizam a expulsão do antibiótico do interior da célula para o meio extracelular. Alteração do sítio alvo, uma mutação genética que altera o sítio alvo do antibiótico, não afetando o funcionamento da bactéria. Produção de proteínas β -lactamases com atividade enzimática e capacidade de inativar ligações químicas dos compostos β -lactâmicos. Nas bactérias Gram-negativas encontram-se no espaço periplasmático e inativam o antibiótico antes de atingir a membrana citoplasmática (COTRIM, et al., 2012; PELEG, et al., 2010). Na Figura 3 estão esquematizados alguns desses mecanismos.

Carbapenêmicos pertencem ao grupo dos β -lactâmicos de agentes antimicrobianos, que causam a lise celular das bactérias através da inibição da síntese da parede celular bacteriana (SHANMUGAM, 2013). Por conta disso, os carbapenêmicos foram por muito tempo considerados medicamentos de escolha na terapia contra infecções causadas por microrganismos Gram-negativos devido a sua estabilidade frente a essas enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (QUEENAN & BUSH, 2007). No entanto, o aumento significativo do uso terapêutico dos antibióticos carbapenêmicos, associado à

exposição a outros medicamentos e a ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar, permitiu a emergência de enterobactérias resistentes a este grupo de antibióticos (POIREL et al., 2007; NORDMANN et al. 2011).

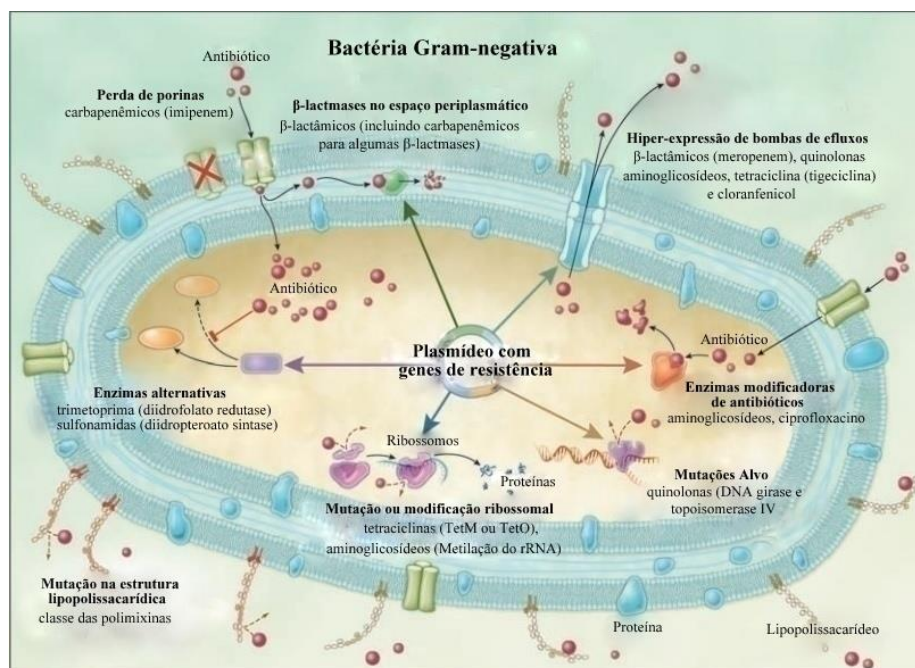


Figura 3. – Mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas e os antibióticos afetados.*
*Fonte: Adaptado de: Peleg, et al. 2010.

2.5 Produção de β -lactamases

A hidrólise de antimicrobianos pelas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas.

As enzimas β -lactamases foram divididas em quatro classes de acordo com a similaridade entre as sequências dos aminoácidos, sendo identificadas como classes A, B, C e D. Na classe A, estão incluídas as enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbapenemases do tipo serina, como a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Na classe B, as metalo- β -lactamases, como as NDM-1, IMP, VIM. Na classe C, encontra-se as cefalosporinas (AmpC) e na classe D, as oxacilinas, como a OXA-48 (AMBLER et al., 1991).

A outra classificação vigente se baseia na atividade enzimática, sendo as β -lactamases divididas em três grupos: O grupo 1, pertence às cefalosporinas, classificadas na classe molecular C; O grupo 2, é formado pelas enzimas pertencentes ao grupo A e D de

Ambler e; O grupo 3, é constituído pelas enzimas metalo- β -lactamases (MBLs) (BUSH & JACOBY, 2010).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas que conferem resistência a várias classes de antibióticos, como cefalosporinas e penicilinas (NORDMANN e POIREL, 2002; POIREL et al., 2007). As ESBLs destroem o anel β -lactâmico do antibiótico, inativando-o e conferindo assim a resistência (MARCH, 2013). O mecanismo responsável pela resistência à classe de antibióticos carbapenêmicos é a produção de carbapenemases, como metalo- β -lactamases (MBLs) e KPC. Os genes que codificam as enzimas β -lactamases encontram-se em constante mutação, em resposta à pressão seletiva exercida pelos antibióticos utilizados no controle de microrganismos produtores de diferentes β -lactamases. Contribuindo assim para uma fácil disseminação de cepas multirresistentes no ambiente nosocomial (NOYAL et al., 2009). Desta forma, a sua contenção é um grande desafio para os serviços de controle de infecção hospitalar, além de tudo, o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro associado à transmissão horizontal entre os pacientes, aumentam as taxas de resistência bacteriana, o que acaba limitando a escolha das opções terapêuticas disponíveis (COTRIM, et al., 2012).

2.5.1 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

A KPC tem a capacidade de inibir a ação de todos os antibióticos β -lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) (MAMMINA et al, 2012; SHANMUGAM, 2013). Ela é considerada a enzima clinicamente mais encontrada desse grupo, sendo codificada pelo gene *bla_{KPC}* (NORDMANN et al, 2011) e foi isolada primeiramente em *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001) na região da Carolina do Norte em 1996 (KITCHEL, 2009). Devido à grande capacidade de mobilidade deste gene codificador de carbapenemases, em virtude dos elementos transferíveis que codificam essa enzima, há uma maior disseminação da KPC, constituindo a sua contenção um grande desafio para os serviços de controle de infecção hospitalar (NORDMANN et al., 2009; RASMUSSEN, 2007).

Embora o gene *bla_{KPC}* tenha sido isolado primeiramente em *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001) o mesmo já foi relatado em outros gêneros da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Serratia* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus Mirabili* e *Raoultella* spp. (WENDT et al, 2010; CHEN et al, 2011; SHANMUGAM et al, 2013).

Dezesseis variantes do gene KPC já foram descritos e classificados em ordem numérica sequencial de *bla*_{KPC2} a *bla*_{KPC17} (WANG et al., 2014.), sendo KPC-2 e KPC-3 as mais frequentes e têm sido relatadas e associadas com surtos epidêmicos em várias regiões pelo mundo, inclusive no Brasil (CUZON, et al., 2010; NAAS, et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; NORDMANN et al. 2009).

No Brasil, o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras da KPC-2 foi em 2006, isoladas de quatro pacientes hospitalizados em uma UTI de Recife (MONTEIRO et al., 2009). Um mês depois, foi publicado outro relato da KPC-2 encontrada em seis isolados de *K. pneumoniae* em dois hospitais do Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009). Desde então, vários relatos da KPC surgiram nos estados brasileiros. No estado do Mato Grosso do Sul o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtoras da KPC, foi em 2010 (CHANG et al., 2013).

Os genes relacionados à KPC estão frequentemente inseridos em uma estrutura genética móvel, o transposon Tn4401, o qual pode carrear vários genes relacionados à resistência, entre eles os que codificam para as enzimas da classe A (NMC, IMI, SME, GES e KPC) (NAAS et al., 2008), Classe B (NDM-1, VIM, IMP, GIM, e SIM) (YONG et al., 2009) e Classe D (OXA) (QUEENAN, 2007).

O transposon Tn4401 pertence à família Tn3 e serve como suporte genético para o gene *bla*_{KPC}. Ele tem 10kb em tamanho e apresenta, além do gene *bla*_{KPC}, duas sequências de repetição invertidas (IRR e IRL), o gene da transposase, proteína que catalisa o movimento da estrutura para outra região no genoma. O gene da resolvase, que é o repressor da transposase. Duas sequências invertidas, ISKpn6 e ISKpn7, com uma deleção de 100 a 200 bp que determina as variantes do transposon Tn4401 (NAAS, 2008). A figura 4 representa o transposon Tn4401 e a origem da mobilização do gene *bla*_{KPC}.

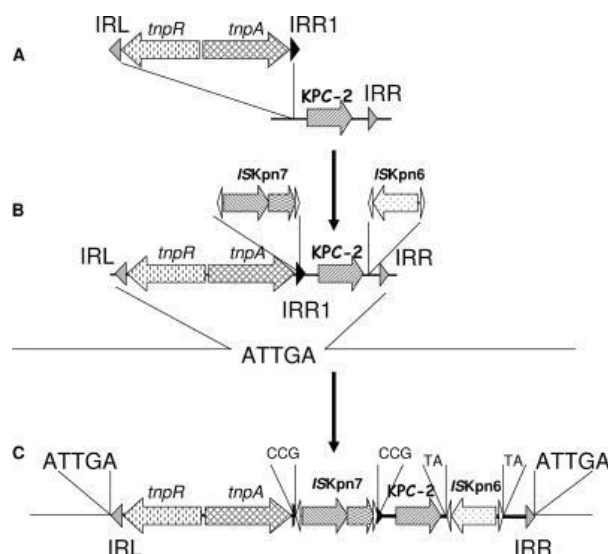


Figura 4. – Estrutura do transposon Tn4401*

*Fonte: Adaptado de Naas, et al. 2008.

Devido ao aparecimento de vários surtos relacionados à KPC, esta enzima tornou-se um mecanismo de resistência muito importante em relação às infecções hospitalares mundialmente. Devido à facilidade que o gene *bla_{KPC}* pode ser transmitido por elementos transferíveis entre várias espécies da Família Enterobacteriaceae, torna imprescindível a pesquisa e identificação da KPC para a compreensão do curso de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas, a fim de restringir sua disseminação e o uso de antibióticos β -lactâmicos em ambientes hospitalares (NORDMANN et al., 2011), contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade dos pacientes infectados (DIENSTMANN, et al., 2010).

Vários estudos já foram realizados relatando surtos de bactérias do gênero *Serratia* spp. produtoras de carbapenemase ao redor do mundo (MAHLEN, 2011; POLLETT et al., 2014; PENA et al., 2014; LIN et al., 2016). Em um levantamento de vigilância realizado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2014), espécies de *S. marcescens* eram responsáveis por 3,5% das pneumonias e 2,7% das infecções da corrente sanguínea adquiridas em UTI. No Brasil, relatos de *S. marcescens* multirresistentes ainda são escassos (RIBEIRO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013; MARGARETE et al., 2015). E recentemente, no estado do Mato Grosso do Sul, foi descrito um surto de *S. marcescens* (SILVA et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização fenotípica e molecular de cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS, buscando contribuir para o monitoramento da ocorrência de cepas produtoras de KPC de interesse clínico.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase do tipo KPC em amostras clínicas;
- Identificar cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase através do Teste modificado de Hodge;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos carbapenêmicos pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Identificar a presença do gene *bla*_{KPC-2} através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Determinar a eficiência da detecção de carbapenemases pelo Teste Modificado de Hodge, utilizando-se da detecção do gene *bla*_{KPC-2} pela PCR como comparativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-UFGD)

Este estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), com o número do parecer 130.754/2012 (Anexo A).

4.2 Coleta e isolamento das cepas bacterianas

As cepas bacterianas foram coletadas de outubro de 2011 a maio de 2012 e foram isoladas de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS.

Dados sobre a identificação bacteriana, coleta das amostras, ala de isolamento, amostra clínica e faixa etária dos pacientes foram coletados utilizando os registros do Laboratório de Análises Clínicas do hospital.

4.3 Identificação das enterobactérias produtoras de carbapenemases

A identificação e o perfil de sensibilidade das cepas bacterianas foram determinados pelo sistema automatizado Vitek[®]2 (bioMérieux, Hazelwood, MO). As cepas que apresentaram resistência aos antibióticos carbapenêmicos, segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), foram incluídas no estudo e submetidas aos demais testes.

4.4 Teste modificado de Hodge

Todas as cepas de *S. marcescens* que apresentaram resistência aos carbapenêmicos foram submetidas ao teste modificado de Hodge, utilizando o antibiótico ertapenem (sensibilidade e especificidade de 90%). O teste modificado de Hodge foi realizado da seguinte forma: preparou-se uma suspensão de 0,5 da escala de McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922 em solução salina 0,9% a qual foi inoculada em uma placa contendo ágar Mueller Hinton, com auxílio de um swab estéril. Foi colocado um disco de ertapenem (10 ug/mL) no centro da placa. Com o auxílio de uma alça de platina, estrias foram feitas em linha reta em direção do disco para as extremidades da placa, utilizando quatro cepas bacterianas para cada placa. As placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 36 °C, e então foram avaliadas as distorções nos halos de inibição. Foram utilizadas como cepas

padrão para o teste *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1706 (como controle negativo) e *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1705 (como controle positivo).

4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, seguindo as padronizações estabelecidas pelo CLSI (2015). As CIMs de antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) foram testadas em diferentes faixas de concentração, variando entre 128 a 0,25 µg/mL. As cepas foram inoculadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 36 °C por 24 horas. Após este período a CIM foi registrada como sendo a menor concentração em que o agente antimicrobiano inibiu completamente o crescimento do micro-organismo.

4.6 Detecção do gene *bla_{KPC-2}*

Para a etapa de caracterização molecular foram desenhados *primers* para a amplificação do gene *bla_{KPC-2}* com o auxílio do proGrama Vector NTI®11 (Invitrogen). Os isolados de *S. marcescens* foram semeados em ágar MacConkey e submetidos à extração de DNA utilizando QIAamp DNA minikit® (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante, sendo armazenado a -20 °C.

A avaliação da presença do gene *bla_{KPC-2}* foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme descrito por Monteiro et al. (2009), com algumas modificações. As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 50 µL, contendo 2 U de DNA Taq polimerase, 50 pmol de cada *primer*, 200 µM de cada DNTP, 1 x tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂ e 10-50 ng de DNA. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (MyCycler Bio RAD) nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 5', seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45'', anelamento a 55 °C por 40'', extensão a 72 °C por 40'' e extensão final a 72 °C por 7'.

Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience). O resultado foi observado sob luz ultravioleta, fotografado e o padrão de bandas observado. A Tabela 1 demonstra a sequência de *primers* utilizados para amplificar o gene *bla_{KPC-2}*.

A presença do gene *bla_{KPC-2}* foi confirmada pelo sequenciamento, utilizando *primers* específicos (SILVA et al., 2015).

Em três cepas isoladas de *S. marcescens* foi realizada a PCR para a detecção de outros dois genes (*bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados para amplificação do gene *bla_{KPC-2}*.

Primer	Sequência
<i>bla_{KPC-2} Forward</i>	5' TCTGGACCGCTGGGAGCTGG 3'
<i>bla_{KPC-2} Reverse</i>	5' TGCCCGTTGACGCCCAATCC 3'

5. RESULTADOS

5.1 Identificação bacteriana

No período de outubro de 2011 a maio de 2012, 139 cepas de enterobactérias com perfil resistente ou intermediário a cefalosporinas de terceira geração foram isoladas de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS. Dentre os isolados, 27 (20%) foram identificadas como *S. marcescens*, sendo provenientes de diferentes amostras clínicas. As fontes de infecções que obtiveram maior número de cepas isoladas foram secreção traqueal (37%), seguido de urocultura (25,92%), hemocultura (11,11%), amostras de swab retal, swab nasal e úlcera de decúbito (7,40%) e ponta de cateter (3,70%). Dos 27 isolados 19 (70,3%) foram considerados patógenos de infecção e 8 (29,7%) foram considerados colonizações. Esse resultado pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. – Amostras clínicas das quais as cepas de *Serratia marcescens* foram isoladas.

Amostras Clínicas	Número de Isolados (%)	Infecção	Colonização
Secreção traqueal	10 (37 %)	9	1
Urocultura	7 (25,92 %)	7	-
Hemocultura	3 (11,11 %)	3	-
Swab retal	2 (7,40 %)	-	2
Swab nasal	2 (7,40 %)	-	2
Úlcera de decúbito	2 (7,40 %)	-	2
Ponta de cateter	1 (3,70 %)	-	1
Total	27 (100 %)	19 (70,3%)	8 (29,7%)

As cepas foram recuperadas de 19 pacientes, onde 13 (68,42%) pacientes eram do sexo masculino e 6 (31,58%) do sexo feminino. A prevalência de *S. marcescens* foi maior em pacientes com faixa etária acima dos 60 anos (47,36%) e na faixa etária entre 0-15 anos (21%) conforme pode ser observado na Figura 5. Todos os pacientes estavam hospitalizados em diferentes Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) incluindo 15 (79%) internados em UTI adulta, 2 (10,5%) na UTI neonatal e 2 (10,5%) em UTI pediátrica.

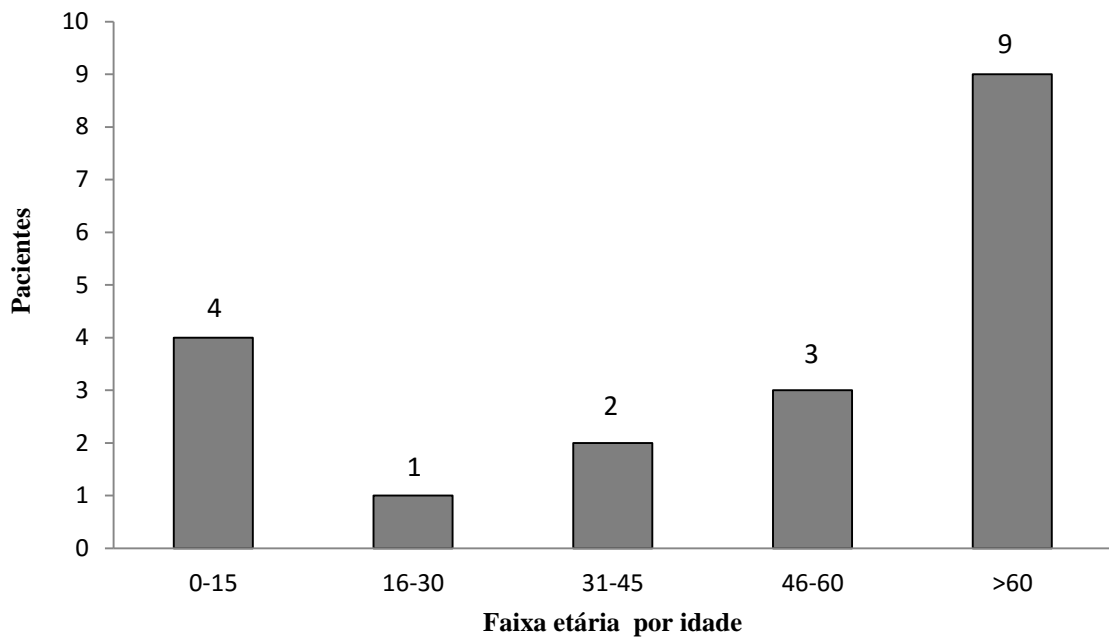


Figura 5. – Número de pacientes com cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase distribuídas por grupos segundo faixas etárias de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS.

5.2 Teste modificado de Hodge

No teste modificado de Hodge, das 27 cepas de *S. marcescens*, 26 (96%) obtiveram resultado positivo, indicando que as cepas são possivelmente produtoras de carbapenemases. A Figura 5 apresenta o resultado do teste modificado de Hodge de quatro cepas de *S. marcescens*, sendo que uma delas apresentou resultado negativo.

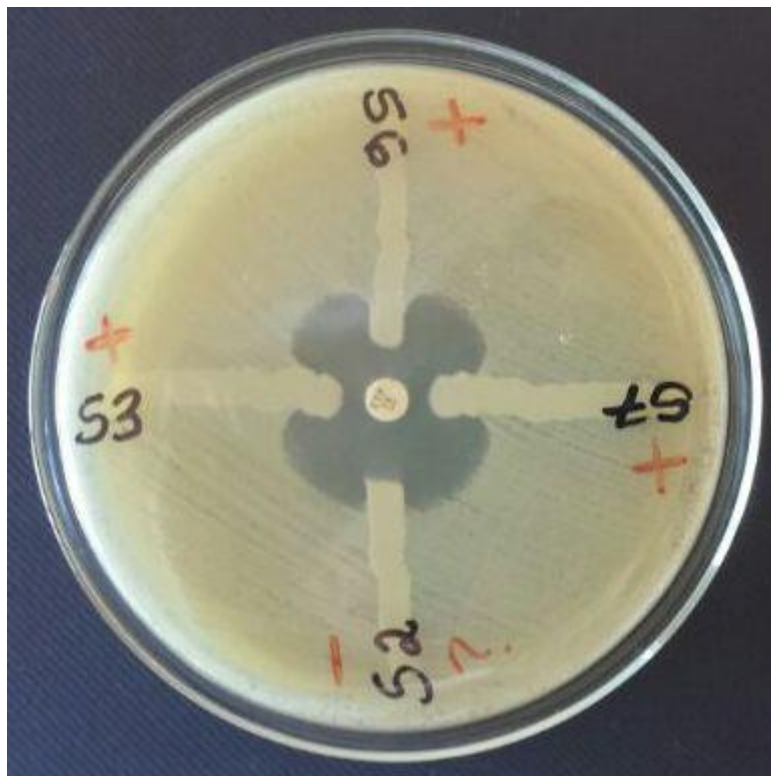


Figura 6. – Teste modificado de Hodge utilizando o antibiótico ertapenem (10 µg/ml). Testes positivos (S3, S6 e S7), teste negativo (S2).

5.3 Concentração Inibitória Mínima

A avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada, seguindo as padronizações estabelecidas pela CLSI (2015), conforme a tabela 3.

Tabela 3. Critérios utilizados para interpretação da CIM (µg/mL) como sensível, intermediário ou resistente, respectivamente, recomendados pelo CLSI (2015).

Agentes Carbapenêmicos	Interpretação da CIM (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ertapenem (ERT)	<0,5	1	≥2
Imipenem (IPM)	<1	2	≥4
Meropenem (MER)	<1	2	≥4

Os três agentes microbianos testados demonstraram diferente efetividade entre si. A tabela 4 apresenta a variação na efetividade destes carbapenêmicos obtida a partir dos resultados da CIM.

Tabela 4. Variação da efetividade dos carbapenêmicos no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e resultados obtidos no Teste Modificado de Hodge e na Avaliação da presença do gene *bla_{KPC-2}*.

Paciente n°	Cepa n°	MIC (µg/ml) do carbapenem			TMH	<i>bla_{KPC-2}</i>
		IPM	MEM	ETP		
1	3365	64	128	64	+	+
2	4063	64	64	64	+	+
2	4093	64	64	64	+	+
3	5474	8	8	16	+	+
4	7804	32	32	32	+	+
5	137	16	8	16	+	+
5	2918	16	16	16	+	+
5	3011	4	8	16	+	+
6	2459	8	8	16	+	+
6	3927	16	16	6	+	+
7	2865	16	32	16	+	-
8	4168	4	8	32	+	+
9	4930	32	32	32	+	-
10	5049	2	4	32	+	+
11	2170	8	32	32	+	+
12	2685	8	16	32	+	+
13	2983	16	64	64	+	-
13	5230	16	8	32	+	+
13	7426	32	128	64	+	+
14	3081	16	64	64	-	+
14	44	16	64	16	+	+
15	4093	32	64	64	+	+
15	1517	4	64	32	+	+
16	933	2	8	4	+	+
17	2886	4	4	64	+	+
18	3258	32	128	32	+	+
19	3567	16	64	16	+	+

IPM, imipenem; MEM, meropenem; ETP, ertapenem.

TMH, teste modificado de Hodge.

No teste da CIM, a maioria das cepas de *S. marcescens* foram resistentes frente aos antibióticos ertapenem, imipenem e meropenem com 100%, 92,6% e 100% de resistência, respectivamente, conforme pode ser avaliado na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado do perfil de susceptibilidade das amostras de *S. marcescens* produtoras de carbapenemase frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem.

Sensibilidade das amostras n (%)	Agentes Carbapenêmicos		
	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
Resistentes	27 (100%)	25 (92,6%)	27 (100%)
Intermediários	-	2 (7,4%)	-
Sensíveis	-	-	-
Total	27	27	27

5.4 Avaliação da presença do gene *bla*_{KPC-2}

Dentre os 27 isolados de *S. marcescens*, que foram submetidos a técnica da PCR, 24 cepas (88,88%) apresentaram resultado positivo para a presença do gene *bla*_{KPC-2} e 3 (11,12%) apresentaram resultado negativo. Estes resultados indicam que 11,12% das cepas de *S. marcescens*, apresentam perfil de resistência a carbapenêmicos no teste modificado de Hodge e CIM, no entanto, não eram produtores da KPC, indicando a presença de outro possível mecanismo de resistência. Com estas três cepas negativas foi realizada a PCR para a detecção de outros dois genes (*bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}), onde 2 apresentaram resultado positivo para o gene *bla*_{SHV} e 1 isolado apresentou resultado positivo para a presença do gene *bla*_{TEM}. A Figura 6, demonstra o resultado do PCR de 5 cepas de *S. marcescens* avaliadas neste estudo.

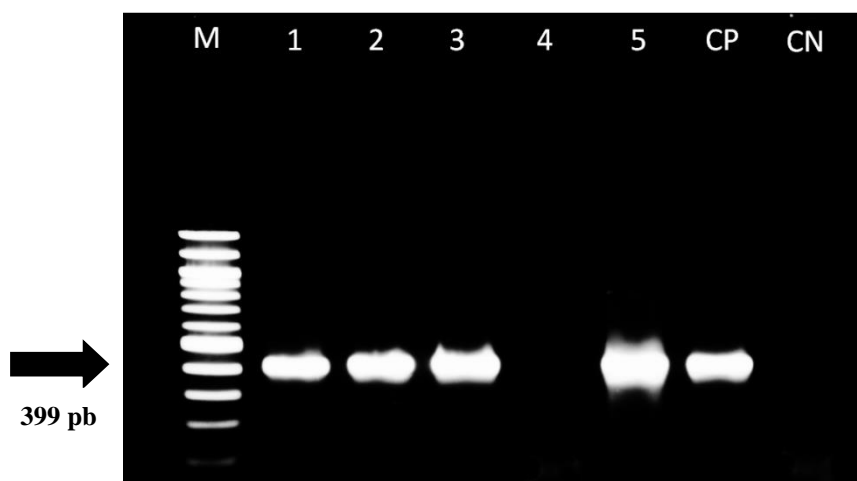


Figura 7. – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do resultado da amplificação por PCR do gene *bla*_{KPC-2} em cepas de *S. marcescens*. Colunas 1, 2, 3, 5 cepas de *S. marcescens* com resultado positivo; Coluna 4, cepa de *S. marcescens* com resultado negativo. Coluna M, marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (sigma); coluna CP, controle positivo da reação; coluna CN, controle negativo da reação. A seta indica o produto amplificado de 399 pb referente ao gene *bla*_{KPC-2}.

6. DISCUSSÃO

As infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes são um grande desafio para a saúde pública, devido ao aumento das taxas de mortalidade e morbidade dos pacientes, tempos de internação prolongados e aumento de gastos para o sistema de saúde (NORDMANN et al., 2012). Dentre esses microrganismos destaca-se a *S. marcescens*, sendo esta considerada emergente em infecções hospitalares em todo o mundo (POLLETT et al., 2014; PENA et al., 2014), devido suas propriedades invasoras e sua capacidade de apresentar resistência intrínseca a diversos antibióticos. Assim, a identificação de mecanismos de resistência em *S. marcescens* é considerado fundamental (VASCONCELOS et al., 2006). Diante disso, neste estudo propôs-se a avaliação de cepas de *S. marcescens* produtoras de carbapenamase do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase (KPC) isoladas de pacientes internados em um Hospital de Ensino em Dourados/MS. Durante o período de 8 meses foram identificadas 27 cepas de *S. marcescens*, sendo que 24 destas cepas (88,88%) foram identificadas como produtoras de KPC.

A prevalência de *S. marcescens* foi maior em indivíduos com faixa etária acima dos 60 anos (47,36%), em um estudo realizado por Alves et al. (2013), foi observado que 50% dos pacientes se encontravam na faixa etária de 51 a 71 anos. Já no estudo de Kim et al. (2015) 47% dos pacientes apresentava faixa etária acima dos 65 anos. Provavelmente o índice foi maior em pacientes idosos devido à deficiência imunológica e a presença de outras enfermidades apresentadas por estes pacientes (NIELSSON, et al., 2014)

Foi observado que as amostras clínicas com mais isolados de *S. marcescens* foram a secreção traqueal (37%) seguido da urocultura (25,92%), esta última causada provavelmente pelo uso de cateteres urinários (PELEG, et al., 2010). Estes resultados concordam com um estudo anterior realizado por Kim et al. (2015), o qual relatou que as principais portas de infecções causadas por *S. marcescens* foram pelo trato respiratório inferior (50%), seguido pelo trato urinário (20,4%). Dentre os 27 isolados, 19 (70,3%) foram considerados patógenos de infecção e 8 (29,7%) foram considerados colonizações, esse alto índice de infecção está relacionado a alta virulência e poder de invasão do microrganismo estudado (MAHLEN, 2011).

Para analisar os mecanismos de resistência antimicrobiana, testes fenotípicos e moleculares foram realizados. Neste trabalho, o teste modificado de Hodge foi utilizado para avaliar se a sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos detectada pelo teste de triagem era

causada pela produção de carbapenemases. É importante salientar que o teste modificado de Hodge é um teste fenotípico com sensibilidade e especificidade de 90% e detecta carbapenemases em geral, não sendo específico para KPC (NORDMANN et al, 2012; BARTH & RIBEIRO, 2012). O teste modificado de Hodge (TMH) apresenta uma fácil execução, porém o resultado demanda de 24 a 48 horas. Enterobactérias produtoras de β -lactamases do tipo ESBL associados à perda ou expressão reduzida de porina ou hiperexpressão de bombas de efluxo podem apresentar resultados falso-positivos no TMH e também a detecção de carbapenemases do tipo NDM é considerada fraca por este método (PELEG, et al., 2010; NORDMANN et al, 2012). Neste estudo, dos 27 isolados de *S. marcescens*, 26 (96%) obtiveram resultado positivo, indicando assim a possível produção de carbapenemases. No único isolado que não foi considerado possível produtor de carbapenemase foi identificada a presença do gene *bla_{KPC-2}*, indicando que o gene codificador para KPC não estava sendo expresso durante a realização do TMH. Mesmo com um resultado positivo no TMH, torna-se necessário a realização de técnicas moleculares para confirmar a presença do gene de resistência. Desta forma, o TMH pode ser utilizado apenas na triagem da detecção da atividade de carbapenemases, sendo útil como uma das etapas iniciais de controle de surtos causados por microrganismos produtores de carbapenemases (NORDMANN et al, 2012).

Todas as cepas avaliadas foram resistentes ao ertapenem e ao meropenem, e 92,6% das cepas foram resistentes para o imipenem. Esses resultados foram semelhantes aos apresentados por Zhou et al. (2013), que descreveram 95,2% de resistência ao ertapenem e 90,4% imipenem, diferindo apenas no meropenem, com 66,7% de resistência.

Para a determinação da presença do gene de resistência *bla_{KPC-2}*, foi utilizado a técnica da PCR que é considerada padrão ouro para a identificação e diferenciação de carbapenemases, devido a sua excelente sensibilidade e especificidade, tendo como principal desvantagem o alto custo e a necessidade de profissionais treinados para sua realização. (NORDMANN, et al. 2012).

Através da PCR foi possível identificar que, 88,88% das cepas avaliadas foram positivas para a presença do gene *bla_{KPC-2}*, evidenciando a alta prevalência de *S. marcescens* produtoras da KPC em um Hospital de Ensino de Dourados/MS. Ao todo, 3 (11,12%) cepas de *S. marcescens* apresentaram perfil de resistência aos carbapenêmicos no TMH e CIM, mas obtiveram resultados negativo para o gene *bla_{KPC-2}*. Este dado indica que outros fatores de resistência a carbapenêmicos podem estar presentes nestas cepas, considerando que bactérias

da Família Enterobacteriaceae podem apresentar diferentes mecanismos de resistência, como perda ou expressão reduzida de porinas e hiper-expressão de bombas de efluxos, bem como a presença de outras enzimas β -lactamases nessas cepas como, IMP, VIM, NDM, GES, SME, TEM, OXA, ESBL e AmpC (COTRIM, et al., 2012; PELEG, et al., 2010). Assim, outros estudos poderão ser conduzidos nessas cepas para a identificação de outras β -lactamases e a identificação de outros mecanismos de resistência.

Já foram descritos vários estudos reportando a presença da KPC em enterobactérias no Brasil (BIBERG et al. 2015; AREND et al. 2015; FREIRE et al. 2015; MELO et al. 2014; TAVARES et al. 2015; ANDRADE et al. 2011; SILVA et al., 2016). No entanto, relatos de *S. marcescens* multirresistentes no Brasil ainda são escassos (RIBEIRO, et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013; MARGARETE et al., 2015). Recentemente um estudo realizado no Brasil descreveu um surto de *S. marcescens* co-produtoras de IMP-10 e KPC (SILVA et al., 2015). Considerando o número crescente de cepas multirresistentes relacionadas a infecções hospitalares sendo relatado em todo o país, nosso estudo mostra-se relevante, pois indica a emergência de cepas *S. marcescens* resistentes produtoras de carbapenemase em um Hospital de Ensino em Dourados/MS, indicando a importância da criação de medidas de controle e prevenção da disseminação das mesmas no ambiente hospitalar.

7. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciam a presença de cepas de *S. marcescens* produtoras da KPC em um Hospital de Ensino em Dourados/MS, indicando que medidas de controle e prevenção da disseminação de cepas multirresistente no ambiente nosocomial devem ser aprimoradas, uma vez que ha poucas opções terapêuticas disponíveis para esta espécie bacteriana, o que culmina com altas taxas de mortalidade dos pacientes infectados. Os resultados obtidos com esta pesquisa darão subsídio para ações de vigilância em saúde, além de informações úteis para a melhoria dos serviços de controle de infecção hospitalar.

8. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/introducao.pdf>

AGUILAR, M.A.P. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. Tese (Mestrado em Análises Clínicas). São Paulo: **Universidade de São Paulo**, p.10-12, 2009.

ALANIS, A.J. Resistance to Antibiotic: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, 36:697-705, 2005.

ALVES, A.P. e BEHAR, P.R.P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 57 (3): 213-218, 2013.

AMBLER, R.P. et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal**, p. 269-270, 1991.

ANDRADE, L. N. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 3579–3583 July 2011.

AREND, L. N. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different facilities in Southern Brazil. **American Journal of Infection Control**. Vol. 43 137-40, 2015.

BABIC, M.; HUJER, A.M.; BONOMO, R.A. What's new in antibiotic resistance? Focus on B-lactamases. **Drug Resistance Updates**, 9:142-156, 2006.

BARTH, A.F; RIBEIRO, V.B. Teste de Hodge modificado na detecção de KPC: um procedimento a ser aperfeiçoado ou esquecido? **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 1, p. 26, 2012.

BRATU, S.; LANDMAN, D.; ALAM, M.; TOLENTINO, E.; QUALE, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 776-778, 2005.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Update functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 3969-3976, 2010

BUSH, K. e FISHER, J.F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 65:455-478, 2011.

CARATTOLI, A. Resistance Plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 53, No. 653, p. 2227–2238, 2009.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (**CRE Toolkit**), 2012.

Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” – CVE **Análise dos dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica das Infecções Hospitalares do Estado de São Paulo**, 2014. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/IH15_DADOS_2014_APRESENTACAO.pdf

CHANG, M.R. et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla_{KPC}* gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, n. 1, p. 3, 2013.

CHEN, L. et al. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection and Classification of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene (*bla_{KPC}*) Variants. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 579–585, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI document M100-S21**, 2015.

COTRIM, E.R. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase– KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. **Revisão de literatura**, p. 20, 2012.

CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase *bla_{KPC}*-2 gene. **Emerging Infection Diseases** 16:1349–1356, 2010.

DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial**. v. 46, n. 1, p. 23-2, 2010.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report 2014 – Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections, Stockholm, Sweden, 2014.

FREIRE, M.P. et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* in cancer patients. **European Journal of Clinical Microbiological Infection Disease** 34:277–286, 2015.

FURUYA, E.Y.; LOWY, F.D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Reviews Microbiology** 4, 36-45 January 2006.

GUIMARÃES, A. C. G. et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing anIncK plasmid containing *bla*_{KPC-2}. / **International Journal of Antimicrobial Agents** 42, 367–378, 2013.

KHANAFARI, A. et al. Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. **Online Journal of Biological Sciences** 6 (1): 1-13, 2006.

KIM, S.B. et al. Risk Factors for Mortality in Patients with *Serratia marcescens* Bacteremia. **Yonsei Medical Journal** Volume 56 Number 2 March 2015.

KITCHEL, B. et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 53, n. 8, p. 7, 2009.

KONEMAN, E.W et al. Diagnóstico Microbiológico - 6ª edição, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010.

LIN X. et al. Emergence of *Serratia marcescens* isolates possessing carbapenem-hydrolysing b-lactamase KPC-2 from China. **Journal of Hospital Infection**. dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.04.006, 2016.

MAHLEN, S. D. *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 24 No. 04 p. 755–791, 2011.

MAMMINA, C. et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital. **European Surveillance**, v. 33, n.17, 2012.

MARCH, M. F .B. P. Pneumococcal Antimicrobial Resistance to B-Lactam Antibiotics. **Pulmão RJ**;22(3):9-13, 2013.

- MARÍN, M.; GUDIOL, F. Antibióticos β -lactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 21 (1): 42-55, 2003.
- MARGARETE, E. et al. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 57(4):359-360, July-August, 2015.
- MELO, R. C. A. Presence of *fim_H*, *mrk_D*, and *irp2* Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology** 69:824–831, 2014.
- MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.53:333–334, 2009.
- NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 14, n. 52, p. 1257-1263, 2008.
- NIELSSON, M. S. et al. Mortality in elderly ICU patients: a cohort study. **The Acta Anaesthesiologica Scandinavica Foundation**. 58: 19–26, 2014.
- NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**. 18: 432–438, 2012.
- NORDMANN, P. et al. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infection Diseases** 9:1791–1798, 2011.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**. 9:228–36, 2009.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram negatives aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 31, 2002.
- NOYAL, M.J.C. et al. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. **Indian Journal Medical Research**, p. 707-712, 2009.
- OLAITAN, A.O. et al. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, Volume 5, Article 643, November 2014.
- OLIVEIRA, R. e MARUYAMA, S.A.T. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 2., 2008.

PATEL, G. BONOMO, R.A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. 9:555–70, 2011.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 63, n 2, p. 265–258, 2009.

PELEG, A.Y. et al. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**, vol 362:1804-1813, 2010.

PENA, I. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents** 43, 460–464, 2014.

POLLETT, S. et al. Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology** , Volume 52, Number 11, p. 4003– 4009, 2014.

PITOUT, J.D.D. The latest threat in the war on antimicrobial resistance. **Lancet Infectious Diseases**, p. 578-579, 2010.

POIREL, L. et al. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**. 2: 501–12, 2007.

QUEENAN, A.M. e BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. **Journal Clinical Microbiology** p. 440-458, 2007.

RASMUSSEN, J.W. e HØIBY, N. Class A carbapenemases - **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (2007) 60, 470–482, 2007.

RIBEIRO V. B. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology** 62:1721–1727, 2013.

SIEVERT, D.M et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control and Hospital Epidemiology** vol. 34, no. 1, January 2013.

- SILVA, K.E et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Watch out for surgery. **Journal of Medical Microbiology**. doi: 10.1099/jmm.0.000254. Março, 2016.
- SILVA, K.E et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**. 53(7): 2324–2328 Julho, 2015.
- SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-530.gt, 2006.
- SHANMUGAM, P.et al. blaKPC gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. ;7(12):2736-8. doi: 10.7860/JCDR/2013/7759.3747. Dezembro, 2013.
- TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos 3ª ed. **Atheneu**, São Paulo. p. 79, 2001.
- TAVARES, C. P. et al. Molecular epidemiology of KPC-2–producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 82 326–330, 2015.
- TORTORA, G.J et al. Microbiologia – 10ª ed, Porto Alegre: **Artmed**, 2012.
- VASCONCELOS, F.F. et al. Perfil de resistência da bactéria da espécie *Serratia marcescens* isolada de infecções hospitalares no Hospital Geral de Fortaleza (H.G.F.), **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 38(1): 35-37, 2006.
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **ISSN 1810-0791** Vol. 1, N° p. 1, 2004.
- WENDT, C. et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) - producing *K. pneumoniae* in Germany. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, p. 563–57, 2010.
- WANG, D. et. al. Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis of the KPC Variants, KPC-2 and Its Recently Discovered Variant KPC-15. **PLOS ONE** Volume 9, Issue 10 e111491, 2014.
- YIGIT, H. et al. Novel carbapenem - hydrolyzing β -lactamase, KPC - 1, from a carbapenem - resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . p. 1151-1161, 2001.

YONG, D. et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vol. 53 no. 12 5046-5054, 2009.

ZHOU, T. et al. Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Non-Susceptible Enterobacteriaceae from a Teaching Hospital in Wenzhou, Southern China. **Japanese Journal of Infectious Diseases.**, 66, 96-102, 2013.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS/UF GD-MS											
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP												
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA												
Título da Pesquisa: Epidemiologia Molecular de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemase Isoladas em um Hospital de Ensino de Dourados-MS.												
Pesquisador: Simone Simionatto												
Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.												
Versão: 2												
CAAE: 05666812.3.0000.5160												
Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIV. FEDERAL DA GRANDE DOURADOS HOSPITAL												
DADOS DO PARECER												
Número do Parecer: 130.754												
Data da Relatoria: 09/10/2012												
Apresentação do Projeto:												
<p>O presente projeto propõe realizar um estudo de epidemiologia molecular de cepas de Enterobactérias produtoras de KPC isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário HU) da Universidade Federal da Grande Dourados (UF GD). Os resultados obtidos com as técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico e estudo de doenças infecciosas de origem hospitalar serão associados com a prevalência dos agentes envolvidos nestas enfermidades. Através da revisão de prontuários de pacientes internados no hospital será possível identificar os fatores de riscos associados à infecção ou colonização por micro-organismos multirresistentes de interesse clínico. Também serão realizadas investigações sobre a relação entre a gravidade dos pacientes e a aquisição dos isolados resistentes, a influência do tempo de exposição ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes infecciosos. Acredita-se que estes estudos possam contribuir para traçar medidas de contenção adequadas bem como para evitar futuros surtos de infecção dentro do ambiente hospitalar, contribuindo desta forma com ações de vigilância em saúde e consequentemente reduzindo os gastos do Sistema Único de Saúde com internações provenientes destes problemas.</p>												
Objetivo da Pesquisa:												
Estudar a ocorrência de Enterobactérias produtoras de carbapenemase (KPC) isoladas de pacientes												
<table border="0"> <tr> <td>Endereço: Rua João Rosa Góes, 1761</td> <td>CEP: 79.825-070</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Vila Progresso</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: MS</td> <td>Município: DOURADOS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (67)3410-2328</td> <td>Fax: (67)3411-3637</td> </tr> <tr> <td></td> <td>E-mail: cep@ufgd.edu.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua João Rosa Góes, 1761	CEP: 79.825-070	Bairro: Vila Progresso		UF: MS	Município: DOURADOS	Telefone: (67)3410-2328	Fax: (67)3411-3637		E-mail: cep@ufgd.edu.br
Endereço: Rua João Rosa Góes, 1761	CEP: 79.825-070											
Bairro: Vila Progresso												
UF: MS	Município: DOURADOS											
Telefone: (67)3410-2328	Fax: (67)3411-3637											
	E-mail: cep@ufgd.edu.br											



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UF GD-MS



atendidos no Hospital Universitário de Dourados, visando identificar os fatores de riscos associados a aquisição de infecções causadas por estas bactérias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos benefícios parece ser uma proposta que possibilitará auxiliar ações de vigilância em saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante e os resultados da pesquisa podem contribuir com ações de vigilância em saúde no HU.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicitou dispensa do TCLE, justificando que os dados serão coletados por funcionários do HU, não havendo contato com os pacientes. Além disso, cita também a dificuldade de localizar os pacientes triados para a pesquisa.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Aprovado.

DOURADOS, 25 de Outubro de 2012

Assinador por:

Rosilda Mara Mussury Franco Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua João Rosa Goes, 1761
Bairro: Vila Progresso CEP: 79.825-070
UF: MS Município: DOURADOS
Telefone: (67)3410-2328 Fax: (67)3411-3637 E-mail: cep@ufgd.edu.br