
Detecção de genes de resistência microbiana produzidos por *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecção ou colonização hospitalar de vários hospitais do estado de São Paulo

Lorena Santinoni TONON*, Doroti de Oliveira GARCIA¹

¹*Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz*

**Programa Institucional Brasileiro de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)*

K *lebsiella pneumoniae* são bacilos gram-negativos frequentemente envolvidos em infecções hospitalares. O principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e aztreonam) é a produção de β -lactamases, enzimas que degradam o anel β -lactâmico contido na estrutura dos antimicrobianos β -lactâmicos. A grande preocupação desse tipo de mecanismo é em relação à facilidade de transferência dos plasmídeos entre os isolados clínicos. Devido à extensa disseminação de cepas resistentes a antibióticos, especialmente de cepas produtoras de ESBL, existe uma preocupação redobrada em infecções causadas por *K. pneumoniae*. Além da produção de ESBL, *K. pneumoniae* produtoras de outras β -lactamases têm sido descritas, tais como carbapenemases KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)¹ e metalo- β -lactamases, as quais comprometem seriamente as opções terapêuticas para pacientes infectados por esses micro-organismos.

Os objetivos deste trabalho foram detectar genes de resistência responsáveis pela produção de KPC em amostras de *K. pneumoniae* provenientes de colonização e/ou infecção hospitalar e avaliar se há disseminação clonal.

Foram utilizadas 337 cepas de *K. pneumoniae* suspeitas de serem produtoras de KPC, isoladas de amostras clínicas de pacientes infectados ou colonizados provenientes de vários hospitais do estado de São Paulo, encaminhadas ao Núcleo de Enterobactérias do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz para confirmação de identificação, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e produção de KPC e tipagem epidemiológica molecular. A confirmação bioquímica foi feita por métodos bioquímicos clássicos manuais. Em relação aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, as cepas foram primeiramente submetidas ao teste de disco-difusão. Cepas com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) e, portanto, suspeitas de serem produtoras de KPC, foram submetidas a testes dilucionais, Etest (AB Biomerieux, Solna, Sweden), para a determinação da concentração inibitória mínima frente aos seguintes agentes antimicrobianos: cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, imipenem, imipenem/imipenem+EDTA, meropenem, polimixina B e tigeciclina. A leitura e a interpretação dos resultados foram feitas de acordo com o CLSI (2011)², exceto para tigeciclina e polimixina B (EUCAST)³. Cepas

com confirmação de sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos foram encaminhadas para a realização da PCR para a confirmação da presença do gene *bla_{KPC}* (Rasheed et al, 2008)⁴. Para a tipagem epidemiológica, utilizou-se o método de eletroforese de campo pulsado (PFGE). A análise dos perfis foi feita de acordo com os critérios de Tenover (1995)⁵.

As 337 cepas de *K. pneumoniae* analisadas foram confirmadas como produtoras de ESBL e apresentaram resistência ou sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos. A porcentagem de resistência foi elevada para a maioria dos antimicrobianos testados. A maioria das cepas (quase 100%) apresentou CIM $\geq 1\mu\text{g/mL}$ (R) frente ao ertapenem e a sensibilidade ao imipenem e meropenem foi variável. A porcentagem de resistência às cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima e ceftazidima) também foi elevada. Tigeciclina e polimixina B foram os antimicrobianos que apresentaram maior sensibilidade, embora tenha ocorrido o aparecimento de sensibilidade diminuída e resistência a essas drogas (tabela 1). Em 208 cepas de *K. pneumoniae* (62%) analisadas por PCR foram observadas a presença de uma banda de 1011 pb, correspondentes à presença do gene *bla_{KPC-2}*. A análise dos perfis de restrição obtidos pela eletroforese em campo pulsado (PFGE) mostrou que houve disseminação clonal intra e inter-hospitais. Esse mesmo clone encontra-se disseminado

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM50 e CIM90) referente a 142 cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC, isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo

Antimicrobiano	Intervalo CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Imipenem	0,5->32	4	>32
Meropenem	0.25->32	4	>32
Ertapenem	0,5->32	4	>32
Cefotaxime	3->32	>32	>32
Ceftazidime	6->256	128	>256
Tigecycline	0.125-4	1,5	2
Polymyxin B	0.19-128	1,0	2

em diversos hospitais no estado de São Paulo, com grande enfoque para a área metropolitana.

A opção terapêutica para casos de infecção por *K. pneumoniae* produtora de ESBL é a utilização de β -lactâmicos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), portanto, a produção de carbapenemases, como a KPC, limita bastante o tratamento. Assim, a continuidade do monitoramento da produção de cepas produtoras de KPC e da disseminação de um clone único no estado de São Paulo é de fundamental importância no intuito de se criar novas estratégias para evitar a disseminação desses micro-organismos em nosso meio.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo 2009/53229-0).

REFERÊNCIAS

1. Abboud CS, Bergamasco M, Doi AD, Zandonadi EC, Barbosa VL, Cortez D, Saraiva CR, Doy C, Garcia DO. First Report of Investigation of an Outbreak due to carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a Tertiary Brazilian Hospital, with Extension to a Patient of the Community. *J. Infect Prev.* 2011;12(4):150-153.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21th informational supplement CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. Wayne, PA, USA.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). [Data de acesso: 29/05/2011]. Disponível em: http://eucast.org/fileadmin/srd/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.1.pdf.
4. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KE, et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46:2066-2069.
5. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R, Mickelsen PA, Murray BE, Perseing D, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(9):2233-2239.