

---

# Detecção de genes de resistência microbiana produzidos por *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecção ou colonização de diferentes hospitais do estado de São Paulo: padronização de PCR para outros genes de resistência microbiana produzidos por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de infecção e colonização hospitalar de vários hospitais do estado de São Paulo

---

Flávia Yngrid Mazza MACEDO\*, Amanda Gameiro BIASIOLI\*, Doroti de Oliveira GARCIA

Centro de Bacteriologia-Instituto Adolfo Lutz

\*Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)

---

**K***lebsiella pneumoniae* são bacilos Gram-negativos frequentemente envolvidos em infecções hospitalares. Os antibióticos beta-lactâmicos apresentam efeitos sobre a integridade da parede celular e destruição da bactéria. Em contrapartida, as bactérias desenvolveram diferentes mecanismos de resistência para neutralizar a ação dessas drogas, tais como a produção de beta-lactamases, enzimas que degradam o anel beta-lactâmico. Dentre essas enzimas, as principais são as beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), carbapenemases, tais como KPC, metalo-beta-lactamases (IMP, SPM, NDM) e oxacilinas<sup>1,2,3,4,5</sup>. Metilases 16S RNA ribossômico (16S RNAr), tal como RmtD, também têm se disseminado no Brasil, acarretando alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, os quais, associados aos carbapenêmicos, são amplamente

utilizados na terapêutica clínica<sup>6</sup>. O objetivo geral foi padronizar PCR para a detecção de genes de resistência em amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de colonização e/ou infecção hospitalar. Os objetivos específicos foram detectar genes de resistência responsáveis pela produção de KPC através da reação de polimerase em cadeia e padronizar PCR para a detecção de metalo  $\beta$ -lactamases,  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, oxacilinas e metilases 16S RNAr. Foram utilizadas cepas de *K.pneumoniae* enviadas de diversos hospitais do Estado de São Paulo suspeitas de serem produtoras de KPC, isoladas de amostras clínicas. Foram utilizados diversos métodos para a confirmação da identificação bioquímica, testes de sensibilidade (disco-difusão), PCR em termociclador gradiente para a padronização de protocolos de PCR para outros genes de resistência microbiana. No

período de setembro de 2011 a dezembro de 2011 e de 19 de abril a 24 de maio de 2012, 277 cepas de *K. pneumoniae*, isoladas de colonização, foram confirmadas como produtoras de ESBL e apresentaram resistência ou sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos. Todas as cepas foram submetidas ao PCR para a detecção do gene de  $bla_{KPC}$ . Das 277 cepas de *K. pneumoniae* submetidas ao PCR, 213 (77%) foram confirmadas como produtoras de KPC. Na padronização do protocolo para PCR multiplex para a detecção de  $bla_{KPC}$  e  $bla_{NDM}$ , a melhor temperatura de anelamento foi a 54 °C. Na padronização de protocolo para PCR para a detecção de metilase 16s rRNA (RmtD), os melhores parâmetros definidos foram com a temperatura de anelamento de 52,4°C e concentração de  $MgCl_2$  a 2 mM. A partir desses dados foi realizado um protocolo utilizando o Mix PCR (Easy Path) que tem, na sua composição, uma concentração de  $MgCl_2$  a 2 mM. Na padronização de protocolo para PCR multiplex para a detecção de MBLs ( $bla_{SPM}$  e  $bla_{IMP}$ ) os melhores parâmetros definidos foram com a temperatura de anelamento de 56,8°C com uso do Mix 2 Easy Path. O multiplex PCR funcionou muito bem para  $bla_{SPM}$ , mas não para  $bla_{IMP}$ , a reação será repetida com novos ajustes. Optamos pela padronização de um PCR multiplex que também pudesse detectar, além da  $bla_{KPC}$ , também a  $bla_{NDM}$ , porém não foram detectadas cepas produtoras de NDM nas cepas analisadas. Para detectar a presença da RmtD, uma metilase 16S RNAr, padronizamos uma reação de PCR, que será utilizada sempre que

houver a suspeita da produção dessa enzima, ou seja, alto nível de resistência aos aminoglicosídeos. Portanto, a continuidade da padronização de PCR para a detecção de outros genes de resistência é de fundamental importância no intuito de se criar novas estratégias para evitar a disseminação desses microrganismos em nosso meio.

## REFERÊNCIAS

1. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an Epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;52(4):699-702.
2. De Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC, et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(5):1790-3.
3. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(1):333-4.
4. Abboud CS, Bergamasco MD, Doi AM, Zandonadi EC, Barbosa V, Cortez D, et al. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. *J Infect Prevent.* 2011;12(4):150-3.
5. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordman P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:119-223.
6. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007;45(1):88-94.