

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES

Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz¹; Wirlaine Glauce Maciel²; Kesia Esther da Silva²; Maisa Correa Estopa²; Silvana B. Marchioro³; Simone Simionatto⁴

UFGD/FCBA, Caixa Postal 533-79.804-970, Dourados – MS, E-mail: juliohenriquefsq@hotmail.com

¹Bolsista de Iniciação Científica UFGD-PIBIC. ²Mestrandas em Ciências da Saúde UFGD-FCS.

³Profa. Dra. Adjunta da Faculdade de Ciências da Saúde, UFGD.

⁴Orientadora, Profa. Dra. Adjunta da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD.

RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é a carbapenemase mais comum isolada de enterobactérias e confere resistência a antibióticos de amplo espectro, como os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Essas enzimas vêm sendo relatada em diversas espécies de interesse clínico, porém é habitualmente mais frequente em cepas de *K. pneumoniae*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC-2 isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS. As cepas de *K. pneumoniae* foram coletadas de fevereiro de 2012 a abril de 2013. Cepas com perfil intermediário ou resistente aos carbapenêmicos foram submetidas ao Teste Modificado de Hodge. A avaliação do perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos foi avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (MIC), frente aos antibióticos meropenem, imipenem e ertapenem. A avaliação do gene *bla*_{KPC-2} foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste estudo, foram isoladas 59 cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de amostras de urocultura, swab retal e secreção traqueal. Destas, 97% apresentaram resultado positivo no Teste Modificado de Hodge. Na determinação da MIC, 87% das cepas foram resistentes ao antibiótico imipenem, 93% ao meropenem e 98% resistentes ao ertapenem. Das 59 cepas, 83% apresentaram resultado positivo na PCR para o gene *bla*_{KPC-2}.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, resistência bacteriana, carbapenêmicos.

INTRODUÇÃO

A infecção hospitalar é considerada um grave problema de Saúde Pública. Muitos hospitais possuem dificuldade na implementação de normas de biossegurança efetivas para a contenção de microrganismos multiressistentes, o que contribui para a ocorrência dessas infecções. (ERKENS-HULSHOF et al., 2014). As bactérias Gram-negativas estão entre os patógenos com maior relevância clínica e epidemiológica nos ambientes hospitalares, dentre elas as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (SOUZA; OLIVEIRA, 2008). Vários estudos relatam que as principais espécies com importância clínica são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., e *Serratia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp. e *Salmonella* spp. (MOAYEDNIA et al., 2014).

A grande maioria das infecções causadas por espécies de *Klebsiella* sp., estão associadas ao ambiente hospitalar. Segundo dados epidemiológicos as espécies desse gênero estão envolvidas em 7-14% dos casos de pneumonias nosocomiais, 6-17% de infecções do trato urinário, 4-15% de sepses, 3-20% de infecções neonatais e 4-17% das infecções em UTIs (JANDA; ABBOUTT, 2006). A emergência de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos constitui um dos principais desafios aos laboratórios clínicos e as equipes de saúde. A resistência carbapenêmicos esses antimicrobianos pode ocorrer devido à impermeabilidade da membrana externa, hiper-expressão de bombas de efluxo e o principal mecanismo a produção de carbapenemases, como a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (NORDMANN et al., 2011; POIREL et al., 2007; YIGIT et al., 2001).

A KPC é a carbapenemase mais comum isolada de enterobactérias e confere resistência aos antibióticos de amplo espectro, como os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Os genes codificadores de enzimas do tipo KPC, estão frequentemente associados a elementos genéticos móveis que são mediadores na transferência horizontal de genes, o que contribui para sua disseminação mundial (CAO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). Na região da Grande Dourados existem poucos relatos sobre o monitoramento de cepas multirresistentes produtoras de KPC de interesse clínico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC-2, isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e isolamento das cepas bacterianas:

As cepas bacterianas foram coletadas de fevereiro de 2012 a abril de 2013 e foram isoladas de pacientes de um Hospital Público de 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 da microbiologia laboratorial.

2. Identificação microbiológica e antibiograma:

As cepas bacterianas foram identificadas através da coloração de Gram e provas bioquímicas como fermentação (glicose, sacarose e lactose), motilidade, produção de H₂S, gás e indol, bem como antibiogramas utilizando a técnica de disco difusão baseado nas recomendações publicadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). A identificação e a sensibilidade foram realizadas pelo sistema automatizado Vitek (BioMérieux). As cepas resistentes a uma ou a várias cefalosporinas de terceira geração e que demonstraram redução no diâmetro dos halos de inibição frente aos antibióticos carbapenêmicos pela técnica de disco difusão, apresentando o perfil de sensibilidade foram encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS/UFGD), onde foram realizados os demais testes.

3. Teste Modificado de Hodge:

Todas as cepas de *K. pneumoniae* que apresentaram no antibiograma resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos foram submetidas ao Teste Modificado de Hodge, frente ao antibiótico ertapenem (sensibilidade e especificidade de 90%) segundo o CLSI (2013). Como cepa padrão para este teste foi utilizada *Escherichia coli* ATCC 25922.

4. Concentração Inibitória Mínima (MIC):

A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi realizada através da determinação da MIC, pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, seguindo as padronizações estabelecidas pelo CLSI (2013). As MICs de imipenem (IMP), meropenem (MEM) e ertapenem (ERT) foram testadas em diferentes faixas de concentração, as quais variaram de 128 a 0,25 µg/mL.

5. Avaliação da presença do gene *bla*_{KPC-2} pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

As *K. pneumoniae* foram submetidas à extração de DNA por lise térmica e posterior avaliação genotípica conforme Cuzon et al., 2010, com modificações. As reações da 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, 1x tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂ e 10-50 ng de DNA. As reações de amplificação foram conduzidas 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 da PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 14 meses foram identificadas 59 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, destas 49 (83%) foram identificadas como cepas produtoras de KPC. A partir da análise dos registros laboratoriais, observou-se que a fonte de infecção mais comum foi a urocultura (42%), seguida de swab retal (17%) e secreção traqueal (17%), ao contrário das amostras de escara sacral, ferida operatória e secreção vaginal, as quais apresentaram apenas uma cepa de *K. pneumoniae* (Figura 1).

Das 59 cepas de *K. pneumoniae* submetidas ao Teste Modificado de Hodge, 57 cepas apresentaram um resultado positivo, indicando que 97% das cepas avaliadas neste estudo são possivelmente cepas produtoras de carbapenemases.

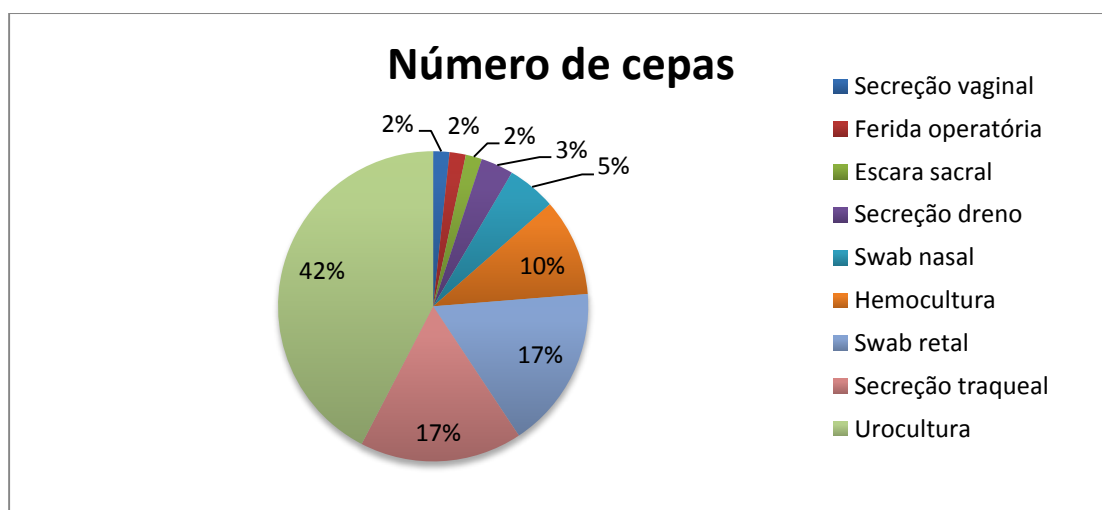


Figura 1. Distribuição de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase isoladas de diferentes amostras clínicas.

Na determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana, todas as cepas apresentaram alta resistência aos antibióticos testados: meropenem (MIC₅₀, >8 mg/L), imipenem (MIC₅₀, >16 mg/L) e ertapenem (MIC₅₀, >32 mg/L). Na investigação do gene *bla*_{KPC-2} por PCR, 83% das cepas foram positivas para o gene *bla*_{KPC-2}, evidenciando a alta prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no hospital público de Dourados. A figura 2 representa o resultado da PCR de 10 cepas de *K. pneumoniae*.

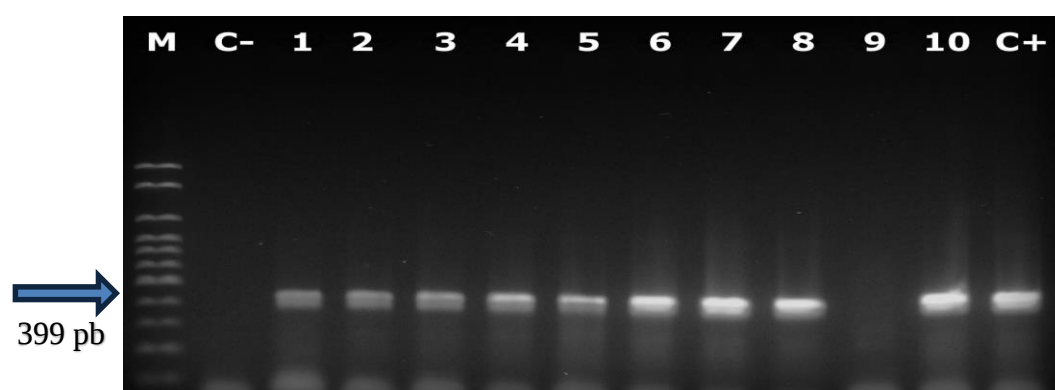


Figura 2. Gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do gene *bla*_{KPC-2} amplificado por PCR. Coluna M: marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb (Sigma); Coluna C-, controle negativo. Colunas 1 a 8 e 10, cepas de *K. pneumoniae* positivas; Coluna 9, cepa bacteriana negativa; Coluna C+, controle positivo da reação.

A resistência a carbapenêmicos nas 10 cepas de *K. pneumoniae* (17%) com resultado negativo na PCR, pode ser explicada pela presença de outros mecanismos de como produção de outras carbapenemases, alterações em proteínas de membrana externa e aumento na regulação das bombas de efluxo associados a produção de Beta lactamases de espectro extendido (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009), portanto mais estudos são necessários para evidenciar podem estar envolvidos na indução da resistência destas cepas e merecem ser investigados.

CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados podemos concluir que há um número elevado de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no hospital público de Dourados. Entretanto, 17% das cepas são possíveis produtoras de outras classes de carbapenemases e precisam ser

estudos afim de determinar os fatores genéticos envolvidos na indução da resistência bacteriana das cepas circulantes neste hospital.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq e a FUNDECT, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

CAO, X; XU, X; ZHANG, K; et al. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumonia* isolates. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.13, n.16, 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2013.

ERKENS-HULSHOF, S; VIRGINIA-COVA, L; STURM, P; et al. The occurrence of *Enterobacteriaceae* producing KPC carbapenemases in a general hospital in Curacao. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 3, n. 24, 2014.

JANDA, J. M; ABBOUTT, S. L. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. **The Enterobacteria**. Washington, USA: ASM Press. 2nd ed.,115-129, 2006.

MOAYEDNIA, R; SHOKRI, D; MERRIKHI, A; et al. Frequency assessment of β -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, p. 41-45, 2014.

NORDMANN, P; CUZON, G, NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, p. 228–236, 2009.

NORDMANN, P; NAAS, T; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase - producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Disease**, v. 124, n. 9, p. 1791–1798, 2011.

POIREL, L; PITOUT, JD; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, p. 501–512, 2007.

RIBEIRO, V. B; LINHARES, A. R; BARTH, A. L; et al. Performance of Quantification of Modified Hodge Test: An Evaluation with *Klebsiella pneumonia* Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates. **BioMed Research International**, 2014.

SOUZA, A. S; OLIVEIRA, Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) of human clinical samples origin hospital. **RBAC**,2008;42(4): 303-306.

YIGIT, H; QUEENAM, AM; ANDERSON, GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.