

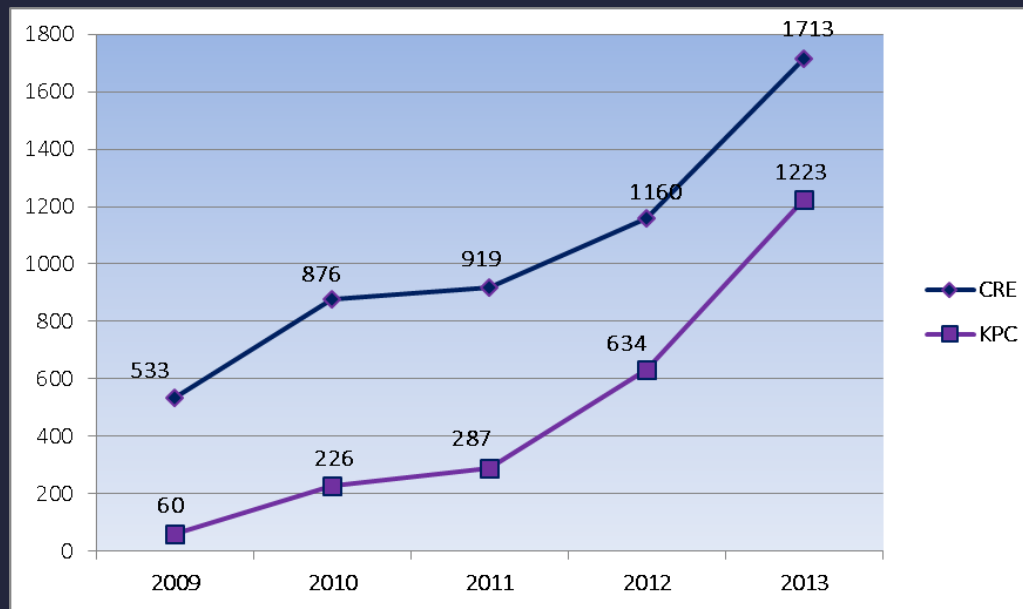
Detecção de genes de resistência por microarray em enterobactérias resistente aos carbapenêmicos e correlação com métodos fenotípicos e genotípicos

Ana Paula Cury, Maria Renata Gomes Franco, Thais S. R. Di Gioia, João Nóbrega de Almeida Júnior, Lauro V Perdigão-Neto, André Mário Doi, Hélio Hehl Caiaffa Filho, Márcia Mafucci, Flávia Rossi

Laboratório de Microbiologia – HCFMUSP

Introdução

- O isolamento de Enterobacterias resistente a carbapenêmicos (CRE) em nossa instituição ocorre desde 2005 em situações raras e esporádicas.
- A partir de 2009 houve um aumento destes isolados em amostras clínicas e desde então, o laboratório de microbiologia pesquisa de rotina em Culturas de Vigilância e espécimes clínicos a presença de carbapenemase KPC através do Teste de Hodge modificado (MHT) e PCR em todas CRE



Objetivo

- Mapear os principais genes de resistência aos beta-lactâmicos envolvidos em CRE e correlacionar os resultados do DNA microarray com MHT e PCR

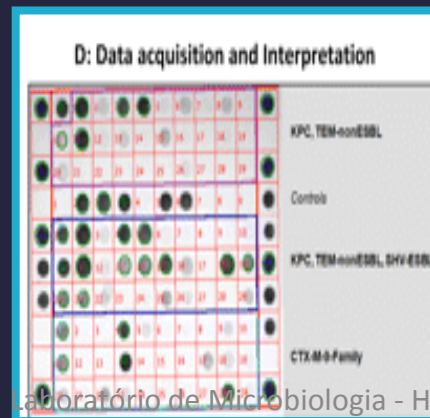
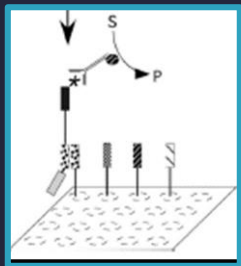
Método

DNA microarray Check-Points (Check-MDR CT103).

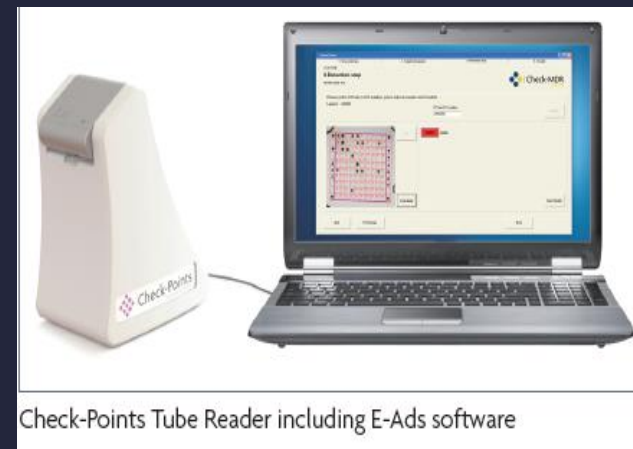
- Baseado no reconhecimento de sequências do DNA alvo por sondas específicas (ZIP) e posterior amplificação deste DNA alvo por PCR;



- Os produtos da PCR são hibridizados ao Microarray e visualizados por detecção colorimétrica;



Laboratório de Microbiologia - HCFMUSP



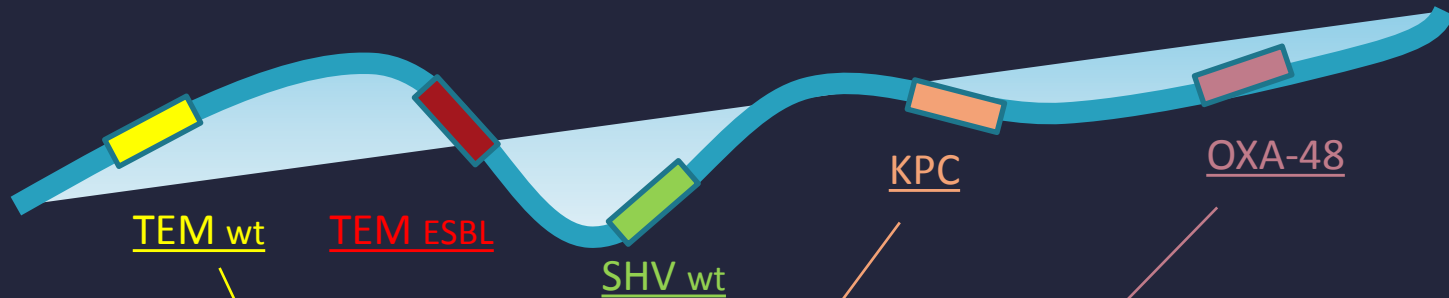
Check-Points Tube Reader including E-Ads software

Método

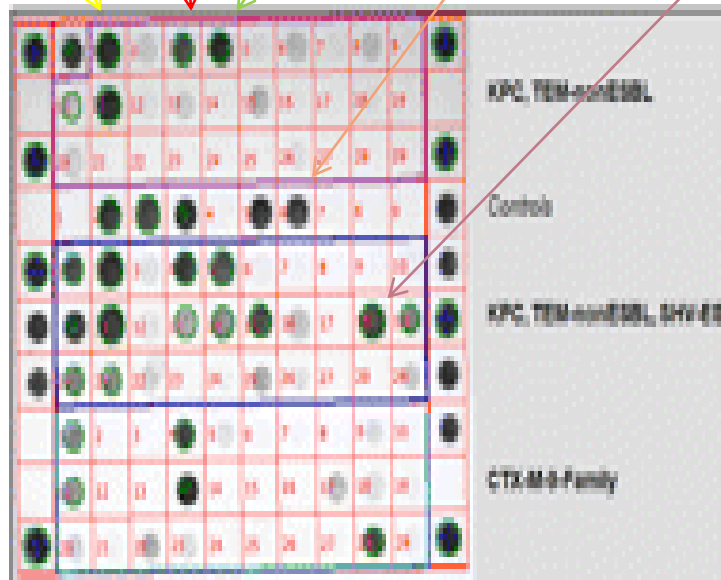


Carbapenemases*	CTX-M ESBLs	TEM ESBLs vs. non-ESBL	SHV ESBLs vs. non-ESBL	AmpCs	Controls
KPC	CTX-M-1 group	TEM wt	SHV wt	CMY I/MOX	DNA control
NDM	CTX-M-1 like	TEM E104K	SHV G238S	ACC	Amplification control
VIM	CTX-M-15 like	TEM R164S	SHV G238A	DHA	Hybridization control
IMP	CTX-M-3 like	TEM R164C	SHV E240K	ACT/MIR	Negative control
OXA-48	CTX-M-32 like	TEM R164H		CMY II FOX	
	CTX-M-2 group	TEM G238S			
	CTX-M-8 & -25 group				
	CTX-M-9 group				

Método: Detecção



D: Data acquisition and Interpretation



	Hyc	TEM 104E (1)	TEM 104K (2)	DNA-C (3)	TEM 164R (4)	TEM 164S (5)		TEM 164H (7)	IMP I (8)	IMP II (9)	
	rxC (10)	TEM 238G (11)	TEM 238S (12)	DNA-C (13)	SHV-oil (14)	SHV 238G (15)	SHV 238S (16)	SHV 238A (17)	SHV 240E (18)	SHV 240K (19)	
	rxC (20)	OXA-48 (21)	OXA-48 (22)	negC (23)	VIM I (24)	VIM II (25)	CTX-M1 form (26)	CTX-M2 form (27)	CTX-M9 form (28)	CTX-M8+25 form (29)	
	VIM oil (30)	KPC (31)	KPC (32)	Hyc	FOX (33)	CTX-M1-A (34)	CTX-M1-B (35)	VIM oil (36)	CTX-M1-C (37)	CTX-M1-D (38)	
		NDM-1 (40)	TEM E104K (41)		TEM oil (43)	TEM 164S (44)	TEM 164C (45)	TEM 164H (46)	CMY II (47)	CMY II (48)	
	Hyc	NDM-1 (49)	TEM G238S (50)		SHV oil (52)	SHV 238G (53)	SHV 238S (54)	SHV 238A (55)	SHV 240E (56)	SHV 240K (57)	
		DHA (59)	ACT/MIR (60)								
				Hyc							
		DHA (88)			CMY MOK (91)	ACC (92)	CTX-M1 form (93)	CTX-M2 form (94)	CTX-M9 form (95)	CTX-M8+25 form (96)	

Material

- CRE previamente armazenadas a -80°C (TSB glicerol).
- - 10 *Klebsiella pneumoniae* KPC + na Unidade de Transplante de Fígado em 2009 (1cepa inviável)
- - 10 *Klebsiella pneumoniae* KPC + na Unidade de Transplante de Fígado em 2013
- -10 *Klebsiella pneumoniae* KPC + no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) em 2009
- -10 *Klebsiella pneumoniae* KPC + no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) em 2013 (1cepa inviável)
- -51 enterobacterias (CESP, E.coli, H.alvei, K.pne) isoladas de diferentes institutos e unidades de internação que foram agrupadas de acordo com o resultado do MHT, sendo
 - 19 CRE com MHT negativo e
 - 32 CRE com MHT inconclusivo ou positivo
- - Uma isolado por paciente

Resultados

Klebsiella pneumoniae KPC+
 ICHC – Clínica: Fígado (N-19)

Sampl e Num	Organismo	Result CP	KPC	OXA 48	IMP	NDM	VIM	AmpC	ESBL	TEM	SHV	CTX-M	AmpCp
1	kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	WT	WT	NEG	NEG
2	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2,9	NEG
3	kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	WT	WT	NEG	NEG
4	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG
5	kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	WT	WT	NEG	NEG
6	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG
7	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 1,2	NEG
8	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 1	NEG
9	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT+238S	POS 1	NEG
10	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG
11	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG
12	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG
13	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
14	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
15	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
16	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
17	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
18	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
20	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG

70% ESBL
 CTX-M
 100% TEMwt

20% ESBL
 CTX-M

Resultados

Klebsiella pneumoniae KPC+
ICESP (N-19)

2013
(N-9)

80% ESBL
CTX-M 2
100%TEM
wt

2009
(N-10)

90% ESBL
CTX-M 1
10%TEM wt

Sample Num	Organismo	Result CP	KPC	OXA							ESBL	TEM	SHV	CTX-M	AmpCp
				48	IMP	NDM	VIM	AmpC							
21	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG	
23	kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	NEG	NEG	
24	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 1	NEG	
25	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG	
26	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG	
27	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2,9	NEG	
28	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG	
29	kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	NEG	NEG	
30	kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 2	NEG	
31	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
32	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
33	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
34	Kle pne	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG	
35	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
36	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
37	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS	NEG	
38	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
39	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	
40	Kle pne	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT	POS 1	NEG	

Resultados

CESP, *E.coli* e *Hafnia sp* – Resistente aos Carbapenems e MHT Negativo (N-19)

Num	Strain	MHT	PCR	Result	OXA				VIM	AmpC	ESBL	TEM	SHV	CTX-M	AmpC
			KPC	CP	KPC	48	IMP	NDM							
1	Esc.col	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS 2	NEG
2	Ent clo	Neg	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	Y	-	NEG	NEG	NEG	ACT/MIR
3	Ent aer	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS 2,9	NEG
4	Ent aer	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
5	E.coli	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	WT	NEG	POS 9	NEG
6	Ser mar	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
7	Ent aer	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 1	NEG
8	Ent aer	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS 2	NEG
9	Ent aer	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	WT+164C	NEG	POS 2	NEG
10	Ent clo	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	WT	NEG	POS 2	NEG
11	Ent clo	Neg	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	Y	Y	WT	NEG	POS 1	ACT/MIR
12	Ent aer	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS 2	NEG
13	ser mar	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	WT	NEG	POS 2,9,8/25	NEG
14	Ent clo	Neg	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	Y	Y	WT	NEG	POS 1	ACT/MIR
15	Ent aer	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
16	Ent clo	Neg	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	Y	Y	WT+164C	238S	NEG	ACT/MIR
17	Ent aer	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS 2	NEG
18	Haf alv	Neg	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	Y	-	NEG	NEG	NEG	ACC
19	kle pne	Neg	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 1,2,9	NEG

74% ESBL CTX-M

Resultados

CESP, E.coli e K.pne – Resistente aos Carbapenems com MHT Inconcl e Positivo (N-32)

Num	Strain	MHT	PCR KPC	Result CP	KPC	OXA 48	IMP	VIM	NDM	AmpC	ESBL	TEM SNP	SHV SNP	CTX-M	AmpC
20	Ent ger	Inc	Neg	ESBL CARBA	-	-	Y	-	-	-	Y	WT	NEG	POS1	NEG
21	Ser mar	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	240K+238S	NEG	NEG
22	Ent aer	Pos	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	240K+238S	NEG	NEG
23	Ser mar	Inc	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
24	Ent clo	Pos	Pos	CARBA AMPC	Y	-	-	-	-	Y	-	NEG	NEG	NEG	ACT/MIR
25	Ent aer	Inc	Neg	ESBL	-	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS8/25	NEG
26	Ent aer	Inc	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
27	Ent aer	Inc	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
28	Ser mar	Inc	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
29	Cit freu	Inc	Pos	CARBA AMPC	Y	Y	-	-	-	Y	-	NEG	NEG	NEG	CMY II
30	Ser mar	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	240K+238S	POS8/25	NEG
31	Ser mar	Pos	Pos	ESBL CARBA	Y	Y	-	-	-	-	Y	WT+164C	NEG	POS8/25	NEG
32	Ent aer	Inc	Neg	ESBL CARBA	-	Y	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS 2,8/25	NEG
33	Ent clo	Inc	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	Y	-	NEG	NEG	NEG	ACT/MIR
34	Ser mar	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS 1,2,9	NEG
35	Ent aer	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT+164C+238S	NEG	NEG	NEG
36	Ser mar	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	240K+238S	NEG	NEG
37	Ser mar	Inc	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
39	Ser mar	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	240K+238S	NEG	NEG
40	Ent clo	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	NEG	POS1	NEG
41	Ser mar	Inc	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
42	Ser mar	Inc	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	NEG	POS9	NEG
43	Ser mar	Pos	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
44	kle pne	Pos	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	WT	NEG	NEG
45	Ser mar	Inc	Neg	AMPC	-	-	-	-	-	-	-	WT	NEG	NEG	ACT/MIR
47	Ser mar	Pos	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT+238S	POS1,2,9	NEG
48	Ser mar	Pos	Pos	CARBA	Y	-	-	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG
49	kle pne	Pos	Pos	ESBL CARBA	Y	-	-	-	-	-	Y	NEG	WT+238S	NEG	NEG
50	Ent clo	Pos	Pos	AMPC	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	WT	POS1	ACT/MIR
51	Ent clo	Pos	Pos	AMPC	Y	-	-	-	-	-	Y	WT	NEG	POS 2	ACT/MIR
52	Ent clo	Pos	Pos	AMPC	Y	-	-	-	-	-	Y	WT+164C	NEG	POS 3	ACT/MIR
53	Ent clo	Inc	Pos	AMPC	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

78% KPC, 63% ESBL (72% CTX-M, 50% SHV e 17% TEM)

Resultados Carbapenemases

- KPC – 63 KPC Pos: 100% (63) Concordância
 - 26 KPC Neg: 96% (25) Concordância

OXA-48 like – 3 Positivas Check-Points, Não confirmadas por qPCR

IMP: 1 Positiva Check-Points, confirmada por qPCR

Conclusão

- Os resultados moleculares com Check-Points permitem mapear de forma unificada distintas beta-lactamases e apresentou uma boa correlação das carbapenemases com métodos moleculares tradicionais, com exceção da OXA-48 like. O conhecimento local e mudanças temporais do cenário genético pode permitir um melhor acompanhamento epidemiológico da resistência frente as CRE.

Obrigada !

ana.cury@hc.fm.usp.br