

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Luany de Oliveira Hinkel

**AVALIAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO BLUE-CARBA COM INIBIDORES
ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASES**

Florianópolis

2021

Luany de Oliveira Hinkel

**AVALIAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO BLUE-CARBA COM INIBIDORES
ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina TCC II do Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jussara Kasuko Palmeiro

Florianópolis

2021

Hinkel, Luany de Oliveira
AVALIAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO BLUE-CARBA COM
INIBIDORES ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE METALO-BETA
LACTAMASES / Luany de Oliveira Hinkel ; orientadora,
Jussara Kasuko Palmeiro, 2021.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. MBLs. 3. Método Colorimétrico. 4. EDTA.
5. Ácido dipicolínico. I. Palmeiro, Jussara Kasuko. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

Luany de Oliveira Hinkel

**AVALIAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO BLUE-CARBA COM INIBIDORES
ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASES**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de setembro de 2021.

Prof. (a) Liliete Canes Souza Cordeiro, Dr. (a)
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. (a) Jussara Kasuko Palmeiro, Dr. (a)
Orientador (a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. (a) Cleonice Maria Michelin, Dr. (a)
Avaliador (a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Farm. (a) Caetana Paes Zamparette, Dr. (a)
Avaliador (a)
Hospital Governador Celso Ramos / UFSC

Este trabalho é dedicado à minha família, amigos e à
Universidade pública e de qualidade.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente minha mãe Lucimar, que fez possível eu ter essa caminhada até aqui, juntamente com Vilson, Vitor e Fernando pelo apoio e todo o suporte para que eu pudesse realizar o sonho de estudar na Universidade Federal de Santa Catarina.

À minha orientadora, Jussara Kasuko Palmeiro pela dedicação, apoio, e paciência em meio a tantas dificuldades devido ao período de pandemia, durante toda a realização desse trabalho, pela confiança e auxílio no equipamento e materiais utilizados para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia do HU pela disponibilidade dos isolados. E ao Marcos André Schörner por ceder seus isolados.

Aos professores, servidores e à universidade, por todo aprendizado e acolhimento.

Aos amigos, em especial Isabelle, Maria Helena, Francieli, Gustavo, Pâmela, Kharol, Jaqueline e Suzana que fiz nesse período que se tornaram minha família durante esses anos, que mesmo com a distância estiveram presentes.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho e fizeram parte das minhas experiências pessoais e profissionais nesses anos.

RESUMO

Métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases de baixo custo, que apresentem facilidade na execução e rapidez no tempo de resposta são extremamente necessários na rotina de laboratórios de Microbiologia da área hospitalar. Neste trabalho foi avaliado o método colorimétrico BLUE-CARBA com adição de inibidores enzimáticos ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) e ácido dipicolínico (DPA) para detectar isolados produtores de metalo- β -lactamase (M β L). Ao total foram testados 150 isolados resistentes aos carbapenêmicos, molecularmente caracterizados quanto ao mecanismo de resistência. Foram incluídas diversas espécies entre *Enterobacteriales* e bacilos gram-negativos não-fermentadores de glicose, sendo 71 isolados produtores de M β L (*bla*_{NDM}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} + *bla*_{KPC}), 61 isolados produtores de serino-carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-16}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}) e 18 isolados não produtores de carbapenemases. Os resultados se mostraram com 97% de sensibilidade e 94% de especificidade para DPA e 91% para EDTA na detecção das M β L, 96% de sensibilidade e especificidade de 96% para DPA e EDTA na detecção das KPC. Houve uma detecção de 100% de especificidade para não produtores de carbapenemases. Não teve detecção para as serino-carbapenemases de classe D OXA-23, OXA-48, OXA-58, OXA-143. Além de haver uma interferência nos resultados com coprodução enzimática como VIM+KPC e NDM+KPC. Determinar a classe enzimática entre as carbapenemases na rotina laboratorial tem sido impreterível, especialmente pela recente aprovação pela ANVISA de um novo antimicrobiano ceftazidima-avibactam, o qual não apresenta atividade contra isolados produtores de M β L.

Palavras-chave: M β L; Método colorimétrico; EDTA; Ácido dipicolínico; NDM, IMP, VIM

ABSTRACT

Phenotypic methods for detecting low-cost carbapenemases, which are easy to perform and quickly respond without a response time, are extremely fast in the routine of microbiology laboratories in the hospital area. In this work, the BLUE-CARBA colorimetric method with addition of enzyme inhibitors ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA) and dipicolinic acid (DPA) to detect metallo- β -lactamase (M β L) was evaluated. In total, 150 points resistant to carbapenems were tested, molecularly characterized as to the mechanism of resistance. There were several species among Enterobacterales and non-glucose fermenting gram-negative bacilli, being 71 concession produced from M β L (*bla*_{NDM}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} + *bla*_{KPC}), 61 isolates producing serine-carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-16}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}) and 18 cover non-carbapenemase producers. The results differentiated with 97% sensitivity and 94% specificity for DPA and 91% for EDTA for detecting M β L, 96% for and 96% specific for DPA and EDTA for detecting KPC. There was a detection of 100% specificity for non-carbapenemase producers. There was no detection for class D serine-carbapenemases OXA-23, OXA-48, OXA-58, OXA-143. There is also an interference in the results with enzymatic co-production such as VIM + KPC and NDM + KPC. Determining the enzyme class among carbapenemases in laboratory routine has been imperative, especially due to the recent approval by ANVISA of a new antimicrobial ceftazidime-avibactam, which has no activity against M β L winners.

Keywords: M β L; Colorimetric method; EDTA; Dipicolinic acid; NDM, IMP, VIM

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mecanismos de resistência bacteriana	14
FIGURA 2 – Classificação molecular e funcional das β -lactamases	15
FIGURA 3 – Posição das soluções na placa.....	20
FIGURA 4 – Critérios interpretativos do método BLUE-CARBA.....	21
FIGURA 5 – Realização do teste com produtores carbapenêmicos e não carbapenêmicos	26
FIGURA 6 – Realização do teste com isolados M β Ls.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados bacterianos carregadores dos genes produtores e não produtores de carbapenemases	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- RAM – Resistência Antimicrobiana
- MDR – Multirresistentes aos Antimicrobianos
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PBPs – Proteína de Ligação das Penicilinas
- MβLs – Metallo-beta-lactamases
- EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético Dissódico
- DPA – Ácido Dipicolínico
- TAT – Tempo de Resposta do Teste
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- TSA – Ágar Trípico de Soja
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- NaOH – Hidróxido De Sódio
- Tienam® – Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 METODOLOGIA.....	18
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	18
3.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	18
3.4 RECUPERAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	18
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE USO PARA O MÉTODO COLORIMÉTRICO – BLUE-CARBA.....	18
3.6 PROCEDIMENTO DO TESTE	19
3.7 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO.....	26
7 REFERÊNCIAS.....	30
APÊNDICE A – Isolados Seleccionados.....	33
ANEXO A – Roteiro POP	37

1 INTRODUÇÃO

Uma das maiores descobertas para a saúde pública está relacionada aos antimicrobianos, pois antes dessa descoberta, doenças infecciosas acometiam a sociedade e eram uma das maiores causas de morte. Os antimicrobianos salvaram milhões de vidas, trazendo uma revolução na medicina. No entanto, há alguns anos, uma ameaça crescente vem prejudicando a eficácia desses fármacos: a resistência antimicrobiana (RAM) que é definida como a capacidade do microrganismo sobreviver a concentrações do antimicrobiano (ALÓS, 2015). A RAM é um desafio mundial associado à alta morbidade e mortalidade. Perfis multirresistentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas resultam em um difícil tratamento ou mesmo em infecções intratáveis com antimicrobianos convencionais (AKOVA, 2016).

Essa resistência tem gerado grandes problemas de saúde pública nas últimas décadas. O custo econômico da RAM é significativo. Na Europa em 2007 o número de infecções por bactérias multirresistentes aos antimicrobianos (MDR) foi de 400.000, e ocorreram 25.000 mortes atribuíveis (BUSH *et al.*, 2011). As despesas associadas a essas infecções em termos de custos hospitalares extras e perdas de produtividade ultrapassaram € 1,5 bilhão a cada ano. Já nos Estados Unidos, as infecções por microrganismos MDR são responsáveis por US \$ 20 bilhões ao ano em custos excessivos de saúde, US \$ 35 bilhões ao ano em custos sociais (BUSH *et al.*, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de “patógenos prioritários” para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, na qual se incluem 12 famílias de bactérias que ameaçam a saúde humana. O grupo de prioridade crítica inclui bactérias MDR que têm importância clínica principalmente em hospitais, casas de repouso e em pacientes submetidos a processos invasivos, como cateterização, ventilação mecânica, entre outros. Esse grupo de patógenos inclui *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacterales*, tais como *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Tais bactérias podem produzir infecções graves como bacteremia, sepse e pneumonia e estão associadas a elevados índices de morbidade e mortalidade (ANVISA, 2020a).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos ocorre por diversos mecanismos, como alteração da estrutura ou permeabilidade da membrana, alteração do sítio de ação do fármaco, por hiperexpressão de bomba de efluxo e por inibição do fármaco por ação enzimática, sendo este o mais preocupante, devido ao potencial de disseminação (ANVISA, 2020a) (FIGURA 1).

Mecanismos de resistência bacteriana

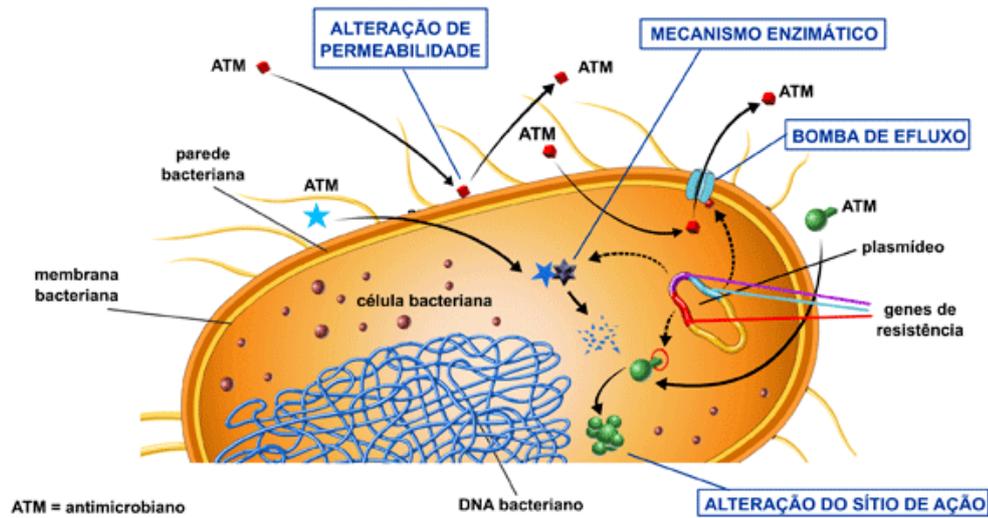


FIGURA 1 – Mecanismos de resistência bacteriana

(ANVISA, 2007)

A modificação/inativação enzimática do antimicrobiano é o principal mecanismo de resistência em bacilos gram-negativos. Têm sido descritas milhares de enzimas que podem degradar ou modificar antimicrobianos de diferentes classes. Existem três estratégias químicas que as enzimas utilizam para promover a inativação do antimicrobiano: transferência de grupos químicos (que ocorre em diferentes classes de fármacos), mecanismos de oxidação (que ocorre com as tetraciclínas) e hidrólise (que ocorre principalmente com os β -lactâmicos) (ANVISA, 2020a).

As β -lactamases são as enzimas de maior importância, uma vez que inativam os β -lactâmicos, principal grupo de antimicrobianos utilizado na prática clínica (GAZIN et al., 2012). Elas constituem um grupo diverso de enzimas e estão amplamente distribuídas entre bactérias gram-positivas e negativas, sendo o mais importante mecanismo de resistência em bactérias gram-negativas. Esse fato se deve ao acúmulo dessas enzimas no espaço periplasmático das bactérias gram-negativas, enquanto em gram-positivas essas enzimas são liberadas para o meio externo. Isso faz com que a inativação do antimicrobiano seja mais efetiva em gram-negativos, antes de sua ligação às proteínas de ligação das penicilinas (PBPs) na membrana citoplasmática (ANVISA, 2020a).

As β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo assim, o local onde os β -lactâmicos ligam-se às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. Essas enzimas são codificadas por genes localizados em cromossomos ou em sítios extracromossômicos como plasmídeos, transposons, integrons e seqüências de inserção,

podendo ser produzidas de modo constitutivo ou induzido e por estarem nesses elementos com mobilidade facilita a disseminação (ANVISA, 2020a) .

As carbapenemases representam a família mais versátil das β -lactamases, com uma amplitude de espectro incomparável com outras enzimas hidrolíticas (QUEENAN; BUSH, 2007). Elas pertencem a duas principais famílias moleculares, as metalo-beta-lactamases (classe B) e as serino-carbapenemases (classe A e D) (FIGURA 2).

As carbapenemases de classe A têm a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam; todas são inibidas por boronatos e avibactam, podendo algumas serem inibidas por clavulanato. Elas são classificadas no subgrupo funcional 2f, onde estão as enzimas KPC, BKC, GES-5, GES-16, NMC, IMI e SME (AMBLER, 1991; QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH, 2013) (FIGURA 2).

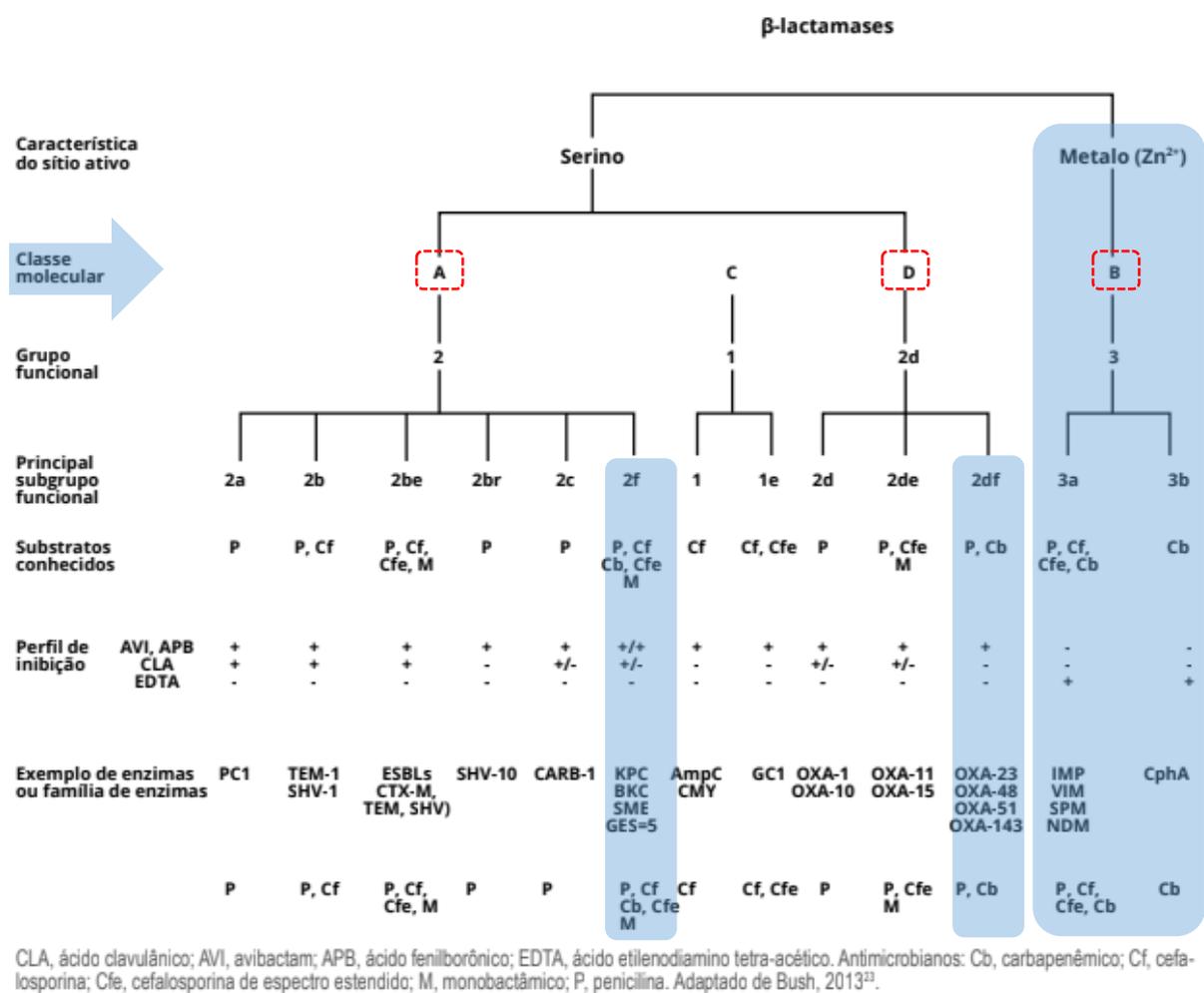


FIGURA 2 – Classificação molecular e funcional das β -lactamases, destacando as carbapenemases (ANVISA, 2020a)

As carbapenemases de classe D são conhecidas como oxacilinas e fazem parte do subgrupo funcional 2df e têm uma grande variabilidade nas sequências de aminoácidos. São em geral fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e EDTA (QUEENAN; BUSH, 2007).

As metalo-beta-lactamases (MβLs) são divididas em 2 grupos funcionais 3ae 3b. O mecanismo de hidrólise é dependente da interação do β-lactâmico com os íons zinco no sítio ativo da enzima, por isso substâncias quelantes de metal a exemplo EDTA, ácido 2-mercaptopropiônico, ácido mercaptoacético e ácido dipicolínico (DPA) inibem a atividade das MβLs (QUEENAN; BUSH, 2007). As enzimas mais encontradas no Brasil são NDM, SPM, IMP e VIM (ANVISA, 2020a).

A detecção de carbapenemases na rotina laboratorial é realizada por meio de testes fenotípicos, entre eles: teste do disco combinado com inibidores enzimáticos, testes colorimétricos, teste da inativação de carbapenêmico e testes imunocromatográficos de fluxo lateral. Apenas dois desses testes apresentam um menor tempo de resposta do teste (TAT), em torno de 10 min a 2 h, trata-se dos testes colorimétrico e imunocromatográfico de fluxo lateral (ANVISA, 2020a). O método colorimétrico consiste no uso de um tampão contendo indicador de pH (vermelho de fenol ou azul de bromotimol) e imipenem para detectar a hidrólise desse carbapenêmico por ação de uma carbapenemase, a qual promove a acidificação do meio e assim a mudança de cor. Dessa forma, o teste determina somente se o isolado bacteriano é produtor de carbapenemase, mas não distingue a classe (ANVISA, 2020a).

O impacto das enzimas carbapenemases cada vez mais presentes no ambiente hospitalar (BUSH, 2013), torna extremamente necessária a disponibilidade de testes fenotípicos para identificá-las o mais rápido possível. Sendo importante especialmente nas infecções graves, quando antimicrobianos de amplo espectro estão sendo usados extensivamente (AKOVA, 2016).

Além disso, com o advento de bactérias MDR, novos antimicrobianos estão sendo desenvolvidos para ter ação contra isolados produtores de carbapenemases. Entre eles, ceftazidima-avibactam recentemente aprovado pela ANVISA não tem ação contra bactérias produtoras de MβLs, sendo extremamente necessário identificar essa classe enzimática.

Nesse contexto, a concepção deste trabalho foi avaliar o BLUE-CARBA, um método colorimétrico rotineiramente utilizado em diversos laboratórios de Microbiologia no Brasil e no mundo, capaz de detectar carbapenemases dentro de 10 min a 2 h. Foi proposto uma modificação no tampão do teste com a adição de inibidores enzimáticos para permitir a detecção de MβLs, visto que atualmente não é um protocolo amplamente difundido nos laboratórios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o teste colorimétrico BLUE-CARBA com o uso de inibidores enzimáticos para detecção de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de bacilos gram-negativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o método BLUE-CARBA para detecção de metalo-beta-lactamases utilizando ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) e o ácido dipicolínico (DPA) como inibidores enzimáticos;
- Analisar a acurácia do método BLUE-CARBA entre *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, produtores e não-produtores de carbapenemases;
- Comparar os resultados do método BLUE-CARBA com inibidores enzimáticos com a presença dos genes codificadores de carbapenemases detectados por reação em cadeia da polimerase (PCR).

3 METODOLOGIA

Tratou-se de um estudo experimental exploratório quantitativo.

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) do Departamento de Análises Clínicas - ACL/CCS/UFSC.

3.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Foram selecionados isolados molecularmente caracterizados por PCR, quanto à presença de genes codificadores de enzimas β -lactamases do banco de microrganismo do Laboratório de Microbiologia da Unidade do Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – ULAC/HU/UFSC/EBSERH. Foram cedidos isolados produtores de serino-carbapenemases KPC (SCHÖRNER, 2016) e isolados não produtores de carbapenemases (PALMEIRO *et al.*, 2019).

3.4 RECUPERAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos criopreservados foram semeados em meio de ágar chocolate ou ágar sangue e incubados em estufa $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 h. Um segundo cultivo foi realizado em ágar tríptico de soja (TSA) e incubado em estufa $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 h para em seguida realizar os testes.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE USO PARA O MÉTODO COLORIMÉTRICO – BLUE-CARBA

A preparação do tampão base BLUE-CARBA foi realizado a partir do protocolo já de (PIRES *et al.*, 2013), a qual consiste na mistura de 80 mL de água destilada estéril, 4 mL de solução de sulfato de zinco 10 mM, 2 mL de solução de Azul de Bromotimol a 2% em DMSO e foi feito o ajuste de pH para $7,00 \pm 0,05$ com uma solução de NaOH 0,1 N. Foi completado o volume para 100 mL, a solução apresentou uma cor verde esmeralda e por fim foi esterilizada por filtração.

Para a solução de Azul de Bromotimol a 2% foi dissolvido 0,0200 g de azul de bromotimol em 10 mL de DMSO e a solução de sulfato de zinco que foi dissolvido 0,1435 g de sulfato de zinco heptahidratado em 50 mL de água destilada estéril.

A solução de EDTA 100 mM (ANVISA, 2020b) foi preparada da seguinte maneira: foi pesado 0,37224 g de EDTA dissódico e dissolvido em 10 mL de água destilada estéril. O pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,05$ com NaOH 0,1N e a solução foi esterilizada por filtração. Foi calculado um volume suficiente para concentração de 10 mM no momento do teste, utilizando a fórmula $C1.V1 = C2.V2$.

A solução do ácido dipicolínico (DPA) 250 mM (NORDMANN et al., 2020) foi preparada da seguinte maneira: foi pesado 0,4178 g e dissolvido em 10 mL de água destilada estéril. O pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,05$ com NaOH 0,01N e a solução foi esterilizada por filtração. Foi calculado um volume suficiente para concentração de 25 mM no momento do teste, utilizando a fórmula $C1.V1 = C2.V2$.

Para o preparo da solução tampão com Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg (Tienam®) foi calculado o peso necessário para uso da quantidade de amostras do dia multiplicado por três para ter quantidade iguais das soluções e realizar a adição dos inibidores em quantidades iguais, e acrescentado o tampão base de BLUE-CARBA no momento do uso. Por exemplo: para 20 isolados foi pesado 0,0450 g de Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg em um tubo Falcon, adicionado 7,5 mL de tampão BLUE-CARBA para separar em mais dois tubos Falcon igualmente, onde no final ficou 3 tubos com 2,5 mL cada um dos tubos foram devidamente identificados, o primeiro contendo somente o tampão base BLUE-CARBA com o Tienam®, o segundo foi adicionado quantidade calculada por $C1.V1 = C2.V2$ que resultou em 250 µL da solução EDTA 10 mM e no terceiro tubo foi adicionado uma quantidade calculada de 250 µL para DPA 25 mM, quando adicionado os inibidores enzimáticos a coloração do BLUE-CARBA passa de verde-esmeralda para um tom azulado.

3.6 PROCEDIMENTO DO TESTE

Na placa 96 poços, foi feita uma fileira para o controle negativo com apenas o BLUE-CARBA mais adição de cada isolado bacteriano, na segunda fileira continha o BLUE-CARBA + Tienam® + isolado bacteriano. Na terceira fileira foram adicionados BLUE-CARBA + Tienam® + EDTA e o isolado bacteriano, na última fileira tinha presente o BLUE-CARBA + Tienam® + DPA + isolado bacteriano, e assim, por conseguinte até preencher a placa (FIGURA 3).

Foram feitos controles negativos para um poço para apenas BLUE-CARBA, um segundo poço para BLUE-CARBA + Tienam®, o terceiro poço para BLUE-CARBA + Tienam® + EDTA e um último poço para BLUE-CARBA + Tienam® + DPA.

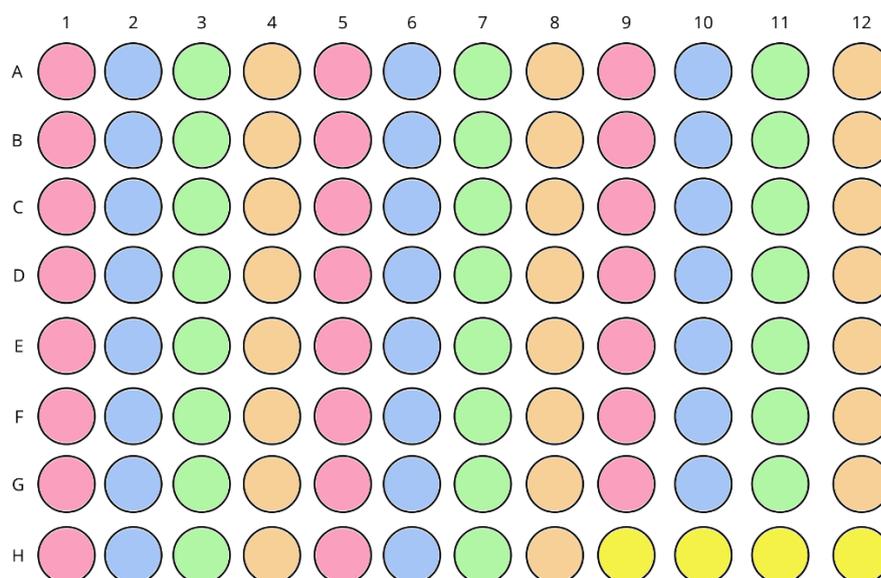


FIGURA 3 – Posição das soluções na placa.

Fileira rosa: BLUE-CARBA + ISOLADO; fileira azul: BLUE-CARBA + Tienam® + ISOLADO; fileira verde: BLUE-CARBA + Tienam® + EDTA + ISOLADO; fileira laranja: BLUE-CARBA + Tienam® + DPA + ISOLADO; Poços amarelos: Controle negativos de cada solução.

Próprio autor.

3.7 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após a incubação, os testes foram analisados em conjunto. No poço controle negativo contendo BLUE-CABA + Tienam® foi verificado se houve degradação do imipenem. Os poços que continham os testes apresentam mudança na coloração de verde-esmeralda e azulado para amarelo, foram considerados detectados, os testes que se mantiveram na coloração original ou teve somente uma leve alteração no tom, mas se mantiveram verde-esmeralda, foram considerados não-detectados conforme demonstrado na FIGURA 4. O teste foi considerado positivo para isolado produtor de metalo- β -lactamase quando os poços com BLUE-CARBA + Tienam® apresentaram resultado detectável e os poços com inibidores enzimáticos apresentaram resultado não-detectável.

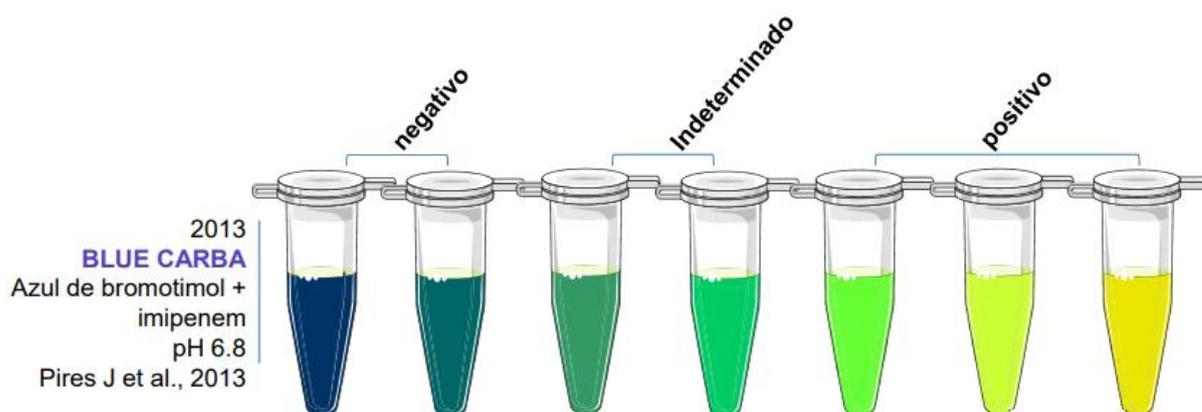


FIGURA 4 – Critérios interpretativos do método BLUE-CARBA

Palmeiro, JK. Oficina BrCast – CURITIBA (2019)

Os genes com produção de *bla_{NDM}*, *bla_{IMP-1}* e *bla_{VIM}* e *bla_{SPM}* devem manter a coloração inalterada da cor azul nos poços com presença dos inibidores, sendo considerados não-detectável frente ao teste colorimétrico. Os genes com serino-carbapenemase classe A como *bla_{GES-5}*, *bla_{GES-16}* e *bla_{KPC}* devem mudar a cor do teste para amarelo ou amarelo-esverdeado, sendo considerado detectável. Na classe D os genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}* devem mudar a coloração do teste obtivendo um resultado detectável. Os genes não produtores de carbapenemase tem que se manter na coloração verde-esmeralda, ou baixaram um tom, ainda sendo um verde-escuro, considerados não-detectáveis.

4 RESULTADOS

Foram selecionados 150 isolados bacterianos, conhecidos do banco de microrganismo. Para validar o teste foram selecionados 28 controles (*bla_{IMP-1}* (n = 2); *bla_{NDM}* (n = 1); *bla_{OXA-23}* (n = 1); *bla_{OXA-48}* (n = 1); *bla_{OXA-58}* (n = 1); *bla_{OXA-143}* (n = 1); *bla_{SPM}* (n = 1); *bla_{VIM}* (n = 1); *bla_{GES-5}* (n = 1); *bla_{GES-16}* (n = 1); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{CTX-M-2}* + alteração porina OmpK36 (n = 2); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{CTX-M-2}* + alteração porina OmpK35 e OmpK36 (n = 2); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{CTX-M-1}* + alteração porina OmpK35 e OmpK36 (n = 1); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{CTX-M-25}* + alteração porina OmpK36 (n = 2); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-2}* (n = 3); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-2}* + alteração porina OmpK35 e OmpK36 (n = 3); *Klebsiella pneumoniae* ESBL *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-2}* + alteração porina OmpK35, OmpK36 e OmpK37 (n = 3). São 66 isolados produtores de MβLs (*Klebsiella pneumoniae bla_{NDM}* (n = 26); *K. pneumoniae bla_{KPC}* + *bla_{NDM}* (n = 4); *K.*

pneumoniae bla_{KPC} + bla_{VIM} (n = 1); *Escherichia coli bla_{NDM}* (n = 11); *Citrobacter freundii bla_{NDM}* (n = 7); *Pseudomonas aeruginosa bla_{SPM}* (n = 1); *Pseudomonas aeruginosa bla_{IMP}* (n = 2); *Enterobacter cloacae bla_{NDM}* (n = 4); *E. cloacae bla_{KPC} + bla_{NDM}* (n = 2); *Enterobacter aerogenes bla_{NDM}* (n = 2); *Klebsiella oxytoca bla_{NDM}* (n = 1); *Proteus vulgaris bla_{NDM}* (n = 1); *Providencia stuartii bla_{NDM}* (n = 4)). Foram 57 isolados produtores de KPC e ESBL (*Klebsiella pneumoniae bla_{KPC}* (n = 51); *Klebsiella pneumoniae* ESBL (n = 2); *Escherichia coli bla_{KPC}* (n = 1); *Enterobacter cloacae bla_{KPC}* (n = 3)).

Tabela 1 – Isolados bacterianos carregadores dos genes produtores e não produtores de carbapenemases

Genes	Espécies	BLUE-CARBA + IMPENEM	EDTA	DPA
Produtoras de carbapenemases				
Classe A				
<i>bla_{GES-5}</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	+	+	+
<i>bla_{GES-16}</i>	<i>Aeromonas veronii</i> (1)	+	+	+
<i>bla_{KPC}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (51)	+ (49)	+ (49)	+ (49)
	<i>Escherichia coli</i> (1)	+	+	+
	<i>Enterobacter cloacae</i> (3)	+	+	+
Classe B				
<i>bla_{IMP-1}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
<i>bla_{NDM}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (27)	+ (26)	-	-
	<i>Escherichia coli</i> (11)	+	-	-
	<i>Citrobacter freundii</i> (7)	+	-	-
	<i>Providencia stuartii</i> (4)	+	-	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> (4)	+	-	-
	<i>Klebsiella aerogenes</i> (2)	+	+ (1)	+ (1)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	+	-	-	

<i>bla</i> _{VIM}	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	+	+	-
<i>bla</i> _{SPM}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	+	-	-
Classe D				
<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	-	-	-
<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	-	-	-
<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	-	-	-
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	-	-	-
Co-produção				
<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{KPC}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	+ (3)	+ (2)	+ (2)
	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	+	-	-
<i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{KPC}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	+	+	-
Não produtoras de carbapenemases				
ESBL				
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	-	-	-
<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	-	-	-
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + OmpK35 e OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	-	-	-
<i>bla</i> _{CTX-M-2} + OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	-	-	-
<i>bla</i> _{CTX-M-2} + OmpK35 e OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	-	-	-
<i>bla</i> _{CTX-M-25} + OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	-	-	-
<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} + OmpK35 e OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	-	-	-
<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} + OmpK35, OmpK36 e OmpK37	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	-	-	-

(+) e (-) foram considerados a partir da viragem de cor no teste.
Próprio autor.

Nos controles da classe B onde dois dos isolados carregadores dos genes *bla*_{IMP-1} houve mudança de coloração no poço com Blue-Carba + Tienam®, mas não houve alteração na coloração no teste modificado com EDTA e DPA. O controle carregador do gene *bla*_{NDM} foi detectado apenas no teste Blue-Carba + Tienam®, assim como o controle carregador do gene *bla*_{SPM}. Já o controle carregador do gene *bla*_{VIM} foi detectado no poço com Blue-Carba+ Tienam® e mudança na coloração na presença de EDTA. Os controles da classe D com carregadores dos genes de *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143} e *bla*_{OXA-23} não foram detectados no teste colorimétrico. Os controles da classe A carregadores dos genes *bla*_{GES-5} e *bla*_{GES-16} tiveram mudança de coloração na presença de EDTA e do DPA, tendo resultado detectado.

Os isolados não produtores de carbapenemases ESBL *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} com ou sem alterações de porinas tiveram resultados não-detectados para BLUE-CARBA+ Tienam® e não-detectados para os inibidores enzimáticos (FIGURA 5). *Klebsiella pneumoniae* ESBL (2/2) não-detectaram em nenhum dos testes.

Como relatado na tabela 1 os isolados produtores de classe B MβLs, tiveram resultados satisfatórios frente ao método colorimétrico BLUE-CARBA e aos inibidores enzimáticos EDTA e DPA. *Klebsiella pneumoniae* produtora do gene *bla*_{NDM} teve hidrólise do imipenem e inibição pelo EDTA e DPA. *Escherichia coli* produtora do gene *bla*_{NDM} teve a detecção de todos os isolados na presença de BLUE-CARBA + Tienam® e resultado não-detectado frente aos inibidores enzimáticos. *Citrobacter freundii* *bla*_{NDM} teve um ótimo desempenho frente aos testes, onde teve uma rápida taxa de detecção e uma boa viragem de cor no método, onde foi visto resultado detectado para o BLUE-CARBA + Tienam® e resultado não-detectado para ambos inibidores enzimáticos. *Providencia stuartii* fez hidrólise ao imipenem com todos os isolados desta espécie, como frente aos inibidores enzimáticos resultado não-detectado. *Enterobacter cloacae* *bla*_{NDM} apresentou resultado detectado no teste BLUE-CARBA com presença do imipenem e resultados não-detectado nos poços com presença dos inibidores enzimáticos. *Klebsiella aerogenes* *bla*_{NDM} ambos isolados presentes no trabalho apresentaram resultado detectado para BLUE+CARBA + Tienam®, mas um deles apresentou resultado não-detectado para ambos os inibidores enzimáticos, enquanto o outro resultado detectado para EDTA e DPA. *Klebsiella oxytoca* e *Proteus vulgaris* ambos produtores do gene *bla*_{NDM} também hidrolisaram o imipenem e se mantiveram não-detectado para os inibidores enzimáticos EDTA e DPA (FIGURA 6).

Klebsiella pneumoniae *bla*_{KPC} + *bla*_{VIM} (1/1) detectou no poço com presença do EDTA, assim como *K. pneumoniae* *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM} (2/4), *Pseudomonas aeruginosa* *bla*_{IMP} (1/2) e *E.*

aerogenes bla_{NDM} (1/2) detectaram na presença de ambos inibidores enzimáticos. *K. pneumoniae bla_{KPC} + bla_{NDM}* (1/4), *K. pneumoniae bla_{NDM}* (1/26), *Pseudomonas aeruginosa bla_{IMP}* (1/2) não-detectaram em nenhum dos poços.

Os produtores de carbapenemase de classe A *Klebsiella pneumoniae bla_{KPC}* (49/51) hidrolisaram o imipenem presente nas soluções BLUE-CARBA+ Tienam®, BLUE-CARBA + Tienam® + EDTA e na solução BLUE-CARBA + Tienam® + DPA. *Escherichia coli bla_{KPC}* detectou em todos os testes realizados. *Enterobacter cloacae bla_{KPC}* teve resultado detectou para os testes. *Klebsiella pneumoniae bla_{KPC}* (2/51) não-detectaram em nenhum dos testes.

A sensibilidade do teste para os isolados produtores de MβL foi de 97% (68/70) e a especificidade para EDTA foi de 91% (64/70), já a especificidade para DPA foi de 94% (66/70). A sensibilidade para a classe serino-carbapenemase A foi de 96% (55/57) e a especificidade de EDTA e DPA foi de 96% (55/57). Os testes não obtiveram sensibilidade para as serino-carbapenemase da classe D e tiveram uma especificidade de 100% para as bactérias não produtoras de carbapenemases.

Os isolados produtores de MβL tiveram um TAT com uma média de detecção de 10 min no teste com BLUE-CABA + Tienam®. Já os isolados produtores de KPC e GES tiveram em média uma de detecção de no Blue-Carba + Tienam® 10-15 minutos, nos poços com presença de EDTA de 30-35 minutos e nos poços com DPA de 15-20 minutos. Com o DPA mostrando uma leitura mais rápida para o teste do que o inibidor usual EDTA.

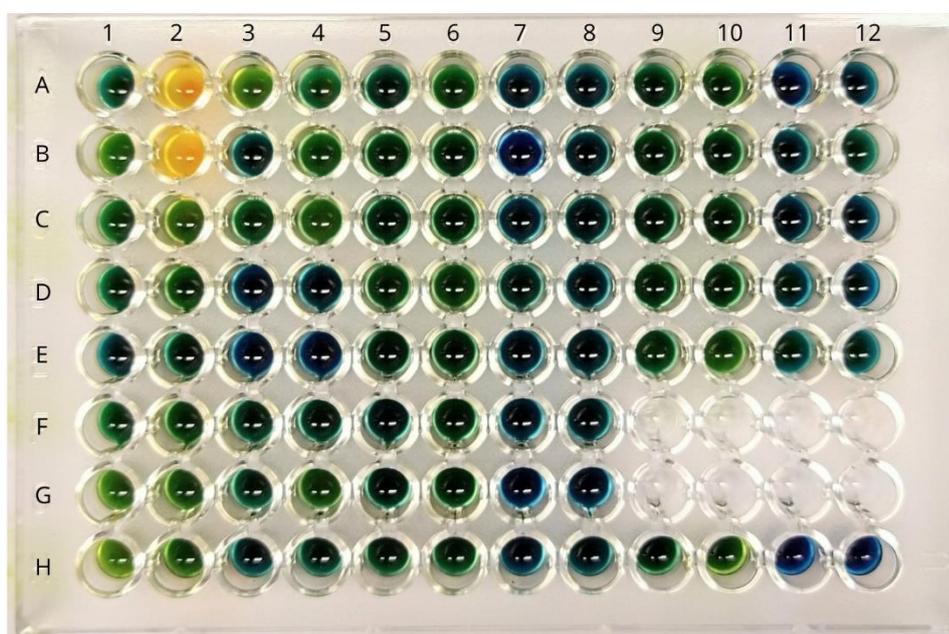


FIGURA 5 – Realização do teste com produtores carbapenêmicos e não carbapenêmicos

(A) de 1-4 controle *bla*_{IMP-1}; (B) de 1-4 controle *bla*_{NDM}; (C) de 1-4 controle *bla*_{OXA-48}; (D) de 1-4 controle *bla*_{OXA-58}; (E) de 1-4 controle *bla*_{OXA-143}; (F) de 1-4, (G) de 1-4, (H) de 1-4, (A, B, C, D, E, F, G, H) de 5-8, (A, B, C, D, E) de 9-12 controles de ESBL e alteração de porinas; (H) de 9-12 controles negativos.

Próprio autor.

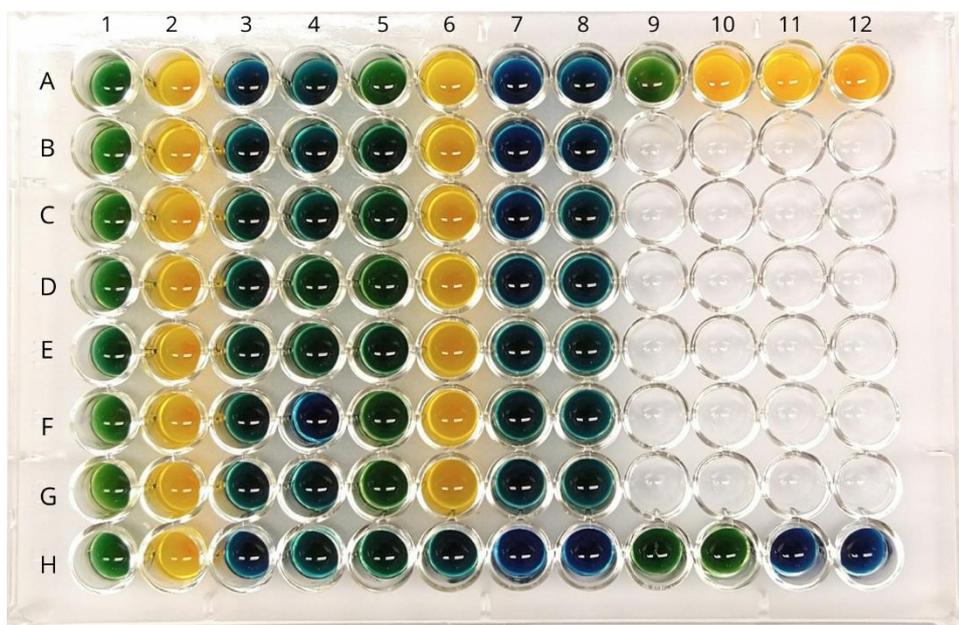


FIGURA 6 – Realização do teste com isolados MβLs.

(A, B, C, D, E, F, G, H) de 1-4 e os isolados (A, B, C, D, E) de 5-8 são bactérias produtoras de MβLs; (F e G) 5-8 *Enterobacter cloacae* coprodutora de *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM}; (H) de 5-8 *Klebsiella pneumoniae* coprodutora de *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM}; (A) de 9-12 *Klebsiella pneumoniae* coprodutora de *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM}; (H) de 9-12 controles negativos.

Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram positivo para MβL, os isolados produtores dos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM} e *bla*_{SPM} tiveram resultados esperados conforme outros autores (GISKE et al., 2011; KIMURA; ISHII; YAMAGUCHI, 2005; NORDMANN et al., 2020), já que os inibidores enzimáticos tiveram efeito quelantes. O gene *bla*_{VIM} dessa mesma classe B, obteve resultado

detectado para produtor de carbapenemase e detectado na presença de EDTA, sendo questionado se o mesmo não é um quelante para esta enzima ou se EDTA teve efeito sobre a bactéria, provocando a alteração da coloração.

Houve inconstâncias com alguns isolados, onde isolados com a coprodução de *bla*_{KPC} + *bla*_{VIM} deu resultado detectado no inibidor EDTA, assim como seu controle, podendo ser indicativo da classe enzimática não ser inibida pelo EDTA, mas necessitando de mais testes para validar. Duas outras coproduções dos genes *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM} detectaram também para o inibidor enzimático EDTA. A presença do isolado produtor do gene *bla*_{KPC} pode ter interferido no teste, causando detecção nos inibidores, dando um resultado falso-negativo para MBLs.

Um dos *Pseudomonas aeruginosa bla*_{IMP} e um dos isolados de *K. aerogenes bla*_{NDM} confirmaram sua produção de carbapenemase ao hidrolisar o imipenem, mas ambas detectaram na presença dos inibidores enzimáticos EDTA e DPA.

Um *K. pneumoniae bla*_{KPC} + *bla*_{NDM}, e um *K. pneumoniae bla*_{NDM} não-detectaram em nenhum dos poços, mesmo com um crescimento bacteriano considerável no meio TSA, podendo ser uma menor expressão do gene pelas bactérias ou ter perdido o gene, por ser tratar de um isolado criopreservado. *Pseudomonas aeruginosa bla*_{IMP} também não-detectou em nenhum dos testes, mas foi observada uma dificuldade de crescimento da bactéria tanto no meio ágar chocolate como no meio TSA.

Os demais isolados produtores de carbapenemases da classe B não apresentaram mudança de coloração para os inibidores enzimáticos EDTA e DPA, confirmando o uso de inibidores impede a hidrólise do antibiótico imipenem presente.

Numa comparação com outros similares, onde foi utilizado teste disco modificado com DPA (CHEN et al., 2019; KIMURA; ISHII; YAMAGUCHI, 2005; SHIN et al., 2008; VAN DIJK et al., 2014) para a análise do ácido como um inibidor enzimático da classe, se mostrou efetivo para a inibição por método colorimétrico CARBA-NP (NORDMANN et al., 2020) e com os resultados obtidos neste trabalho é satisfatório o uso do DPA para o método colorimétrico modificado BLUE-CARBA. Onde seu uso com os isolados produtores MBLs, onde 58/66 apresentaram positividade para produtor de carbapenemase no teste BLUE-CARBA + Tienam® e uma inibição da hidrólise do imipenem por parte dos inibidores enzimáticos EDTA e DPA.

A classe serino-carbapenemase de classe A os isolados com genes *bla*_{GES-5} e *bla*_{GES-16} tiveram mudança de coloração na presença de EDTA e do DPA. Os isolados produtores de *bla*_{KPC} tiveram um bom desenvolvimento no teste colorimétrico conforme (NORDMANN et al., 2020; PIRES et al., 2013), onde validaram o uso dos inibidores enzimáticos para a classe B

das metalo- β -lactamases, já que produziram uma mudança na coloração na presença de EDTA e DPA informando que não inibiram a degradação do imipenem presente no tampão.

Os isolados bacterianos de classe A não produtores de carbapenemases produtoras de ESBL com ou sem alteração de porinas não foram detectados no teste colorimétrico, como esperado pela literatura (PIRES et al., 2013), pois não são produtores que carbapenemases, então não conseguem hidrolisar o imipenem.

Os isolados da classe D com produção enzimática de OXA-48, OXA-58, OXA-143 e OXA-23 não foram detectados no teste colorimétrico, se suspeita dessas enzimas, deve se realizar a pesquisa de PCR para confirmatório, comparando os resultados com outros na literatura (NORDMANN et al., 2020; PIRES et al., 2013) obtiveram resultados detectáveis para as enzimas OXA, mas com dificuldade na mudança de coloração, como inocular mais do isolado ou aguardar mais tempo para a viragem de coloração do teste.

A classe enzimática NDM obtiveram resultados esperados nos resultados dos testes como já dito anteriormente, já a classe enzimática IMP-1 e VIM seria necessário um maior número de isolados para avaliação dos resultados. Havia apenas dois isolados com produção enzimática SPM, que obteve resultados satisfatórios se comparado com os isolados produtores de NDM. Os isolados que tinham coprodução enzimática obtiveram resultados divergentes dependendo das cepas bacterianas, onde seria ideal um maior número desses isolados para determinação. O teste para as bactérias produtoras enzimáticas de KPC foram confirmados conforme os resultados colorimétricos.

A sensibilidade e especificidade do teste teve similaridade com outros trabalhos utilizando o DPA como inibidor enzimático. O estudo do método colorimétrico CARBA-NP (NORDMANN et al., 2020) demonstrou uma sensibilidade para 100% para detecção de OXA-48, mas no método colorimétrico BLUE-CARBA deste trabalho não teve esse mesmo resultado, podendo resultar num pH alto para a bactéria, podendo ser testado baixar o pH para avaliar o comportamento da enzima.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que o método colorimétrico BLUE-CARBA modificado com inibidores enzimáticos EDTA e DPA, na avaliação com os genes detectados por PCR tiveram altas taxas de sensibilidade e especificidade frente aos produtores de serino-carbapenemases de classe A e aos produtores de metalo- β -lactamases, além de que teve uma taxa de especificidade de 100% para não produtores de carbapenemases. O teste se mostrou possível para os *Enterobacteriales* e *Pseudomonas aeruginosa*. O teste também teve um TAT rápido com resultados em até menos do que as duas horas, podendo ser utilizado na rotina laboratorial por ser fácil, rápido, sem uso necessário de equipamentos específicos e de baixo custo. Podendo adiantar tratamentos com um novo antimicrobiano ceftazidima-avibactam recém aprovado pela ANVISA, o qual não apresenta atividade contra isolados produtores de M β L.

7 REFERÊNCIAS

AKOVA, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 252–266, 2016.

ALÓS, J. I. Antibiotic resistance: A global crisis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.

AMBLER, R. P., A. F. W. COULSON, J. M. FRERE, J. M. GHUYSEN, B. JORIS, M.; FORSMAN, R. C. LEVESQUE, G. TIRABY, AND S. G. W. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical journal**, v. 276, n. December 1990, p. 1990–1991, 1991.

ANVISA. **Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos**. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm>.

ANVISA. Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção relacionada à assistência à Saúde**, p. 160, 2020a.

ANVISA. **Teste fenotípico colorimétrico de detecção de carbapenemases (BlueCarba)**, 2020b.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–896, 2011.

BUSH, K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549–559, 2013.

CHEN, A. Y. et al. Investigation of Dipicolinic Acid Isosteres for the Inhibition of Metallo- β -Lactamases. **ChemMedChem**, v. 14, n. 13, p. 1271–1282, 2019.

COHEN STUART, J.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 3, p. 205–210, 2010.

CROWDER, M. W.; SPENCER, J.; VILA, A. J. Metallo- β -lactamases: Novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 10, p. 721–728,

2006.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, 2017.

GAZIN, M. et al. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1140–1146, 2012.

GISKE, C. G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae*.pdf. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, p. 552–6, 2011.

KIMURA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, n. 3, p. 241–244, 2005.

NORDMANN, P. et al. NitroSpeed-Carba NP Test for Rapid Detection and Differentiation between Different Classes of Carbapenemases in Enterobacterales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1–8, 2020.

PALMEIRO, J. K. Detecção de mecanismos de resistência segundo o BrCAST. **Oficina BrCAST – Curitiba**, 2019.

PALMEIRO, J. K. et al. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2019.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281–4283, 2013.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

SCHÖRNER, M. A. **Estudo caso-controle dos aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPCo Programa de Pós-Graduação , UFSC.** [s.l: s.n.].

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 3, p. 282–286, 2014.

SHANKAR, PR. Book review: Tackling drug-resistant infections globally. **Archives of Pharmacy Practice**, v. 7, n. 3, p. 110, 2016.

SHIN, K. S. et al. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, n. 1, p. 102–105, 2008.

VAN DIJK, K. et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. 345–349, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development**. [s.l: s.n.].

APÊNDICE A – Isolados Seleccionados

Nº.	ESPÉCIE BACTERIANA	ENZIMA	BC	BC + IMP	BC + IMP + EDTA	BC + IMP + DPA
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1	N	5 min	N	N
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	10 min	N	N
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA - 48	N	N	N	N
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA - 58	N	N	N	N
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA - 143	N	N	N	N
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1	N	1 min	N	N
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPM	N	25 min	N	N
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM	N	20 min	1 hora	N
9	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA - 23	N	N	N	N
10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	GES - 5	N	1 hora	2 horas	2 horas
11	<i>Aeromonas veronii</i>	GES - 16	N	30 seg	1 min	1 min
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2 + alteração porina OmpK36	N	N	N	N
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-25 + alteração porina OmpK36	N	N	N	N
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-25 + alteração porina OmpK36	N	N	N	N
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2 + alteração porina OmpK35 e OmpK36	N	N	N	N
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-1 + alteração porina OmpK35 e OmpK36	N	N	N	N
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2 + alteração porina OmpK35, OmpK36 e OmpK37	N	N	N	N
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2 + alteração porina OmpK36	N	N	N	N
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2 + alteração porina OmpK35, OmpK36 e OmpK37	N	N	N	N
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2 + alteração porina OmpK35 e OmpK36	N	N	N	N
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2 + alteração porina OmpK35 e OmpK36	N	N	N	N
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2 + alteração porina OmpK35 e OmpK36	N	N	N	N
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2	N	N	N	N
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2 + alteração porina OmpK35	N	N	N	N
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2	N	N	N	N
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2 + alteração porina OmpK35 e OmpK36	N	N	N	N
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM, CTX-M-2	N	N	N	N
28	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	1 min	N	N
29	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	1 min	N	N
30	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	2 min	N	N

31	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NDM	N	1 min	N	N
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	2 min	N	N
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM + KPC	N	7 min	40 min	N
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	1 min	N	N
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	5 min	N	N
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	2 min	N	N
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	8 min	N	N
38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	3 min	N	N
39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPM	N	15 min	N	N
40	<i>Proteus vulgaris</i>	NDM	N	40 min	N	N
41	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	3 min	N	N
42	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	1 min	N	N
43	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	N	4 min	N	N
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	5 min	N	N
45	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	N	N	N
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	1 min	N	N
47	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	1 min	N	N
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC + NDM	N	10 min	N	N
49	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	N	2 min	N	N
50	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	3 min	N	N
51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC + NDM	N	5 min	1 hora	10 min
52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	1 min	N	N
53	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	1 min	N	N
54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP	N	3 min	1 hora	1 hora
55	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP	N	N	N	N
56	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	1 min	N	N
57	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	1 min	N	N
58	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	2 min	N	N
59	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	N	6 min	N	N
60	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	3 min	N	N
61	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	3 min	N	N
62	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	2 min	N	N
63	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	2 min	N	N
64	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	2 min	N	N
65	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	N	3 min	N	N
66	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NDM	N	1 min	2 horas	2 horas
67	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NDM	N	20 min	N	N
68	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	30 min	N	N
69	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	7 min	N	N
70	<i>Providencia stuartii</i>	NDM	N	1 hora	N	N
71	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	10 min	N	N
72	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	10 min	N	N
73	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	5 min	N	N

74	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	10 min	N	N
75	<i>Providencia stuartii</i>	NDM	N	1 hora	N	N
76	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	30 min	N	N
77	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	15 min	N	N
78	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	10 min	N	N
79	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	N	10 min	N	N
80	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	15 min	N	N
81	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	20 min	N	N
82	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	20 min	N	N
83	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	20 min	N	N
84	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	10 min	N	N
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	10 min	N	N
86	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	N	15 min	N	N
87	<i>Escherichia coli</i>	NDM	N	3 min	N	N
88	<i>Providencia stuartii</i>	NDM	N	1 hora	N	N
89	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC + NDM	N	5 min	N	N
90	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC + NDM	N	5 min	N	N
91	<i>Providencia stuartii</i>	NDM	N	15 min	N	N
92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC + NDM	N	N	N	N
93	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC + NDM	N	3 min	30 min	30 min
94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	10 min	45 min	30 min
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	12 min	55 min	40 min
96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	15 min	40 min	30 min
97	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	N	5 min	30 min	10 min
98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	6 min	31 min	25 min
99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	20 min	1 hora	1 hora
100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	25 min	10 min
101	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	7 min	28 min	20 min
102	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	N	N	N	N
103	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	15 min	1 hora	30 min
104	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	15 min	8 min
105	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	30 min	9 min
106	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	2 min	25 min	5 min
107	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	8 min	40 min	15 min
108	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	8 min	40 min	11 min
109	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	30 min	8 min
110	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	2 min	25 min	5 min
111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 min	20 min	4 min
112	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	30 min	15 min
113	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	20 min	10 min
114	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	N	2 min	18 min	4 min
115	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 min	15 min	3 min
116	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	1 hora	1 hora

117	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	N	N	N	N
118	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	6 min	20 min	10 min
119	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	20 min	16 min
120	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	12 min	8 min
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 min	10 min	5 min
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	8 min	15 min	15 min
123	<i>Escherichia coli</i>	KPC	N	10 min	1 hora	15 min
124	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 hora	1 hora	20 min
125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	1 hora	10 min
126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 min	1 hora	5 min
127	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	1 hora	18 min
128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	1 hora	10 min
129	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	1 hora	1 hora
130	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	1 hora	1 hora
131	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 hora	1 hora	1 hora
132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	1 hora	1 hora	1 hora
133	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	15 min	10 min
134	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	10 min	20 min	20 min
135	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	15 min	1 hora	25 min
136	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	10 min	30 min	15 min
137	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	7 min	20 min	10 min
138	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	8 min	25 min	15 min
139	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	6 min	20 min	10 min
140	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	5 min	20 min	18 min
141	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	N	N	N
142	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	2 min	30 min	6 min
143	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	8 min	10 min
144	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	N	N	N
145	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	19 min	8 min
146	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	N	3 min	11 min	5 min
147	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	15 min	8 min
148	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	3 min	15 min	7 min
149	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	10 min	20 min	15 min
150	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	N	10 min	20 min	15 min

BC = Blue-Carba; BC + IMP = Blue-Carba + Tienam®; BC + IMP + EDTA = Blue-Carba + Tienam® + EDTA; BC + IMP + DPA = Blue-Carba + Tienam® + DPA

Próprio autor.

ANEXO A – Roteiro POP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.ADM.001	
Título do Documento	BLUE-CARBA COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS EDTA E DPA	Emissão: 14/09/21	Próxima revisão:
		Versão: 1	

1 - SITUAÇÃO:

Versão	Data	Descrição resumida da alteração da versão
1	14/09/2021	Sem alteração / documento inicial

2 - OBJETIVO:

Descrever os procedimentos para o teste colorimétrico modificado Blue-Carba com a adição dos inibidores enzimáticos EDTA e Ácido dipicolínico (DPA), para auxiliar na identificação de bactérias produtoras de MβLs.

3 - CAMPO DE APLICAÇÃO:

Setor de microbiologia
Unidade da Garantia da Qualidade

4 - REFERÊNCIA:

Trabalho de conclusão de curso “AVALIAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO BLUE-CARBA COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASES”

5 - DESCRIÇÃO:

Materiais:

- Sulfato de zinco hephidratado 500 g, por frasco
- Solução de azul de bromotimol 25 mg, por frasco
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 200 mL, por frasco
- Hidróxido De Sódio (NaOH) 1 kg, por frasco
- Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg, por frasco-ampola
- EDTA - Sal Dissódico 500 g/ frasco
- Ácido 2,6-dipicolínico 25 mg/ frasco

- Água Grau Reagente
- **MÉTODO DE PREPARO:**
 - **Solução BLUE-CARBA (BC)**
 - Acrescentar a 80 ml de água grau reagente, 4 ml de solução de sulfato de zinco 10 mM.
 - Acrescentar 2 ml de Solução de Azul de Bromotimol a 2% em DMSO.
 - Ajustar o pH para $6,80 \pm 0,05$ com NaOH 0,1N
 - Completar o volume para 100 ml
 - Verificar o pH e ajustar para $6,80 \pm 0,05$ com NaOH 0,1N caso necessário.
 - A solução tem cor verde esmeralda.
 - Esterilizar por filtração.
 - **Solução de Azul de Bromotimol a 2%**
 - Dissolver 200 mg de azul de bromotimol em 10 ml de DMSO.
 - **Solução de sulfato de zinco 10 mM**
 - Dissolver 287 mg de sulfato de zinco heptahidratado em 100 ml de água grau reagente.
 - **Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg**
 - Pesar 10 mg de Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg em frascos tipo Eppendorf (microtubos cônicos de 1,5 ml).
 - Embrulhar em papel alumínio e armazenar a -20°C com a mesma validade que consta no rótulo do frasco original.
 - Para o preparo da solução de Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg é acrescentado 1 ml de solução BC no momento do uso.
- **PROCEDIMENTOS DE ESTERILIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO**
 - Esterilizar por filtração.
 - Distribuir 13 ml em tubos de 15 ml.
 - Manter em temperatura ambiente por até 1 ano.
- **Solução padrão EDTA (100 mM)**
 - Pesar 0,37224 g e dissolver em 8 mL de água grau reagente.
 - Completa o volume para 10 mL.
 - Ajustar o pH para $7,5 \pm 0,05$ com NaOH 0,1N.
 - Esterilizar por filtração.
 - Calcular um volume suficiente para concentração de 10 mM no momento do teste.

- **Solução padrão ÁCIDO DIPICOLÍNICO (250 mM)**
 - Pesar 0,4178 g e dissolver em 8 mL de água grau reagente.
 - Completar o volume para 10 mL.
 - Ajustar o pH para $7,5 \pm 0,05$ com NaOH 0,01N.
 - Esterilizar por filtração.
 - Calcular um volume suficiente para concentração de 25 mM no momento do teste.

- **MÉTODO**

- Em dois microtubos contendo Imipenem 500 mg + Cilastatina 500 mg congelado, adicionar 1 mL de BLUE-CARBA
- Retirar a quantidade que irá ser adicionada do inibidor EDTA e DPA.
- Adicionar a mesma quantidade retirada do inibidor enzimático.
- A coloração muda de verde-esmeralda para azul.

Elaboração	Nome:	Aprovação e Liberação	Nome:
	Cargo:		Cargo:
	Data:		Data:
	Assinatura:		Assinatura: