

DISSEMINAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE KPC EM HOSPITAL PÚBLICO DO NOROESTE DO PARANÁ/ BRASIL

Leonardo Mochiutti Girardi (PIBIC/CNPq), Clariana Akemi Kariya Leite (CCS/DAB/UEM), Paula Assis Queiroz (CCS/DAB/UEM), Katiany Caleffi-Ferracioli (CCS/DAB/UEM), Rosilene Fressatti Cardoso (CCS/DAB/UEM), Claudia Terencio Agostinho Pires (CCS/DAB/UEM) Vera Lucia Dias Siqueira (Orientador), e-mail: vldsiqueira@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá /Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas - 2.00.00.00-6

Subárea: Microbiologia Médica - 2.12.02.01-0

Palavras-chave: Resistência Bacteriana, *Klebsiella pneumoniae*, KPC

Resumo

A resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* no Brasil, inclusive na região Sul tem sido uma preocupação emergente. O objetivo deste estudo foi realizar a detecção de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em pacientes internados, bem como analisar o padrão de disseminação desses isolados no Hospital Municipal de Maringá entre janeiro de 2014 e junho de 2015. Foram detectados neste estudo 33 isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, sendo 17 positivos para o gene *bla_{KPC}*, o que corresponde a 51% das amostras analisadas neste estudo. Detectamos uma distribuição policlonal das amostras, classificadas em 5 *clusters* distintos. Entre isolados produtores de KPC, 64,7% foram classificados no mesmo *cluster*, achado que reforça a necessidade de medidas de controle para evitar a disseminação clonal de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no hospital estudado, a qual pode ter causas iatrogênicas e está relacionada com o manejo de pacientes e com o ambiente hospitalar.

Introdução

Nos últimos 10 anos, houve um aumento progressivo de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC) em todo o mundo, particularmente de espécies produtoras de carbapenemases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e New Delli Metallo- β -lactamases (NDM), que do ponto de vista epidemiológico são de extrema relevância e apresentaram rápida e ampla disseminação mundial (NORDMANN *et. al.* 2014). A detecção de isolados produtores de carbapenemases e o conhecimento da epidemiologia local e perfil de sensibilidade das bactérias isoladas em cada

instituição de saúde é essencial para que se estabeleçam medidas de contenção e tratamento adequadas.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar a detecção de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases em pacientes internados, bem como analisar a distribuição e padrão de disseminação desses isolados no Hospital Municipal de Maringá (HMM) no período de janeiro de 2014 a junho de 2015.

Materiais e métodos

Isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes sítios de infecção ou culturas de vigilância de pacientes internados no HMM no período de janeiro de 2014 a junho de 2015, que foram resistentes a pelo menos um carbapenêmico (ertapenem, imipenem, meropenem) no teste automatizado (Phoenix BD) foram selecionados para o estudo. A resistência foi confirmada por testes de sensibilidade pelo método de disco-difusão, conforme recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2016). A concentração inibitória mínima (CIM) de alguns isolados foi confirmada por Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia).

Com relação à detecção fenotípica de carbapenemases, o Teste de Hodge Modificado (THM) foi realizado conforme metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) e o teste com inibidores enzimáticos - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido fenilborônico (AFB) e cloxacilina (CLOXA) - segundo critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em Nota técnica nº1/2013 (ANVISA, 2013).

O estudo da diversidade genética dos isolados foi realizado empregando-se a técnica *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – Reação em cadeia da polimerase (ERIC-PCR) segundo Versalovic (1991). Isolados com similaridade igual ou superior a 90% foram considerados pertencentes ao mesmo *cluster*.

O teste molecular para a detecção do gene *bla_{KPC}* foi realizado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito por Poirel *et al.* (2011).

Resultados e Discussão

Neste estudo foram detectados 33 isolados resistentes a pelo menos um carbapenêmico testado, provenientes de culturas de vigilância e de diferentes sítios de infecção.

Os resultados dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos para os 33 isolados foram: 30 amostras resistentes e 3 intermediárias a ertapenem; 17 amostras resistentes e 16 sensíveis a imipenem; e 16 amostras resistentes, 4 intermediárias e 13 sensíveis a meropenem (Figura 1).

Quanto à detecção fenotípica de carbapenemases, 17 isolados foram positivos no teste de bloqueio enzimático com AFB. O AFB mostrou-se uma ferramenta

com alto potencial de detecção de isolados produtores de carbapenemase do tipo KPC. Todos os isolados foram negativos para o teste com EDTA e CLOXA. O Teste de Hodge Modificado foi positivo para 17 amostras e inconclusivo para um isolado não produtor de carbapenemase.

Em relação à detecção molecular do gene *bla_{KPC}*, 17 isolados foram positivos, representando 51% das amostras incluídas neste estudo.

Sendo assim, todos os isolados produtores de KPC foram corretamente identificados através dos testes fenotípicos (THM e bloqueio enzimático com AFB), com sensibilidade igual a 100%, em relação à detecção molecular pela amplificação do gene *bla_{KPC}*.

Do total de 33 amostras de *K. pneumoniae*, foram detectados 5 clusters distintos e 7 isolados órfãos (Figura 1).

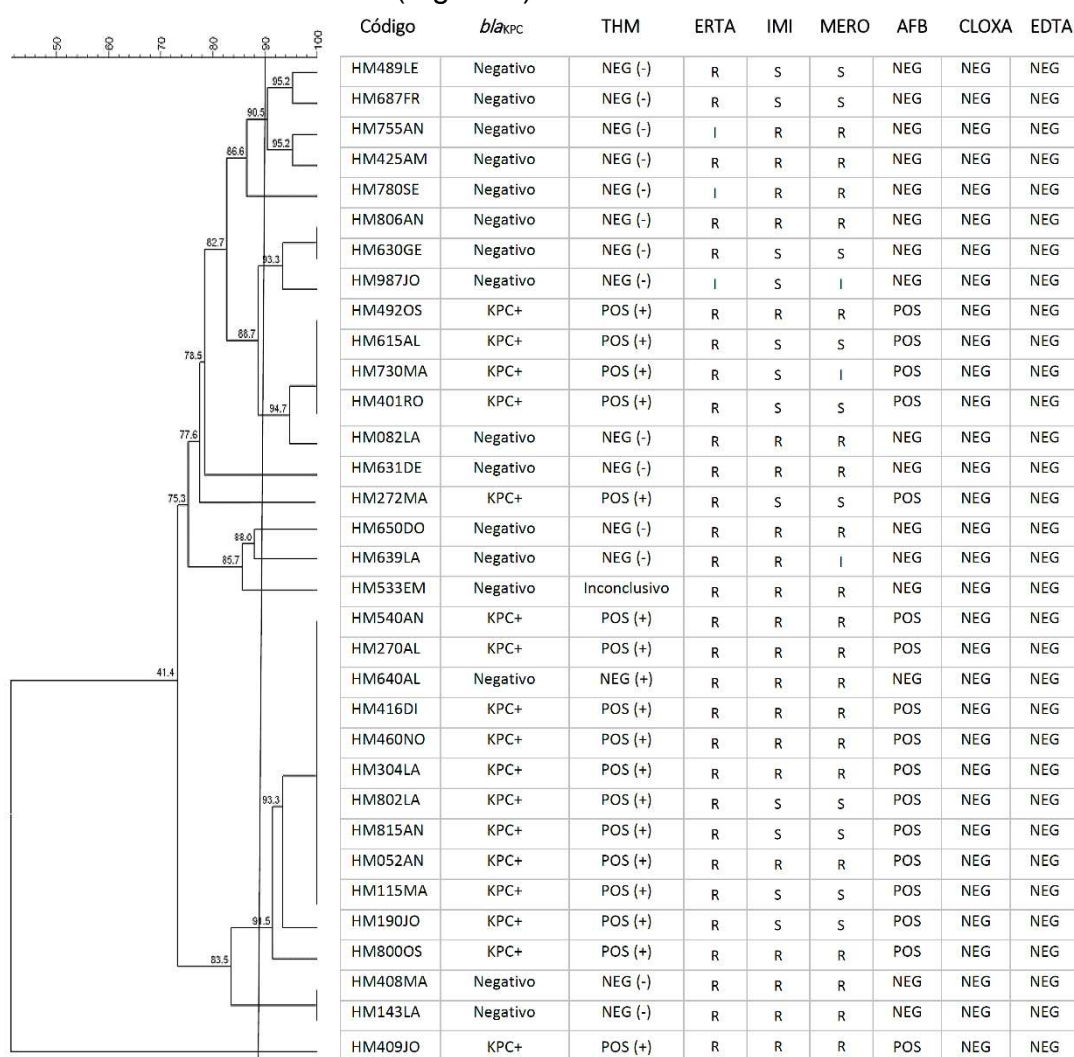


Figura 1 – Relação genética, perfil de sensibilidade a carbapenêmicos e resultado dos testes com inibidores enzimáticos de 33 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de um hospital público do Noroeste do Paraná. Dendrograma obtido por “*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*” – *Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR). A linha do dendrograma denota o limiar de 90% de homologia para definição de grupos de similaridade genética.

Abreviações: NEG: Negativo; POS: Positivo; THM: Teste de Hodge Modificado; CIM: concentração inibitória mínima. R: resistente. S: sensível. I: intermediário.

Foi possível a identificação de populações clonais e não-clonais entre isolados positivos para o gene *bla*_{KPC}, porém, dos 17 isolados positivos para KPC, 64,7% (n=11) foram classificados no mesmo *cluster* (Figura 1). A presença de populações clonais entre isolados produtores de carbapenemases alerta para uma possível disseminação clonal intra-hospitalar desses isolados.

Conclusões

Em nosso estudo encontramos um percentual alarmante de *K. pneumoniae* produtoras de KPC entre os isolados do Hospital estudado. Esses resultados reforçam a necessidade de medidas de controle para evitar a disseminação clonal de *K. pneumoniae* intra e inter-hospitalar, que pode ocorrer principalmente por pacientes colonizados que contribuem para esta disseminação e por profissionais de saúde, uma vez que espécies da família *Enterobacteriaceae* podem sobreviver durante várias horas nas mãos de funcionários do hospital e por até vários meses em superfícies inanimadas.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Pesquisa de Iniciação científica;
Aos colaboradores do Laboratório de Bacteriologia Médica.

Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Nota técnica nº 01, de 17 de abril de 2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes [portaria na internet]. *Diário Oficial da União*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>. Nota técnica 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-sixth Informational Supplement: Document M100-S**. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne; 2016.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*, v. 20, n. 9, p. 821-30, Sep 2014. ISSN 1198-743x.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 70, n. 1, p. 119-23, May 2011.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, v. 19, n. 24, p. 6823-31, Dec 25 1991.