



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Graduação em Biotecnologia

Wirlaine Glauce Maciel

**DETECÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla*_{KPC} EM
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Dourados / MS
Março / 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Graduação em Biotecnologia

**DETECÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla*_{KPC} EM
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Wirlaine Glauce Maciel

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone Simionatto

Dourados / MS
Março / 2014

Wirlaine Glauce Maciel

**DETECÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla*_{KPC} EM *KLEBSIELLA*
*PNEUMONIAE***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, com a comissão formada por:

Prof^a Dr^a Simone Simionatto
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

MSc. Nathalie Gaebler Vasconcelos
Universidade Federal da Grande Dourados
Hospital Universitário da Grande Dourados

Kesia Esther da Silva
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências da Saúde

Dourados, 07 de Março de 2014

Dedico este trabalho...

À minha família, ao meu namorado, amigos, colegas de trabalho e à minha orientadora. Dedico a eles e a todos aqueles que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis e felizes, pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível...

Agradecimentos

É com muita alegria que aqui expresso o meu profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível...

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me proporcionado força e ter me carregado no colo nos momentos mais difíceis.

À minha família, a qual eu amo muito, pelo carinho, paciência, incentivo e por acreditarem em mim.

Ao meu namorado, por estar ao meu lado, compreender as minhas dificuldades e a minha falta de tempo.

À minha orientadora, Dr^a Simone Simionatto, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ela e ter me mostrado o caminho da pesquisa.

Aos amigos, pelo incentivo e que de alguma forma colaboraram para este trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, os quais me acolheram nas dificuldades e me ajudaram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À todos os professores que participaram da minha graduação e deste projeto, os quais me fizeram encontrar o caminho do conhecimento.

À Universidade Federal da Grande Dourados, ao CNP2 e a Fundect-MS, pelo espaço cedido, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

“Não existe nada de completamente errado no mundo, mesmo um relógio parado, consegue estar certo duas vezes por dia.”

Paulo Coelho

Sumário

Lista de tabelas	i
Lista de gráficos	ii
Lista de figuras	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1 Introdução	1
2 Objetivos	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 Revisão de literatura	4
3.1 Infecção hospitalar	4
3.2 Enterobactérias	5
3.3 Produção de beta-lactamases	7
3.4 Resistência aos carbapenêmicos e produção de carbapenemases	9
3.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	11
Artigo – Detecção Molecular do gene <i>bla</i> _{KPC-2} em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
4 Introdução	14
5 Material e Métodos	16
5.1 Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa	16
5.2 Coleta e isolamento das amostras bacterianas	16
5.3 Identificação microbiológica de Enterobactérias produtoras de carbapenemases e antibiograma	16
5.4 Teste Modificado de Hodge	17
5.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	17
5.6 Avaliação da presença do gene <i>bla</i> _{KPC-2} pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
6 Resultados	19
6.1 Coleta e isolamento das amostras bacterianas	19
6.2 Teste Modificado de Hodge	21
6.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	22
6.4 Avaliação da presença do gene <i>bla</i> _{KPC-2}	24
7 Discussão	25
8 Conclusão	28

9 Referências

29

10 Anexo

35

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *bla*_{KPC-2}. 18

Tabela 2. Pontos de corte utilizados para interpretação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$), segundo os critérios preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2013. 22

Tabela 3. Variação da efetividade dos carbapenêmicos no teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) 23

Tabela 4. Resultado do MIC das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem. 23

Lista de gráficos

Gráfico 1. Número de cepas de *Klebsiella pneumoniae* coletadas entre os meses de fevereiro de 2012 à abril de 2013. 19

Gráfico 2. Número de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases distribuídas por grupos etários de pacientes internados no HU. 20

Gráfico 3. Número de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases isoladas em diferentes alas do hospital. 20

Gráfico 4. Distribuição de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases isoladas de diferentes amostras clínicas. 21

Lista de figuras

Figura 1. Teste de Hodge Modificado utilizando o antimicrobiano ertapenem. 22

Figura 2. Gel de agarose 1% corado com GelRed do produto amplificado por PCR de cepas de *Klebsiella pneumoniae*. 24

Resumo

Klebsiella pneumoniae pertence à família *Enterobacteriaceae* e tem emergido como um patógeno oportunista, capaz de desenvolver infecções adquiridas em ambientes hospitalares. Carbapenemases do tipo KPC são enzimas frequentemente encontradas em enterobactérias e representam um grave problema por inibirem a ação de antibióticos carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactâmicos, reduzindo as opções terapêuticas e aumentando o índice de infecções nosocomiais. Com o surgimento de vários surtos de infecção hospitalar ocasionados por KPC, esta passou a compor um importante mecanismo de resistência no contexto de infecção hospitalar mundial e a sua pesquisa se tornou um fator relevante a fim de restringir sua disseminação. Este trabalho teve como objetivo caracterizar cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS. As cepas de *K. pneumoniae* foram coletadas entre 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), utilizando os antibióticos meropenem, imipenem e ertapenem. A avaliação do gene *bla*_{KPC-2} foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste estudo, foram isoladas 59 cepas de *K. pneumoniae*, provenientes principalmente 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}. Estes resultados demonstram uma alta prevalência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no Hospital Público de Dourados. Acredita-se que estes resultados irão contribuir para ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por micro-organismos multirresistentes de interesse clínico.

Palavras-chave: Infecção hospitalar; *Enterobacteriaceae*; Carbapenêmicos.

Abstract

Klebsiella pneumoniae belongs to the family *Enterobacteriaceae* and has emerged as an opportunistic pathogen, capable of developing infections acquired in hospital environments. KPC-types carbapenemase enzymes are frequently found in enterobacteria and represents a serious problem by inhibiting the action of carbapenem antibiotics, cephalosporins and monobactams, reducing the therapeutic options and increasing the rate of nosocomial infections. With the emergence of several outbreaks of nosocomial infection caused by KPC, it began to compose an important mechanism of resistance in the context of hospital infection worldwide and research has become an important factor to restrict spread. This study aimed to characterize KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients at the Public Hospital in Dourados/MS. The strains of *K. pneumoniae* were collected from February 2012 to April 2013. Strains with a carbapenem intermediate or resistant profile were submitted to Modified Hodge Test. The evaluation of the susceptibility profile to carbapenem was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC), using the antibiotics meropenem, imipenem and ertapenem. The assessment of *bla*_{KPC-2} gene was performed using Polymerase Chain Reaction (PCR). In this study, 59 *K. pneumoniae* strains were isolated, mainly from samples of urine culture, rectal swab and tracheal secretion. These strains were tested in Modified Hodge Test and 97% were positive. In the determination of the MIC, 87% of these strains were resistant to the antibiotic imipenem, 93% to meropenem and 98% to ertapenem. When the 59 strains were assessed in PCR for *bla*_{KPC-2} gene, 83% showed positive results. These results show the high prevalence of KPC-producing *K. pneumoniae* strains in the Public Hospital in Dourados/MS. We believe that these results will contribute to preventive actions in the control of hospital infections caused by multidrug-resistant microorganisms of clinical interest.

Keywords: Hospital infection; *Enterobacteriaceae*; Carbapenems.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias multirresistentes responsáveis por infecções hospitalares são consideradas um grande desafio à Saúde Pública. Devido aos seus altos índices de resistência aos antibióticos associados à morbidade e mortalidade e por acometerem um alto número de indivíduos em ambientes hospitalares (TORTORA et al., 2005). Bactérias da família *Enterobacteriaceae* vem sendo apontadas como responsáveis por surtos ligados a diversos quadros infecciosos, como infecções urinárias, pneumonias, sepse, bacteremias, meningites, dentre outras (WILLIAMS, 1999; TAVARES, 2001).

Com o surgimento e a disseminação de cepas produtoras de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) resistentes a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, houve um aumento significativo no uso terapêutico de antibióticos carbapenêmicos, resultando em um número crescente de isolados de enterobactérias resistentes a estes compostos (POIREL et al., 2007; NORDMANN et al. 2011). Neste contexto, a produção de enzimas resistentes aos carbapenêmicos passou a emergir de forma alarmante, sendo as carbapenemases, as enzimas que contribuem de forma mais eficaz para a resistência à classe dos carbapenêmicos, além do mais, as metalo- β -lactamases (MBLs) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), constituem as carbapenemases de maior importância clínica (NAAS et al., 2008).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é uma enzima beta-lactamase que confere resistência aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem), bem como a outros beta-lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Esta enzima pertence ao grupo A de Ambler e foi inicialmente descrita em *Klebsiella pneumoniae* (YIGIT et al., 2001), no entanto, pode ser encontrada em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia* spp, *Serratia* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, dentre outras (BRATU et al., 2005; DIENSTMANN et al., 2010).

A produção de enzimas KPC por isolados clínicos tem sido reportada com maior frequência nos últimos anos. Estas carbapenemases são notáveis por seu amplo espectro de atividade e pelo fato dos genes que as codificam estarem localizados em plasmídeos, os quais apresentam grande capacidade de mobilidade (NORDMANN et al., 2009). Desta forma, a identificação de *K. pneumoniae* carbapenemase, bem como os fatores de risco associados à infecções causadas por estes micro-organismos, contribuem para o controle e redução da disseminação desta resistência frente a outras enterobactérias (DIENSTMANN et al., 2010).

Na região da Grande Dourados não existem relatos sobre o monitoramento de cepas multirresistentes produtoras de KPC de interesse clínico, portanto, buscando

contribuir nesta linha, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC, isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase em amostras clínicas de pacientes internados no HU;
- Identificar cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase através do Teste Modificado de Hodge;
- Determinar o perfil de susceptibilidade de cepas de *K. pneumoniae* aos antibióticos carbapenêmicos pelo teste de Concentração Inibitória Mínima;
- Identificar a presença do gene *bla_{KPC-2}* em cepas de *K. pneumoniae* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a eficácia da detecção de carbapenemases pelo Teste Modificado de Hodge, utilizando-se da detecção do gene *bla_{KPC-2}* pela PCR como comparativo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Infecção Hospitalar

Infecções hospitalares ocasionadas por bactérias multirresistentes constituem um grave problema para a saúde pública, devido à constante ameaça de disseminação destes micro-organismos. As infecções hospitalares contribuem para maiores índices de morbidade, mortalidade, tempos de internação prolongados e altos custos decorrentes destas internações, além do mais, sua contenção constitui um grande desafio a ser enfrentado pelo setor público de saúde (OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008).

Segundo Bradford (2001), o controle das infecções hospitalares são de difícil conduta devido às condições dos pacientes no ambiente hospitalar. As doenças de base dos pacientes internados, tais como diabetes, falência renal ou neoplasias, além de longos períodos de internação, procedimentos invasivos, uso de cateteres e pacientes submetidos a longas exposições com antibióticos, são fatores que contribuem para a prevalência de bactérias multirresistentes em ambientes hospitalares (SINGH et al., 2006; SIEGEL et al., 2007).

Em pacientes hospitalizados, infecções no trato urinário são consideradas as mais comuns, no entanto, infecções respiratórias e da corrente sanguínea são as que apresentam maior gravidade (PELEG & HOOPER, 2005). Além disso, pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão expostos a diversos fatores, os quais contribuem para o aumento nas taxas de infecções em relação às demais unidades de internação (VINCENT, 2009).

No intuito de obter sucesso no controle de infecções hospitalares e contenção de cepas resistentes, algumas medidas são recomendadas, como a restrição do uso de antibióticos de amplo espectro, monitoramento e isolamento de pacientes colonizados e uso alternado das classes de antibióticos, visando principalmente limitar a pressão seletiva de micro-organismos encontrados nos ambientes hospitalares (BRADFORD, 2001). Cuidados na manipulação de pacientes submetidos a procedimentos invasivos, higienização de pacientes, alas hospitalares e corpo clínico, bem como, a realização de uma vigilância clínica e epidemiológica de pacientes admitidos nas UTIs são ações que também contribuem para minimizar a disseminação de micro-organismos multirresistentes (PESSOA-SILVA et al., 2003).

3.2 Enterobactérias

Neste contexto de infecção hospitalar, bactérias da família *Enterobacteriaceae* se destacam como importantes agentes infecciosos, pois frequentemente exibem fenótipos de resistência a múltiplos antibióticos, o que dificulta o controle dessas infecções (SADER, 2000).

A família *Enterobacteriaceae* constitui a maior e mais heterogênea família de bacilos gram-negativos relacionados a casos de infecções hospitalares (KONEMAN et al., 2006). Estes micro-organismos apresentam como principal característica a resistência natural ou adquirida a antibióticos (FERREIRA & SOUZA, 2000), podendo causar infecções urinárias, pneumonias, infecções do trato respiratório, gastrointestinal, septicemias, bacteremias, dentre outras (PITOUT, 2010).

Bactérias pertencentes a esta família vêm sendo apontadas como responsáveis por surtos ligados aos quadros infecciosos, devido aos seus altos índices de resistência aos antibióticos e por acometerem um grande número de indivíduos em ambientes hospitalares (WILLIAMS, 1999).

Membros da família *Enterobacteriaceae* são importantes patógenos clínicos (PATERSON, 2006), sendo os principais gêneros gram-negativos, *Escherichia* spp, *Citrobacter* spp, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp, *Serratia* spp, *Enterobacter* spp, dentre outros (BRATU et al., 2005).

Apesar de um número relevante de gêneros envolvidos em infecções hospitalares, a maioria dos quadros infecciosos se dá por um número restrito de espécies de enterobactérias. Espécies como *S. marcescens*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* são as mais descritas nos ambientes hospitalares, no entanto, *K. pneumoniae* é a espécie isolada com maior frequência (KONEMAN et al., 2006), envolvida principalmente em casos de pneumonias (OLIVEIRA et al., 2009).

Os principais sítios de infecção, onde cepas de *K. pneumoniae* são isoladas são o trato respiratório, trato urinário, regiões intra-abdominais e corrente sanguínea (KONEMAN et al., 2006). São consideradas importantes patógenos hospitalares e possuem potencial para causar morbidade severa e mortalidade em pacientes internados (MENDES et al., 2008; NORDMAN & POIREL, 2002).

K. pneumoniae possuem características bioquímicas que permitem a sua identificação (KONEMAN et al., 2006). São oxidases-negativas, anaeróbias facultativas, fermentam glicose, reduzem nitrato, lisina positiva, citrato e indol negativos, possuem cápsula polissacarídica, que constitui um fator de patogenicidade, responsável pela resistência a diversos mecanismos de defesa do hospedeiro (KONEMAN et al., 2006).

Além disso, em ágar MacConkey, cepas de *K. pneumoniae* produzem colônias grandes e gomosas, róseas e brilhantes, o que permite a sua fácil identificação macroscópica (MARTINEZ et al., 2004).

3.3 Produção de β -lactamases

Antibióticos beta-lactâmicos exercem sua atividade através da ação de um anel existente em sua estrutura molecular, o que permite sua ação bacteriolítica frente a bactérias patogênicas. Dentre estes antibióticos, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (GARCIA et al., 2010) são amplamente utilizados na clínica médica.

No entanto, mecanismos de resistência bacteriana frente a antibióticos beta-lactâmicos vem sendo reportados com maior frequência nos ambientes hospitalares. Os mecanismos mais frequentes envolvidos na resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, são a impermeabilidade da membrana externa, produção bacteriana de diversas beta-lactamases, mudança no sítio ativo do antimicrobiano, dentre outros (PELEG & HOOPER, 2005).

De acordo com Bush e Jacoby (2010), a produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência de maior importância clínica. Estas enzimas atuam rompendo o anel da estrutura molecular, inativando a ação do antibiótico beta-lactâmico.

Os genes que codificam as enzimas β -lactamases são denominados genes *bla*. Podem ser transferidos através de plasmídeos e/ou transposons, (CARATTOLI, 2009). Estes genes se encontram em constante mutações, em resposta à pressão seletiva exercida pelos antibióticos utilizados no controle de micro-organismos produtores de diferentes beta-lactamases, o que contribui para a fácil disseminação de cepas multirresistentes (NOYAL et al., 2009).

As enzimas beta-lactamases foram divididas em classes de acordo com a similaridade entre as sequências dos aminoácidos, que segundo Ambler et al., (1991), são identificadas como classes A, B, C e D. Na classe A, estão incluídas as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbapenemases do tipo serina, como as KPCs. Na classe B, as metalo-beta-lactamases, na classe C, encontra-se as cefalosporinas (AmpC) e na classe D, as oxacilinas (AMBLER et al., 1991).

Segundo Bush & Jacoby (2010), a classificação se baseia na atividade enzimática, sendo as beta-lactamases divididas em três grupos. O grupo 1, pertence às cefalosporinas, classificadas na classe molecular C. O grupo 2, é formado pelas enzimas pertencentes ao grupo A e D de Ambler. Enquanto o grupo 3, é constituído pelas enzimas metalo-beta-lactamases (MBLs).

Por conta das enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) conferirem resistência a várias classes de antibióticos, como cefalosporinas e penicilinas (AMBLER et al., 1991; NORDMANN e POIREL, 2002; POIREL et al., 2007), antibióticos

carbapenêmicos foram por muito tempo considerados medicamentos de escolha na terapia contra infecções causadas por micro-organismos gram-negativos devido à sua estabilidade frente a enzimas ESBL e ao seu amplo espectro de ação (QUEENAN & BUSH, 2007). No entanto, o aumento significativo do uso terapêutico de antibióticos carbapenêmicos associado à exposição a outros medicamentos, bem como a ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar, permitiram a emergência de micro-organismos produtores de carbapenemases (POIREL et al., 2007; NORDMANN et al. 2011).

3.4 Resistência aos carbapenêmicos e produção de carbapenemases

Antibióticos carbapenêmicos são considerados beta-lactâmicos de amplo espectro de atividade. Agem inibindo a síntese da parede bacteriana através da ligação e inativação de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e lise celular da bactéria (OLIVEIRA et al., 2009).

Antibióticos carbapenêmicos possuem amplo espectro de ação *in vitro* contra cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e bactérias anaeróbias (MOHR, 2008), além de serem considerados drogas de escolha no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes (WOODFORD et al., 2004).

As enterobactérias apresentam diversos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos como a modificação na permeabilidade da membrana, por perda ou modificações na estrutura dos canais de porina, aumento na regulação das bombas de efluxo, hiperexpressão de AmpC ou ESBL associados a produção de carbapenemases (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009).

A alteração na permeabilidade da membrana se dá por modificações genéticas nos canais das porinas, o que diminui a entrada do antibiótico no interior da bactéria, promovendo a resistência (NIKAIDO, 2003).

No caso da regulação das bombas de efluxo, a resistência bacteriana resulta da atividade de proteínas que promovem a expulsão do antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular, observando-se uma diminuição da sua concentração no interior da célula (CHOPRA & ROBERTS, 2001).

Em relação a alteração enzimática, a produção de enzimas capazes de hidrolisar os antibióticos, constitui um dos principais mecanismos de resistência, as quais possuem capacidade de modificar estas drogas e inativar sua ação bacteriolítica (LIVERMORE, 2002).

As carbapenemase podem ser codificadas por genes de origem cromossômica ou origem plasmidial. Carbapenemases de origem cromossômica são derivadas de genes SME, NMC e IMI, as quais são descritas nas espécies *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Já as carbapenemases de origem plasmidial são derivadas dos genes KPC e GES, sendo descritas na espécie *Klebsiella pneumoniae*, mas também podem ser encontradas em outras espécies da família *Enterobacteriaceae* (QUEENAN, BUSH, 2007).

Enzimas carbapenemases apresentam a capacidade de hidrolisar e conferir resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos (ertapenem, meropenem, imipenem) (QUEENAN e BUSH, 2007), sendo transmitidas a diferentes cepas de enterobactérias através de plasmídeos, os

quais permitem a troca de material genético entre diferentes gêneros e espécies de enterobactérias (BURNS et al., 2011). Esta disseminação plasmidial explica o rápido desenvolvimento de surtos em ambientes hospitalares, principalmente em casos envolvendo patologias crônicas, pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), imunossuprimidos e pacientes cirúrgicos (LANDMAN et al., 2012).

As carbapenemases de maior importância para a clínica médica são as metalo beta-lactamases e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (YIGIT et al., 2001).

3.5 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

O mecanismo de resistência que se destaca na família *Enterobacteriaceae*, é a produção de beta-lactamases, que conferem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Dentre as enzimas capazes de hidrolisar estes compostos, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) são as enzimas mais frequentes e com maior importância clínica (YIGIT et al., 2001).

A KPC é classificada fenotipicamente na classe A de Ambler e, pertence ao grupo 2 de Bush. Esta enzima é codificada pelo gene *bla*_{KPC} (NORDMANN et al., 2011) e foi isolada primeiramente em *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001) na Carolina do Norte, em 1996 (KITCHEL et al., 2009). No entanto, no decorrer dos anos, a enzima KPC passou a ser identificada em diversos patógenos envolvidos em infecções nosocomiais pelo mundo (CUZON et al., 2010).

Embora o gene *bla*_{KPC} tenha sido isolado primeiramente em *K. pneumoniae*, o mesmo já foi encontrado em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia* spp, *Serratia* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, dentre outros (BRATU et al., 2005; DIENSTMANN et al., 2010).

Os genes relacionados com a produção desta resistência aos antibióticos beta-lactâmicos estão inseridos em uma estrutura genética móvel, o transposon *Tn4401* (NAAS et al., 2008), o qual é responsável pela fácil disseminação de genes de resistência (CUZON et al., 2010).

O transposon *Tn4401*, pertence à família Tn3 e serve de suporte genético para o gene *bla*_{KPC} (NAAS et al., 2008). Este transposon apresenta um tamanho de 10kb e sua estrutura compreende, além do gene *bla*_{KPC}, duas sequências repetitivas invertidas (IRR e IRL), um gene da transposase, que catalisa o movimento do transposon para outro local do genoma, um gene de resolvase ou repressor da transposase e duas sequências de inserção (SI), a ISKpn6 e ISKpn7, as quais entre elas pode haver uma deleção de 100 a 200 pb, o que determina as variantes do transposon *Tn4401* (NAAS et al., 2005; KITCHEL et al., 2009).

Até o momento 10 variantes de KPC (KPC-2 a KPC-11) já foram descritas, sendo KPC-2 e KPC-3 as mais frequentes (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009). Estas variantes já foram encontradas em cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter* sp (KPC-2), *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (KPC-3) *Acinetobacter baumannii* (*bla*_{KPC-10}) e *Pseudomonas aeruginosa* (*bla*_{KPC-5}), evidenciando a disseminação de elementos genéticos móveis não só dentro da mesma família, mas entre gêneros bacterianos distintos (CUZON et al., 2010; CAI et al., 2008).

No Brasil, o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foi em 2006, isoladas de quatro pacientes hospitalizados em uma UTI de Recife (MONTEIRO et al., 2009). Um mês depois, foi publicado outro relato de KPC-2 encontrada em seis isolados de *K. pneumoniae* em dois hospitais do Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009). Desde então, vários relatos de KPC surgiram nos estados brasileiros. No estado do Mato Grosso do Sul o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, foi em 2010 (CHANG et al., 2013).

Cepas produtoras de enzimas KPC vem demonstrando variável atividade na hidrólise aos antibióticos carbapenêmicos, devido aos genes de regulação da expressão da enzima e do ambiente genético no qual o gene *bla_{KPC}* está localizado, bem como das alterações na permeabilidade da membrana externa (KITCHEL et al., 2009).

Bactérias produtoras de KPC são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos, o que torna o tratamento de infecções ocasionadas por essas bactérias cada vez mais restrito, limitando as opções terapêuticas. Além disso, cepas produtoras de KPC são frequentemente resistentes a uma ampla gama de antibióticos não beta-lactâmicos e observa-se que em diversos casos infecciosos ocasionados por cepas produtoras de KPC, as opções terapêuticas são polimixinas, tigeciclinas e aminoglicosídeos, os quais apresentam atividade *in vitro* frente à estas bactérias. No entanto, já foi observado que a monoterapia para combater essas infecções geralmente não possuem uma boa resposta clínica, sendo necessária a associação de antibióticos (FALAGAS et al., 2011).

ARTIGO

**DETECÇÃO MOLECULAR DO GENE *bla_{KPC}* EM *KLEBSIELLA*
*PNEUMONIAE***

4 INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares ocasionadas por bactérias multirresistentes constituem um grave problema aos órgãos públicos, por causarem aumento nos casos de morbidade e mortalidade, tempos de internação prolongados e altos custos com internação (OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008). Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* vêm sendo apontadas como responsáveis por surtos ligados aos quadros infecciosos, devido aos índices de resistência aos antibióticos e por acometerem um grande número de indivíduos em ambientes hospitalares (WILLIAMS, 1999).

Enterobactérias produtoras de beta-lactamases são responsáveis por inativarem penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, conferindo, portanto, resistência à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos. Por conta disso, houve um aumento significativo no uso terapêutico de antibióticos carbapenêmicos, resultando em um número crescente de isolados de enterobactérias também resistentes a estes compostos (POIREL et al., 2007; NORDMANN et al., 2011). A resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer devido à produção de β -lactamases, à impermeabilidade da membrana externa ou à hiperexpressão de bombas de efluxo. Entretanto, o mecanismo que contribui de forma mais eficaz para a resistência a esta classe de drogas é a produção de carbapenemases, como as metalo- β -lactamases (MBLs) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (YIGIT et al., 2001).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é considerada a enzima clinicamente mais comum, sendo codificada pelo gene *bla*_{KPC} (NORDMANN et al., 2011). Esta enzima pertence à classe A de Ambler e foi isolada primeiramente em *Klebsiella pneumoniae* (YIGIT et al., 2001) na Carolina do Norte, em 1996 (KITCHEL et al., 2009). Desde então passou a ser identificada em diversos casos de infecções nosocomiais pelo mundo (CUZON et al., 2010). No Brasil, o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foi em 2006, em Recife (MONTEIRO et al., 2009). Um mês depois, foi publicado outro relato de carbapenemase KPC-2 encontrada em seis isolados de *K. pneumoniae* em dois hospitais do Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009).

Embora o gene *bla*_{KPC} tenha sido isolado primeiramente em *K. pneumoniae*, o mesmo já foi encontrado em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia* spp, *Serratia* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, dentre outros (BRATU et al., 2005; DIENSTMANN et al., 2010). Os genes relacionados com a produção desta resistência estão inseridos em uma estrutura genética móvel, o transposon *Tn4401* (NAAS et al., 2008), uma estrutura genética responsável pela fácil disseminação de genes resistentes (CUZON et al., 2010). Com o surgimento de vários surtos de *K. pneumoniae*

produtoras de carbapenemase, esta passou a compor um importante mecanismo de resistência no contexto de infecção hospitalar mundial e a sua pesquisa se tornou um fator relevante a fim de restringir sua disseminação (DIENSTMANN, 2010).

Na região da Grande Dourados não existem relatos sobre o monitoramento de cepas multirresistentes produtoras de KPC de interesse clínico. Considerando que o perfil de resistência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase pode variar de acordo com a complexidade do hospital, características dos pacientes atendidos, doenças subjacentes e frequência no uso de antibióticos em cada ambiente hospitalar (CHANG et al., 2013). O levantamento de cepas produtoras de carbapenemase nos hospitais da nossa região torna-se um fator importante na busca de medidas de contenção mais adequadas à realidade de nossos hospitais.

Buscando contribuir nesta linha, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC, isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS. O desenvolvimento deste projeto possibilitará o monitoramento da ocorrência de cepas produtoras de KPC de interesse clínico contribuindo para delinear a amplitude do problema e definir opções de tratamento e medidas de contenção adequadas.

5 MATERIAL e MÉTODOS

5.1 Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-UFGD)

Este projeto foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), com o número do parecer 130.754/2012 (Anexo A).

5.2 Coleta e isolamento das cepas bacterianas

As cepas bacterianas foram coletadas de fevereiro de 2012 a abril de 2013 e foram isoladas de pacientes internados em 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.

5.3 Identificação microbiológica de enterobactérias produtoras de carbapenemase 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). A seleção dos antibióticos testados (ampicilina, gentamicina, tobramicina, amicacina, ampicilina/sulbactam, cefepime, ceftazidima, cefuroxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, ertapenem, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim, aztreonam, ceftazidima, cloranfenicol, tetraciclina, cefalotina, norfloxacina, nitrofurantoína), obedeceu à mesma padronização, através do protocolo M100-S23 de Janeiro de 2013.

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, segundo as recomendações publicadas no CLSI (2013), foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde (UFGD), onde foram realizados os demais testes.

5.4 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). O teste modificado de Hodge foi realizado da seguinte forma: preparou-se uma suspensão de 0,5 de McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922 em salina. Foi inoculado em uma placa de Mueller Hinton, com auxílio de um swab. Após a placa secar, foi colocado o disco de ertapenem (10ug/ml). Realizou-se estrias em linha reta da borda do disco para as extremidades da placa, utilizando 4 cepas em estudo em cada placa. De forma similar, ocorreu com os controles negativo e positivo em posições diferentes. As placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 35°C, e então avaliado as distorções nos halos de inibição.

Foram utilizadas como cepas padrão para os testes fenotípicos a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1706 (controle negativo) e a *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1705 (controle positivo).

5.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A avaliação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (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. As cepas foram inoculadas em microplacas de 96 poços e submetidas às condições de 36°C por 24 horas. Após este período, a MIC foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do micro-organismo.

5.6 Avaliação da presença do gene *bla_{KPC-2}* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As cepas de *K. pneumoniae* positivas e negativas para o teste modificado de Hodge, foram semeadas em MacConkey ágar e submetidas à extração de DNA por lise térmica e posterior avaliação genotípica conforme Cuzon et al., 2010, apresentando algumas modificações. As reações de 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 em um termociclador (MyCycler Bio RAD) 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 de PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience). A tabela 1 demonstra a sequência de *primers* utilizados para amplificar o gene *bla*_{KPC-2}.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *bla*_{KPC-2}.

<i>Primer</i>	Sequência
KPC <i>Forward</i>	5' TCTGGACCGCTGGGAGCTGG 3'
KPC <i>Reverse</i>	5' TGCCCGTTGACGCCCAATCC 3'

6 RESULTADOS

6.1 Coleta e isolamento das cepas bacterianas

No período de fevereiro de 2012 a abril de 2013 foram coletadas 127 cepas de enterobactérias com perfil resistente ou intermediário a cefalosporinas de terceira geração, isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS. Destas, 59 cepas (47%) foram identificadas como *K. pneumoniae*.

A partir dos registros cedidos pelo laboratório de microbiologia do hospital, pode-se observar que os meses de janeiro e março de 2013 foram os que apresentaram maior número de cepas de *K. pneumoniae* isoladas. Estes resultados podem ser observados no gráfico 1, o qual demonstra que o mês de março de 2013 apresentou um total de 14 cepas (24%) coletadas, seguido do mês de janeiro de 2013, com 9 cepas (15%) de *K. pneumoniae* isoladas. Em contrapartida, é possível observar também que os meses de abril, junho e setembro de 2013, foram os meses de menor coleta, com apenas uma cepa de *K. pneumoniae* coletada em cada mês.

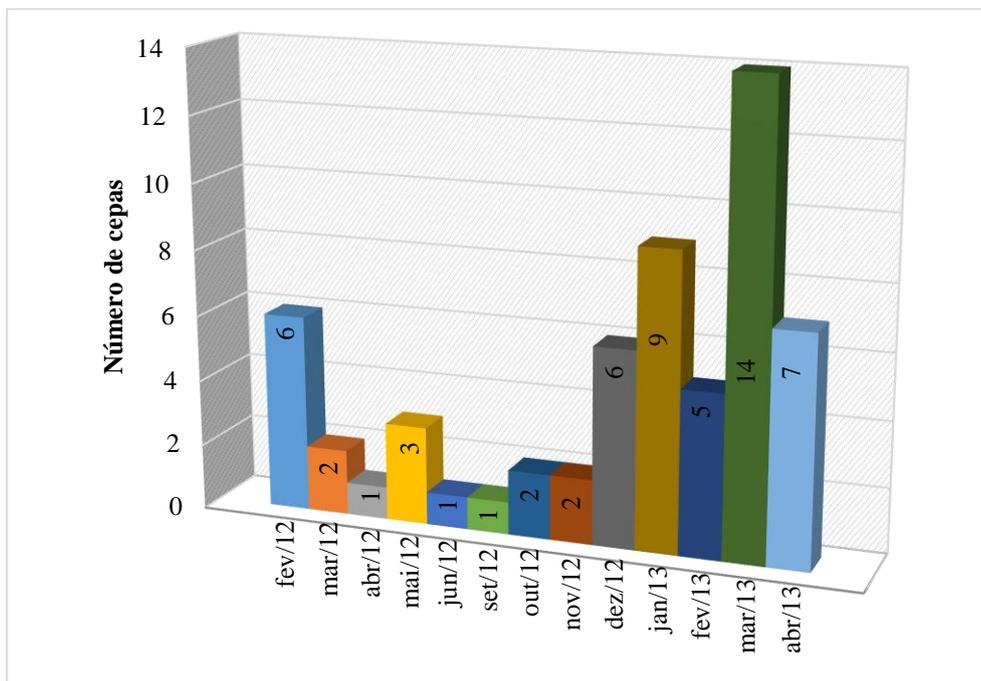


Gráfico 1. Número de cepas de *K. pneumoniae* coletadas entre os meses de fevereiro de 2012 à abril de 2013.

Foi observado que a prevalência de *K. pneumoniae* foi maior em indivíduos com faixa etária acima dos 60 anos, demonstrando um alto índice de pacientes idosos acometidos por *K. pneumoniae*. Cerca de 56% se encontram na faixa etária acima dos 60 anos de idade, seguidos de pacientes alocados na faixa etária entre 46-60 anos (19%). Neste estudo não foram evidenciados altos índices de cepas de *K. pneumoniae* na faixa

etária que compreende recém-nascidos e crianças (3%), conforme pode ser observado no gráfico 2.

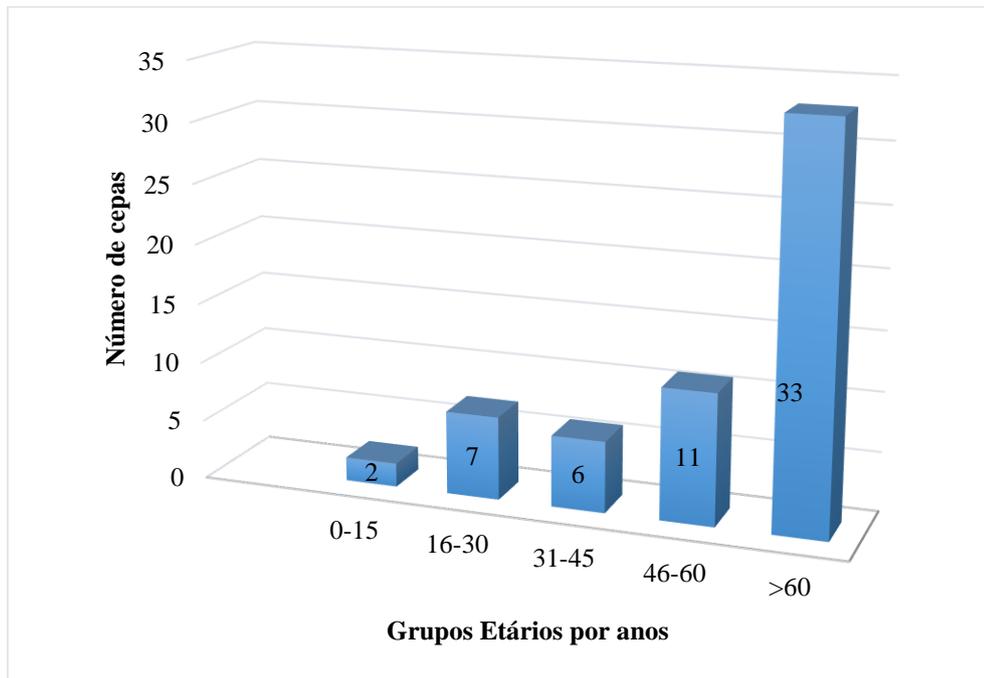


Gráfico 2. Número de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase distribuídas por grupos etários de pacientes internados no HU.

Dentre as alas hospitalares, as que apresentaram maior incidência de cepas coletadas de *K. pneumoniae* foram as UTIs A e B, além do Posto de Atendimento 4, conforme apresentado no gráfico 3.

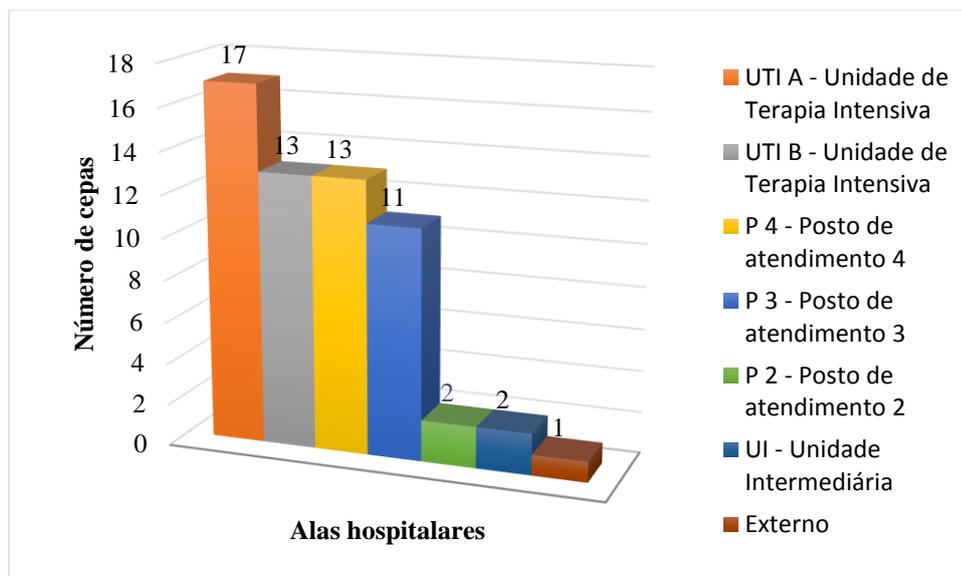


Gráfico 3. Número de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase em diferentes alas hospitalares. Gráfico de incidência/paciente/dia

As fontes de infecção mais comuns, das quais foram isoladas as cepas de *K. pneumoniae*, foram 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* coletada no período de realização da coleta. O gráfico 4 demonstra este resultado.

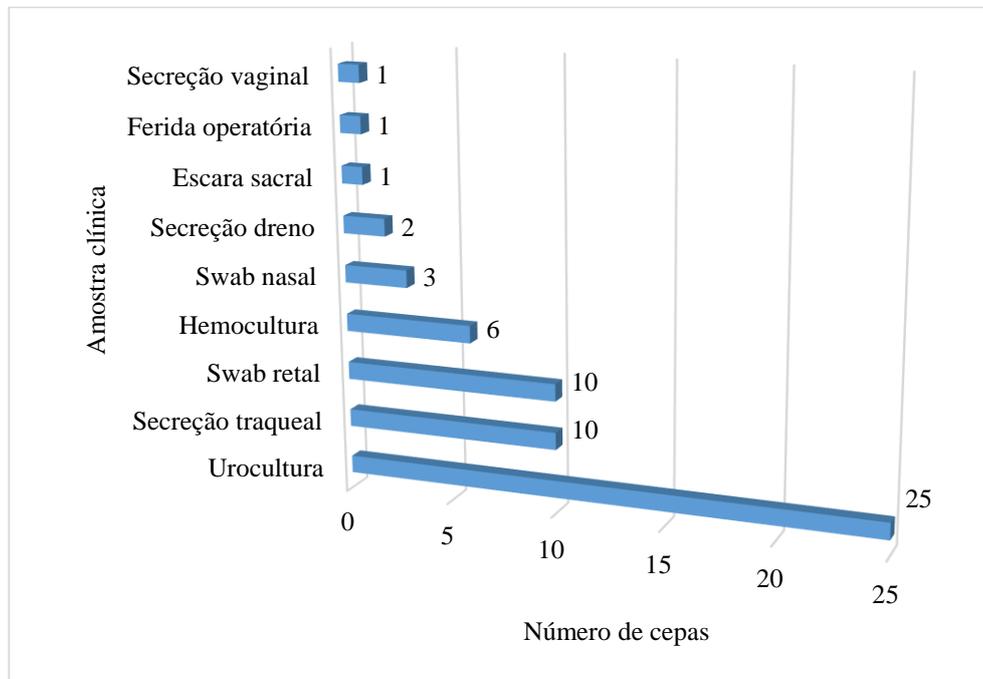


Gráfico 4. Distribuição de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase isoladas de diferentes amostras clínicas.

6.2 Teste Modificado de Hodge

No teste de sensibilidade frente ao antibiótico ertapenem, 57 cepas de *K. pneumoniae* (97%) apresentaram resultado positivo, indicando que são possivelmente cepas produtoras de carbapenemases. Os resultados obtidos no teste modificado de Hodge foram confirmados pela técnica de PCR. A Figura 1 demonstra o resultado positivo no teste modificado de Hodge de três cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase avaliadas neste estudo.

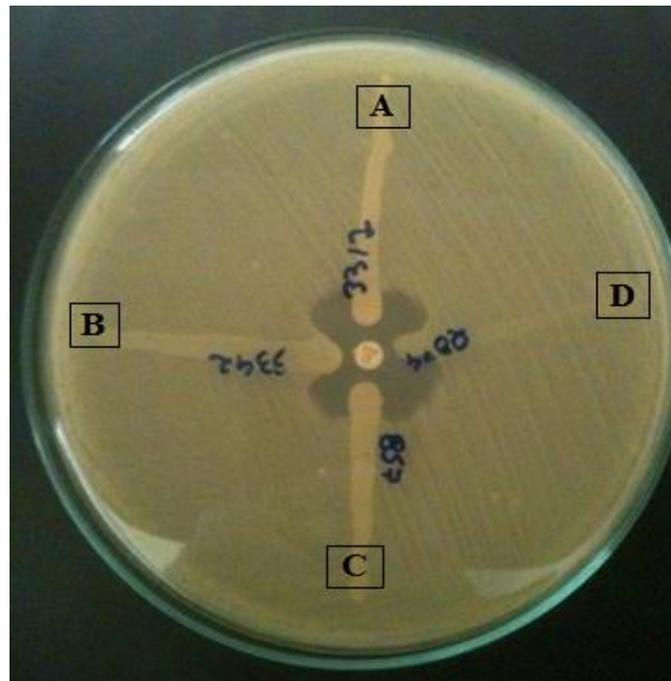


Figura 1. Teste de Hodge Modificado utilizando o antibiótico ertapenem (10 µg/ml). Testes positivos (B, C e D), teste negativo (A).

6.3 Concentração Inibitória Mínima

A determinação da MIC frente aos antibióticos carbapenêmicos considerou resistente as cepas que apresentaram uma MIC maior/igual a 2 para ertapenem e maior/igual a 4 para imipenem e meropenem.

A determinação da MIC, frente aos antibióticos carbapenêmicos seguiu as padronizações do CLSI (2013), conforme a tabela 2.

Tabela 2. Pontos de corte utilizados para interpretação do MIC (µg/mL) como sensível, intermediário ou resistente, respectivamente, segundo os critérios preconizados pelo CLSI (2013).

Agentes Antimicrobianos	Interpretação do MIC (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ertapenem (ERT)	<0,5	1	>2
Imipenem (IMI)	<1	2	>4
Meropenem (MER)	<1	2	>4

No teste de MIC, os 3 carbapenêmicos avaliados, demonstraram efetividade diferente entre si. A tabela 3 apresenta a variação na efetividade destes antibióticos obtida a partir dos resultados do MIC.

Tabela 3. Variação da efetividade dos carbapenêmicos no teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Sensibilidade das amostras ($\mu\text{g/ml}$)	Número de cepas		
	Ertapenem	Meropenem	Imipenem
128	20	15	5
64	11	17	10
32	8	2	9
16	5	6	11
8	6	13	9
4	7	2	8
2	1	4	5
1	1	-	2
Total	59	59	59

A partir desta tabela é possível observar que houve uma variação na efetividade dos antibióticos carbapenêmicos, bem como pode-se avaliar que o antibiótico imipenem, foi o carbapenêmico que apresentou menor número de cepas resistentes, podendo ser portanto, considerado o antibiótico mais potente neste estudo.

No teste de MIC, a maioria das cepas de *K. pneumoniae* foram resistentes frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem, com 98%, 93% e 87% de resistência, respectivamente, conforme pode ser avaliado na tabela 4.

Tabela 4. Resultado do MIC das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem.

Sensibilidade das amostras n (%)	Agentes Antimicrobianos		
	Ertapenem	Meropenem	Imipenem
Resistentes	58 (98%)	55 (93%)	51 (87%)
Intermediários	1 (2%)	4 (7%)	5 (9%)
Sensíveis	-	-	2 (4%)
Total	59	59	59

6.4 Avaliação da presença do gene *bla*_{KPC-2}

Cepas de *K. pneumoniae* que apresentaram perfil intermediário ou resistente a um dos carbapenêmicos foram submetidas a PCR utilizando *primers* específicos para o gene *bla*_{KPC-2}. Quarenta e nove cepas (83%), foram positivas na PCR, comprovando a presença do gene *bla*_{KPC-2} nestas cepas. A figura 2 representa o resultado do PCR de 15 cepas de *K. pneumoniae*.

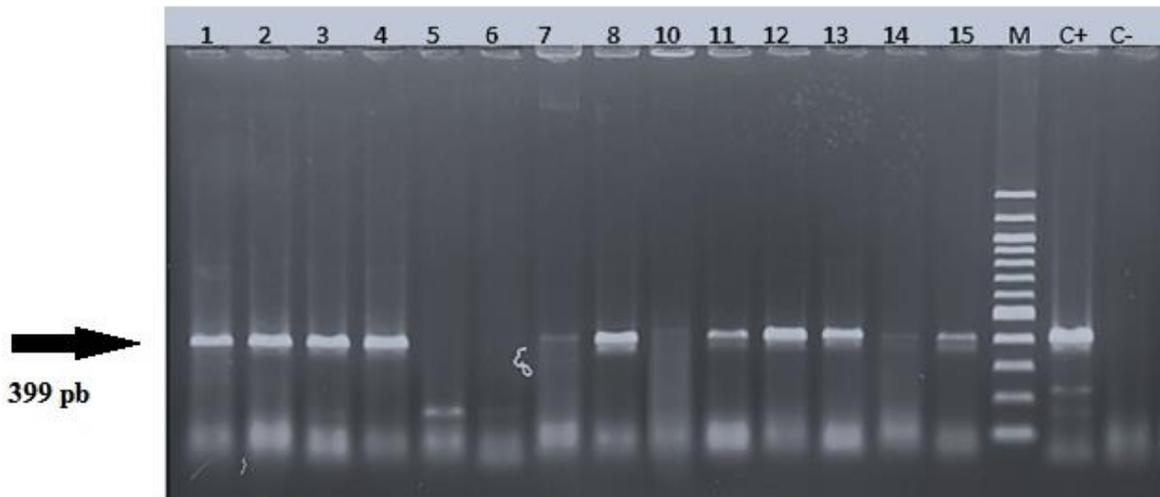


Figura 2. Gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do gene *bla*_{KPC-2} amplificado por PCR de cepas de *K. pneumoniae* carbapenemases. Coluna M: marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Sigma); Colunas de 1 a 15 cepas bacterianas testadas na PCR; Coluna C+, controle positivo da reação; Coluna C, controle negativo.

Os produtos amplificados apresentaram um tamanho de cerca de 399 pb.

Nas colunas identificadas como 5 e 6, é possível observar a presença de uma banda com um tamanho de cerca de 200 pb. No entanto, o perfil de amplificação obtido pelas cepas que apresentaram resultado positivo para o gene *bla*_{KPC-2} foi cerca de 399 pb. Porém, não podemos considerar estas bandas como consequência de reações inespecíficas, por estas bandas apresentarem um tamanho similar ao da banda presente no controle positivo da reação.

7 DISCUSSÃO

Este estudo propôs avaliar cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS. No período de 14 meses foram identificadas 59 (47%) cepas de *K. pneumoniae*, sendo que 49 (83%) foram identificadas como cepas produtoras de KPC.

A partir da análise dos registros laboratoriais, pode-se obter dados sobre a coleta das amostras, alas de isolamento, amostras clínicas e faixa etária dos pacientes. O objetivo desta avaliação foi conhecer o perfil dos pacientes internados no HU e que demonstraram quadros infecciosos decorrentes da presença de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase.

Com esta análise observou-se que a fonte de infecção mais comum foi a urocultura (42%), concordando com o estudo anterior de Dienstmann et al. (2010), o qual relatou que 40% das amostras isoladas foram provenientes de urocultura, bem como no estudo de Alves et al. (2013), o qual relatou que 44% das cepas de seu estudo foram isoladas de amostras de urocultura. A partir destes dados, pode-se observar um alto índice de infecções urinárias, provavelmente provocadas pelo uso de cateteres urinários.

A prevalência de *K. pneumoniae* foi maior em indivíduos com faixa etária acima dos 60 anos (56%), enquanto que no estudo de Alves et al. (2013), foi observado que 50% dos pacientes se encontravam na faixa etária de 51 a 71 anos. Provavelmente este índice foi maior em pacientes desta faixa etária devido à deficiência imunológica e a presença de outras enfermidades concomitantes apresentadas por estes pacientes.

Das 59 cepas de *K. pneumoniae* submetidas ao Teste Modificado de Hodge, 57 cepas foram positivas, indicando que 97% das cepas avaliadas neste estudo são possivelmente cepas produtoras de carbapenemases. Esse dado difere dos resultados apresentados por Dienstmann et al. (2010), o qual descreve que o fenótipo KPC não foi detectado em nenhuma das cepas testadas. No entanto, é importante salientar que o Teste Modificado de Hodge é um teste fenotípico com sensibilidade e especificidade de 90% e detecta carbapenemases em geral, não sendo específico para KPC (BARTH & RIBEIRO, 2012).

Avaliando os resultados obtidos no teste modificado de Hodge e PCR, observou-se que das duas cepas de *K. pneumoniae* que apresentaram resultado negativo no teste de Hodge, uma delas apresentou resultado positivo no PCR e a outra cepa confirmou o resultado negativo no PCR. A partir desses dados, é possível supor que esta cepa que apresentou um resultado negativo no teste de Hodge, mas positivo na PCR, pode ter sofrido alguma alteração, apresentando outros mecanismos de resistência.

Portanto, apesar da sua elevada sensibilidade e facilidade de execução, resultados inconsistentes podem existir no teste modificado de Hodge, os resultados podem ser ambíguos ou de difícil interpretação. Assim, enterobactérias produtoras de β -lactamases do tipo AmpC ou ESBL podem apresentar um resultado fracamente positivo no MHT e, conseqüentemente, fornecer resultados falso-positivos, bem como podem apresentar outros mecanismos de resistência (BARTH & RIBEIRO, 2012).

É importante salientar que o MHT é um teste fenotípico que se aplica à detecção de carbapenemase em geral, não sendo específico para KPC. Assim, um resultado positivo no MHT indica a necessidade de realização de técnicas moleculares para confirmação do gene KPC, como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Assim, é possível que uma padronização mais criteriosa para sua interpretação, em detrimento do resultado qualitativo, a fim de aumentar a sua especificidade, possa torná-lo uma ferramenta mais útil ao laboratório clínico na triagem de KPC. (BARTH & RIBEIRO, 2012).

Na determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos, realizada pela técnica de microdiluição em caldo, 98% das cepas avaliadas foram resistentes ao ertapenem, 87% para o imipenem e 93% ao meropenem. Esses resultados diferem dos apresentados por Soares (2012), que descreveu 50% de resistência ao meropenem e imipenem, e 62,5% ao ertapenem. Estes achados reforçam a ideia que o perfil de resistência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase difere de acordo com a complexidade do hospital, características dos pacientes, doenças subjacentes e frequência no uso de antibióticos em cada ambiente hospitalar (CHANG et al., 2013).

A partir da variação dos resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) para os antibióticos carbapenêmicos testados, pode-se observar que o antibiótico que expressou maior eficácia foi o imipenem.

Para determinar a presença de carbapenemase do tipo KPC, a técnica de PCR é a mais indicada, por ser altamente sensível, específica e rápida para determinar qual tipo de beta-lactamase está presente (COLE et al., 2009).

No nosso estudo, 83% das cepas avaliadas na PCR foram positivas para o gene *bla*_{KPC-2}, evidenciando a alta prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no HU/UFGD. Os resultados da amplificação do gene *bla*_{KPC-2} através de PCR, também foram evidenciados no estudo de Chang et al. (2013), que fez o primeiro relato de *K. pneumoniae* carreando o gene *bla*_{KPC-2} no estado do Mato Grosso do Sul.

As 10 cepas de *K. pneumoniae* (17%) com perfil de resistência aos carbapenêmicos e com resultado negativo na PCR, indicam que outros fatores de

resistência aos carbapenêmicos podem estar presentes nestas cepas. Já que as enterobactérias podem apresentar diversos mecanismos de resistência frente ao antibióticos carbapenêmicos. Modificação na permeabilidade da membrana, por perda ou modificações na estrutura dos canais de porina, aumento na regulação das bombas de efluxo, hiperexpressão de AmpC ou ESBL associados a produção de carbapenemases (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009) são citados na literatura.

Para comprovar estes achados, outros estudos serão conduzidos na busca da identificação de outras enzimas beta-lactamases como, IMP, NDM, GES, SME, OXA, bem como beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) e da classe C (AmpC). Além disso, o fato de poder ocorrer modificações nos canais de porinas podem provocar alterações na ação e penetração dos antibióticos (DIENSTTMAN, 2010), o que merece ser avaliado.

8 CONCLUSÃO

Estes resultados permitem concluir que existe um número elevado de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no HU/UFGD. No entanto, 17% das cepas de *K. pneumoniae* são possíveis produtoras de outras classes de carbapenemases e merecem futuros estudos. Este é o primeiro trabalho realizado no HU/UFGD e os resultados obtidos nesta pesquisa servirão de base para estudos futuros de epidemiologia molecular, buscando identificar os fatores de riscos associados à presença destas bactérias, contribuindo para traçar ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por micro-organismos multirresistentes de interesse clínico.

9 REFERÊNCIAS

ALVES, AP; BEHAR, PRP. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 3, p. 213-218, 2013.

AMBLER, RP; COULSON, AFW; FRERE JM, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal**, p. 269-270, 1991.

BARTH, AF; RIBEIRO, VB. Teste de Hodge modificado na detecção de KPC: um procedimento a ser aperfeiçoado ou esquecido? **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 1, p. 26, 2012.

BRADFORD, PA. Extend-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRATU, S; LANDMAN, D; ALAM, M; TOLENTINO, E; QUALE, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 776-778, 2005.

BURNS, K; MORRIS, D; MURCHAN, S; et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Irish critical care units: results of a pilot prevalence survey. **Journal of Hospital Infection**, v. 83, n. 1, p.71-73, 2011.

BUSH, K; JACOBY, GA. Update functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 3969-3976, 2010.

CAI, JC; ZHOU, HW; ZHANG R; CHEN, GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing {beta} - lactamase KPC-2 in intensive care units from a Chinese hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2014-2018, 2008.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CHANG, MR; BIBERG, CA; LOPES, FA; et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla_{KPC} gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 3, 2013.

CHOPRA, IAN; ROBERTS, M; Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 232-260, 2001.

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

COLE, JM; SCHUETZ, AN; HILL, CE; NOLTE, FS. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. **Journal Clinical Microbiology**, v. 47, p. 322-326, 2009.

CUZON, G; NAAS, T; TRUONG, H, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase bla_{KPC-2} gene 1. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 16, n. 9, 8 p., 2010.

DIENSTMANN, R; PICOLL, SU; MEYER, G; SCHENKEL, T; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

FALAGAS, ME; KARAGEORGOPOULOS, DE; NORDDMANN, P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. **Future Microbiology**, v.6; p. 653-666, 2011.

FERREIRA, WFC; SOUZA, JC. **Microbiologia**. Porto, Edição Lidel, volume 2, 2000.

GARCÍA, CS; GÁNDARA, MP; GARCÍA, FJC. Betalactamases de espectro extendido em enterobactérias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.28, n.1, p.12-18, 2010.

KITCHEL, B; RASHEED, JK; PATEL, JB, et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of Multilocus Sequence Type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 53, n. 8, 7 p., 2009.

KONEMAN, EW; ALLEN SD; JANDA, WM; SCHRECKENBERGER, PC; WINN JR, WCW. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed, Rio de Janeiro: editora Médica e Científica, 1465p, 2006.

LANDMAN, D; BABU, E; SHAH, N; et al. Transmission of carbapenem-resistant pathogens in New York City hospitals: progress and frustration. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 67, n. 6, p. 1427-1431, 2012.

LIVERMORE, DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 634-640, 2002.

MARTÍNEZ J, MARTÍNEZ L, ROSENBLUETH M, MARTINEZ R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **Internacional Microbiology**, v. 7, 261-268, 2004.

MENDES, RE; BELL, JM; TURNIDGE, JD; YANG, Q; YU, Y; SUN, Z; JONES, RN. Carbapenem resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detections of a conjugative plasmid (*bla*_{KPC-2} plus *qnrB4*) and a *bla*_{IMP-4} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 798-799, 2008.

MOHR, JF. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 41-51, 2008.

MONTEIRO, J; SANTOS, AF; ASENSI, MD; PEIRANO, G; GALES, AC. First report of KPC-2 *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

NAAS T; NORDMANN P; VEDEL, G; POYART, C; Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4423-4424, 2004.

NAAS, T; CUZON, G; VILLEGAS, V, et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, n. 52, p. 1257-1263, 2008.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 593-656, 2003.

NORDMANN, P; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negatives aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n.6, p. 321–331, 2002.

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.

NOYAL, MJC, MENEZES, GA, HARISH, BN, SUJATHA, S; PARIJA, SC. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative gram-negative bacteria. **Indian Journal Medical Research**, p. 707-712, 2009.

OLIVEIRA, R.; MARUYAMA, SAT. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 2, 2008.

OLIVEIRA, CF; FORNO, NLFD; ALVES, IA; HORTA, JÁ; RIEGER, A; ALVES, SH. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 556-560, 2009.

PATERSON, DL. Resistance in Gram-negative, bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal Medical**, v. 34, n. 5, p. 21-28. 2006.

PEIRANO, G; SEKI, LM; VAL PASSOS, VL; PINTO, MCFG; GUERRA, LR; ASENSI, MD. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 63, n 2, p. 265-258, 2009.

PELEG, A; HOOPER DC. Hospital-acquired infections due to Gram negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 33, n. 5, p. 258-267, 2005.

PESSOA-SILVA, CL; MOREIRA, BM, ALMEIDA, VC, et al. Extend-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. **Journal Hospital Infections**, p.198-206, 2003.

PITOUT, JDD. The latest threat in the war on antimicrobial resistance. **Lancet Infectious Diseases**, p. 578-579, 2010

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

QUEENAN, AM, BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. **Journal Clinical Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

SADER, H. S. Antimicrobial resistance in Brazil: Comparison of results from two studies. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 91- 99, 2000.

SIEGEL, JD; RHINEHART, E; JACKSON, M; CHIARELLO, L. **Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infections agents in healthcare settings**. United States, 2007.

SINGH, A; GOERING RV; SIMJEE, S; et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SOARES, VM. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251-253, 2012.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. **Atheneu**, 3ª ed., p. 79, 2001.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR.; CASE, CL. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VINCENT, JL. Nosocomial infections in adult intensive care units. **The Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068-2077, 2009.

WILLIAMS, JD. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal Antimicrobial Agents**, p. 3-7, 1999.

WOODFORD, N; TIERNO, PM; YOUNG, K, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4793-99, 2004.

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.

10. ANEXO

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS/UF GD-MS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Epidemiologia Molecular de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemase Isoladas em um Hospital de Ensino de Dourados-MS.		
Pesquisador: Simone Simionatto		
Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.		
Versão: 2		
CAAE: 05666812.3.0000.5160		
Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIV. FEDERAL DA GRANDE DOURADOS HOSPITAL		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 130.754		
Data da Relatoria: 09/10/2012		
Apresentação do Projeto:		
<p>O presente projeto propõe realizar um estudo de epidemiologia molecular de cepas de Enterobactérias produtoras de KPC isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário HU) da Universidade Federal da Grande Dourados (UF GD). Os resultados obtidos com as técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico e estudo de doenças infecciosas de origem hospitalar serão associados com a prevalência dos agentes envolvidos nestas enfermidades. Através da revisão de prontuários de pacientes internados no hospital será possível identificar os fatores de riscos associados à infecção ou colonização por micro-organismos multirresistentes de interesse clínico. Também serão realizadas investigações sobre a relação entre a gravidade dos pacientes e a aquisição dos isolados resistentes, a influência do tempo de exposição ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes infecciosos. Acredita-se que estes estudos possam contribuir para traçar medidas de contenção adequadas bem como para evitar futuros surtos de infecção dentro do ambiente hospitalar, contribuindo desta forma com ações de vigilância em saúde e consequentemente reduzindo os gastos do Sistema Único de Saúde com internações provenientes destes problemas.</p>		
Objetivo da Pesquisa:		
Estudar a ocorrência de Enterobactérias produtoras de carbapenemase (KPC) isoladas de pacientes		
Endereço: Rua João Rosa Góes, 1761		
Bairro: Vila Progresso		CEP: 79.825-070
UF: MS	Município: DOURADOS	
Telefone: (67)3410-2328	Fax: (67)3411-3637	E-mail: cep@ufgd.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UFMS



atendidos no Hospital Universitário de Dourados, visando identificar os fatores de riscos associados a aquisição de infecções causadas por estas bactérias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos benefícios parece ser uma proposta que possibilitará auxiliar ações de vigilância em saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante e os resultados da pesquisa podem contribuir com ações de vigilância em saúde no HU.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicitou dispensa do TCLE, justificando que os dados serão coletados por funcionários do HU, não havendo contato com os pacientes. Além disto, cita também a dificuldade de localizar os pacientes triados para a pesquisa.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Aprovado.

DOURADOS, 25 de Outubro de 2012

Assinador por:

Rosilda Mara Mussury Franco Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua João Rosa Góes, 1761

Bairro: Vila Progresso

CEP: 79.825-070

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2328

Fax: (67)3411-3637

E-mail: cep@ufgd.edu.br