

Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar

Primeira submissão em 18/08/09
Última submissão em 04/01/10
Aceito para publicação em 18/01/10
Publicado em 20/02/10

Phenotypic research on Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) enzyme in Enterobacteriaceae from hospitals

Rosabel Dienstmann¹; Simone Ulrich Picoli²; Gabriela Meyer³; Tiago Schenkel⁴; Juçara Steyer⁵

unitermos	resumo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	<p>Introdução e objetivo: A resistência bacteriana é problema frequente e importante no ambiente nosocomial. Nesse contexto, várias bactérias apresentam habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos, destacando-se as <i>Enterobacteriaceae</i>. Nesta família de microrganismos, a produção de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC) é um mecanismo emergente, o que justifica sua vigilância constante. Material e método: Este trabalho pesquisou o fenótipo de KPC em 30 isolados clínicos de enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração e sensibilidade diminuída a carbapenem oriundas de dois hospitais (em Porto Alegre e na Grande Porto Alegre, RS). Realizou-se discodifusão com imipenem, meropenem e ertapenem, e 14 cepas com halo ≤ 22 mm para o último antimicrobiano foram submetidas ao teste de Hodge modificado. Resultados: Nenhuma amostra apresentou carbapenemase (Hodge negativo). Discussão: Apesar de não ter sido detectada carbapenemase, a resistência aos carbapenems possivelmente pode ser atribuída à presença de betalactamases cromossômicas (AmpC) e/ou de amplo espectro (ESBL) associada à alteração de permeabilidade nos canais de porina. Conclusão: Considerando o caráter emergente da KPC, torna-se importante seu rastreamento em isolados de enterobactérias com sensibilidade diminuída ao ertapenem.</p>
Betalactamase	
Resistência bacteriana a antimicrobianos	
Infecção hospitalar	

abstract

Introduction and objective: Bacterial resistance is a frequent and important problem in the nosocomial environment. In this context, several bacteria have the ability to develop mechanisms of enzymatic resistance, mainly *Enterobacteriaceae*. In this family of microorganisms, the production of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) is an emerging mechanism, which should be under constant observation. **Material and method:** This study investigated the phenotype of KPC in 30 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* resistant to third generation cephalosporin and carbapenem from two hospitals (Porto Alegre city and Porto Alegre, RS). It was performed disk diffusion method with imipenem, meropenem and ertapenem. Additionally, 14 strains with halo ≤ 22 mm for the last antimicrobial agent underwent modified Hodge test. **Results:** No sample showed carbapenemase (Hodge negative). **Discussion:** Despite the fact there was no carbapenemase, resistance to carbapenems is possibly attributed to the presence of beta-lactamases AmpC and/or ESBL associated with changes in the permeability of porin channels. **Conclusion:** Given the emerging nature of KPC, it is important to trace it in *Enterobacteriaceae* isolates with decreased susceptibility to ertapenem.

key words

Klebsiella pneumoniae carbapenemase
Beta-lactamase
Bacterial resistance to antibiotics
Nosocomial infection

1. Biomédica.

2. Mestra em Microbiologia; professora adjunta da Federação de Estabelecimento de Ensino Superior em Novo Hamburgo (FEEVALE).

3. Acadêmica de Biomedicina da FEEVALE.

4. Especialista em Análises Clínicas; biomédico; diretor do Laboratório Vitale, Tramandaí (RS).

5. Farmacêutica-bioquímica; responsável pelo Laboratório de Microbiologia HPS.

Introdução

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é uma enzima produzida por bactérias Gram-negativas (enterobactérias), e sua detecção em isolado bacteriano confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos^(14,15). É importante salientar que os carbapenens compreendem uma classe amplamente utilizada no tratamento de infecções envolvendo *Enterobacteriaceae* multirresistente⁽³⁾.

Vários são os mecanismos de resistência que podem impedir a ação dos carbapenens, e a resistência surge, ocasionalmente, da combinação de impermeabilidade da membrana com betalactamases cromossômicas (AmpC) ou de amplo espectro (ESBL)⁽⁹⁾.

As carbapenemases pertencem às classes moleculares de Ambler, denominadas A, B e D. As do grupo A incluem membros designados SME, IMI, NMC, GES e a família das KPCs. Destes, as KPCs são as mais prevalentes encontradas em plasmídeos de *Klebsiella pneumoniae*⁽¹³⁾.

A enzima KPC já foi documentada em diferentes bactérias por meio de estudos moleculares e diferenciada em KPC-1 a 4⁽¹⁰⁾, com a seguinte descrição: KPC-1 em isolados de *Klebsiella pneumoniae*; KPC-2 em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter* sp.; KPC-3 em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. Para KPC-4, não foram encontrados microrganismos relacionados⁽⁶⁾.

Atualmente, KPC constitui importante mecanismo de resistência no contexto hospitalar mundial. Sua pesquisa é relevante a fim de limitar sua disseminação, contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas, em que é imprescindível a vigilância microbiológica, juntamente com ação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

As metodologias usadas para rastreamento de KPC são diversificadas: focalização isoeletrica, discodifusão, E-test⁽²⁾ e teste de Hodge modificado⁽¹⁾. Pode-se ainda pesquisar o gene *bla*_{KPC} por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou ribotipagem. Já foi dito que sistemas de automação usados para teste de suscetibilidade podem não identificar com precisão os isolados KPC positivos⁽²⁾.

Assim, a triagem fenotípica se dá preferencialmente por meio de antibiograma com discos de cefalosporinas subclasse III (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona) e imipenem (IPM), meropenem (MEM) e ertapenem (ETP)⁽³⁾, além do teste de Hodge modificado^(1, 8).

Objetivo

Diante do exposto, o objetivo deste artigo foi pesquisar fenotipicamente a enzima KPC em isolados bacterianos oriundos de hospitais de Porto Alegre e da Grande Porto Alegre.

Material e método

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da prefeitura de Porto Alegre sob o registro 001.025791.08.7.

Entre agosto e novembro de 2008 foram obtidos 30 isolados nosocomiais de enterobactérias (*Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*) com resistência a alguma cefalosporina de terceira geração (ceftazidima, ceftriaxona ou cefotaxima) e a carbapenem (imipenem, meropenem ou ertapenem)⁽³⁾. Os isolados foram provenientes de um hospital de Porto Alegre e outro da Grande Porto Alegre.

O crescimento bacteriano (isolamento primário) característico foi repicado em ágar McConkey, incubado a 35°C por 24 horas e estocado a -20°C em caldo glicerinado até a obtenção de todas as amostras.

Para pesquisa fenotípica de KPC, as bactérias foram descongeladas e submetidas a crescimento em ágar sangue de carneiro e subsequente repique. Com o segundo crescimento foram executadas duas metodologias: discodifusão com carbapenens e teste de Hodge modificado⁽¹⁾. O disco empregado no referido teste é o ertapenem, pois há relatos de que a sensibilidade e a especificidade para KPC são maiores no emprego deste (90% a 100% e 81% a 93%, respectivamente) em relação aos demais carbapenens⁽⁷⁾.

É necessário destacar que, na ocasião deste estudo (2008), o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ainda não apresentava considerações sobre KPC. Para interpretação da sensibilidade aos antimicrobianos empregaram-se diâmetros de halos para carbapenens indicados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como sugestivos de KPC (ertapenem e meropenem ≤ 22 mm). Em isolados com este perfil foi aplicado o teste de Hodge modificado. Os pontos de corte dos carbapenens recomendados pelo CLSI (2008) não foram utilizados, uma vez que existem cepas KPC positivas com baixo nível de resistência a esses fármacos⁽¹⁴⁾.

Para fins de controle de qualidade foram realizados testes com cepa de *Klebsiella pneumoniae* KPC positiva

cedida pelo Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-USP).

Os resultados encontrados foram avaliados por análise de frequência (**Tabela**).

Resultados

Do hospital de Porto Alegre foram provenientes 22 (73,3%) cepas e do hospital da Grande Porto Alegre, oito (26,7%), num total de 30 amostras. As mesmas foram isoladas de urina, escarro, secreção pleural, ponta de cateter, aspirado traqueal e hemocultura, sendo mais prevalente em urina (40%).

Entre as 30 cepas analisadas, 21 (70%) eram *Klebsiella pneumoniae*, quatro (13,3%) *Enterobacter* sp., três (10%) *Klebsiella ozaenae*, uma (3,33%) *Escherichia coli* e uma (3,33%) *Klebsiella oxytoca*.

O fenótipo de KPC não foi detectado em nenhuma das 30 (100%) amostras testadas.

Discussão

As amostras foram submetidas ao teste de Hodge modificado, à discodifusão com carbapenens e à análise

de diâmetros de halos sugestivos para KPC segundo critérios estabelecidos pelo CDC (2008). Segundo este órgão, suspeita-se da enzima se halos de ertapenem ou meropenem se apresentarem ≤ 22 mm. Optou-se pelos critérios do CDC devido à maior amplitude dos pontos de corte para sugestão de KPC, uma vez que existem cepas com baixo nível de resistência a esses antimicrobianos⁽¹⁴⁾. Exemplificando, cepa de *Klebsiella* sp. com halo de 22 mm para ertapenem seria classificada como sensível, segundo o CLSI, mas possível KPC mediante o CDC. Isso permite maior chance na detecção da enzima e interpretação mais cuidadosa de resultados.

Segundo o CDC (2008), o ertapenem apresenta melhores sensibilidade (90%-100%) e especificidade (81%-93%) para a enzima em questão, seguido de meropenem, com 48%-94% e 96%-100%, respectivamente. O disco de imipenem, um dos mais empregados rotineiramente nos laboratórios de microbiologia, apresenta menores sensibilidade (42%-94%) e especificidade (28%-93%), sendo o menos recomendado⁽⁷⁾.

Outra razão para empregar ertapenem é o fato de ele não apresentar “efeito inóculo”⁽⁴⁾. Com imipenem e meropenem esse efeito se apresenta bastante pronunciado, podendo causar somente redução da sensibilidade, e não verdadeira resistência. Das 30 amostras avaliadas no estudo verificou-se que 28 (93,3%) apresentaram menor halo para ertapenem do que para imipenem e meropenem.

Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 14 enterobactérias suspeitas de apresentarem KPC

Tabela

Identificação da bactéria	CAZ/CTX (CLSI)	IPM (CLSI)	MER ≤ 22 mm	ETP ≤ 22 mm
1. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
2. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
3. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
4. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
5. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
6. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
7. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
8. <i>Klebsiella</i> sp.	S/R	S	Não	Sim
9. <i>Klebsiella</i> sp.	R/R	S	Sim	Sim
10. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
11. <i>Enterobacter</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
12. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Não	Sim
13. <i>E. coli</i>	R/R	S	Sim	Sim
14. <i>Klebsiella</i> sp.	I/R	S	Sim	Sim

CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; MER: meropenem; ETP: ertapenem; S: sensível; I: intermediário; R: resistente; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Caso o disco de ertapenem não fosse empregado, 27 (90%) amostras seriam consideradas sensíveis a imipenem e meropenem e apenas três (10%), resistentes aos mesmos. Assim, não haveria razão para dar continuidade à pesquisa de KPC (teste de Hodge) nas 27 amostras. Por outro lado, mediante este antimicrobiano, 14 (51,8%) das 27 amostras foram suspeitas de conter KPC (Tabela).

Assim, executou-se o teste de Hodge modificado nas 14 amostras referidas. O resultado foi negativo para todas as cepas testadas, eliminando a possibilidade da presença fenotípica de carbapenemase. Porém, o número de amostras testadas de ambos os hospitais pode não ter sido satisfatório para a detecção desse mecanismo de resistência emergente, visto que até o momento se conhecem raros relatos de KPC no Brasil oficialmente descritos⁽¹⁰⁾. Em contrapartida, nos Estados Unidos a enzima já se tornou endêmica⁽³⁻⁵⁾. Em pesquisa realizada por Bratu *et al.* (2005) em dois hospitais de Nova York, foram testadas 602 amostras e 45% apresentaram algum mecanismo de resistência, sendo apenas 3,3% (44) confirmadas por biologia molecular como KPC-2. Outro aspecto importante reportado no trabalho foi que vários isolados se apresentaram sensíveis ao imipenem⁽⁵⁾. De modo semelhante, em Israel, entre 2004 e 2006, foram estudadas 4.149 cepas resistentes a carbapenens e, delas, apenas 51 (1,3%) foram identificadas como KPC positiva. Evolutivamente, em 2004-2005, a enzima foi encontrada em somente seis isolados, e as demais (45), em 2006, denotando crescente aumento da KPC. A proporção anual desse mecanismo de resistência foi de 0,4%, 0,7% e 3,1% nos três anos de estudo, respectivamente⁽¹¹⁾.

A resistência aos carbapenens verificada no presente estudo possivelmente pode ser atribuída à presença de outros mecanismos como AmpC e/ou ESBL associados à alteração nos canais de porina, que modificam a ação e a penetração dos fármacos⁽⁹⁾. Dessa forma, podem ocorrer resistência a antimicrobianos de maior espectro e sensibilidade aos de menor espectro de ação, ou seja, resistentes a carbapenens e sensíveis a cefalosporinas de terceira e/ou quarta gera-

ção⁽¹³⁾. Por fim, a diminuição de sensibilidade também pode ocorrer por associação de outras carbapenemases, como a metalobetalactamase (MBL), que hidrolisam todos os betalactâmicos, com exceção do aztreonam (*in vitro*)⁽¹²⁾.

Além do número restrito de amostras avaliadas, outra limitação do estudo foi a não confirmação de mecanismos de resistência (ESBL, AmpC, MBL) por testes, como disco-combinado para ESBL, ácido borônico para AmpC plasmidial e pesquisa de metaloenzima com agentes quelantes. Tais técnicas associadas a estudos em nível molecular permitiriam melhor compreensão dos resultados encontrados.

A partir de 2009 o CLSI passou a recomendar a pesquisa da enzima KPC em isolados de enterobactérias com resistência a cefalosporinas da subclasse III (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima e ceftriaxona) e sensibilidade diminuída a carbapenens (ETP 19-21 mm; MEM 16-21 mm; IPM: é fraco preditor de carbapenemase). Nessa situação, a padronização estabelece a confirmação de carbapenemase por meio do teste de Hodge modificado⁽⁸⁾ empregado na presente pesquisa.

Assim, fica sinalizada a importância de se estabelecer uma rotina para a pesquisa de KPC em isolados de *Enterobacteriaceae* com sensibilidade reduzida às cefalosporinas de amplo espectro, posto que têm maior potencial de apresentar essa nova carbapenemase.

Conclusão

Sugere-se a vigilância para o mecanismo de resistência emergente no Brasil (KPC). Sua triagem é conduzida adequadamente com emprego de discos de cefalosporinas subclasse III e de carbapenens no antibiograma. Diante de sensibilidade diminuída, é recomendado o teste de Hodge modificado, que apresenta sensibilidade e especificidade para confirmação de carbapenemases.

Referências

1. ANDERSON, K. F. *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 8, p. 2723-5, 2007.
2. BRADFORD, P. A. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*, v. 39, n. 1, p. 55-60, 2004.
3. BRATU, S. *et al.* Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 2, p. 776-8, 2005.
4. BRATU, S. *et al.* Emergence of KPC-possessing *Klebsiella*

- pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 7, p. 3018-20, 2005.
5. BRATU, S. *et al.* Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med*, v. 165, p. 1430-5, 2005.
 6. CAI, J. C. *et al.* 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008.
 7. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/maso/FACM/pdfs/HICPAC/20080612-13_HICPAC_Minutes.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2008.
 8. CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Table: M100 - S19; 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, PA 19087-1898 USA, 2009.
 9. MARTINEZ-MARTINEZ L. *et al.* Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 7, p. 1669-73, 1999.
 10. MONTEIRO J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.
 11. NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, n. 9, p.3098-101, 2006.
 12. QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, v. 20, n. 3, p. 440-58, 2007.
 13. ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 2005.
 14. SMITH MOLAND, E. *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, n. 3, p. 711-4, 2003.
 15. YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.

Endereço para correspondência

Simone Ulrich Picoli
Centro Universitário FEEVALE – Instituto de Ciências da
Saúde – Laboratório de Biomedicina
RS 239, nº 2.755
CEP: 93352-000 – Novo Hamburgo-RS
e-mail: simonepi@terra.com.br