

## ARTIGO ORIGINAL

## Avaliação da suscetibilidade da *Klebsiellapneumoniae* aos beta-lactâmicos

### Assessment of the susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to beta-lactams

Isabelle Carvalho Coelho,<sup>1</sup> Francisco Laurindo da Silva,<sup>1</sup> Maria do Rosário Conceição Moura Nunes,<sup>1</sup> Liliana Silva Lopes,<sup>1</sup> Leandro Pessoa Carneiro,<sup>1</sup> Pedro Henrique Piaulino Benvindo Ferreira.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Integral e Diferencial-FACID Devry, Teresina, PI, Brasil.

Recebido em: 19/12/2014

Aceito em: 03/07/2015

[flspb@yahoo.com.br](mailto:flspb@yahoo.com.br)

## RESUMO

**Justificativa e Objetivos:** A *Klebsiellapneumoniae* é um bacilo Gram negativo causador de infecções relacionadas à assistência à saúde. Nos últimos anos, tem se tornando um microrganismo multirresistente, em virtude da produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido e carbapenemases. O estudo teve como objetivos avaliar o perfil de suscetibilidade da *K. pneumoniae* em relação a carbapenêmicos; identificar produção de carbapenemases e determinar o perfil de suscetibilidade das cepas bacterianas em relação a outros β-lactâmicos. **Métodos:** Pesquisa com caráter experimental com abordagem quanti-qualitativa. Utilizou-se 27 isolados, oriundos de diferentes espécimes clínicos de pacientes com vários tipos de infecção. Os testes de suscetibilidade aos beta-lactâmicos foram realizados pelo método de disco-difusão, seguindo o parâmetro de Kirby-Bauer. Nos testes de suscetibilidade foram utilizados discos de antibióticos, amoxicilina-clavulanato, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem e ertapenem. Para a detecção de carbapenemase, mediante a utilização do teste de Hodge modificado foram utilizados os antibióticos meropenem, e ertapenem. **Resultados:** Entre as cepas de *K. pneumoniae*, utilizadas na pesquisa, 59,3% apresentaram suscetibilidade e 40,7% foram resistentes aos beta-lactâmicos, pertencentes ao grupo carbapenêmicos. Não foram identificadas cepas produtoras de carbapenemases. 18,5% das cepas de *K. pneumoniae* foram identificadas como produtoras de β-lactamase de espectro estendido. **Conclusão:** Com base nos resultados obtidos, a resistência que 18,5% das cepas de *K. pneumoniae* apresentaram em relação aos β-lactâmicos foi em função da produção de β-lactamases de espectro estendido, haja visto, que o teste de identificação para essas enzimas foi realizado. Sugere-se mais pesquisas na identificação de cepas produtoras de carbapenemases, dado a grande ocorrência desses microrganismos em isolados clínicos de pacientes com infecção.

## DESCRITORES

*Klebsiella pneumoniae*  
Susceptibilidade  
Beta-lactâmicos

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** *Klebsiella pneumoniae* is a Gram negative bacilli causing infections related to health care. In recent years, it has become a multiresistente microorganism, because of the production spectrum beta-lactamase enzymes extended and carbapenemases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the susceptibility profile of *K. pneumoniae* in relation to carbapenems; identifying carbapenemase production and to determine the susceptibility profile of the isolates compared to other β-lactams. **Methods:** This is research on an experimental basis with quantitative and qualitative approach, which used 27 isolates from different clinical specimens of patients with infection, assigned by reference laboratories. Prior to susceptibility testing, the samples were re-isolated on MacConkey Agar culture medium and the plates were incubated with seeds at 37° C for 24 hours. Susceptibility testing to carbapenems and other beta-lactams were performed according to the method of Kirby-Bauer. The antibiotic disks used in the tests were amoxicillin-clavulanate, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem and ertapenem. The test for the detection of the enzyme carbapenemase was performed by the use of antibiotics: meropenem, and ertapenem, by Modified Hodge test. **Results:** All isolates were susceptible to beta-lactam group of carbapenems and no production of carbapenemases, but 18.5% produced extend-spectrum beta-lactamase extended-spectrum and 40.7% of the strains were resistant to other beta-lactams. **Conclusion:** The production of beta-lactamase extended spectrum was one of the main factors involved in resistance to antibiotics tested, but other resistance mechanisms were not identified possibly involved.

## KEYWORDS

*Klebsiellapneumoniae*  
Disease Susceptibility  
Beta-lactams

## INTRODUÇÃO

*Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram negativo causador de infecções relacionadas à assistência à saúde e, na maioria dos casos, provoca um aumento na morbimortalidade do indivíduo. Está presente no microbioma normal do intestino do homem, podendo sobreviver por muito tempo sob superfícies em ambientes hospitalares.<sup>1</sup>

Vários são os mecanismos de resistência às drogas, dentre eles se destacam: a produção de enzimas beta-lactamases tipo AmpC, Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases, como a metalo-beta-lactamase e carbapenemases tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que inativa várias drogas. Outros mecanismos de defesa são a redução da expressão de porinas na membrana externa; bombas de efluxo que diminuem a concentração intracelular dos fármacos e mutações nos sítios ativos de ligação dos antibióticos.<sup>2</sup>

Esses mecanismos de resistência são de fácil disseminação entre as bactérias, pois as mesmas possuem em sua constituição estruturas responsáveis por transmitir às demais bactérias as modificações que adquirem contra as drogas. Assim, os plasmídeos, por exemplo,

estruturas extracromossomais, que funcionam como vetores de genes de resistência a antimicrobianos. Além desse mecanismo natural, quando as células bacterianas são expostas a drogas de forma inadequada e/ou são utilizadas subdoses de antimicrobianos, as cepas susceptíveis morrem e as resistentes sobrevivem, ou seja, ocorrendo a pressão seletiva.<sup>3,4</sup>

Com relação ao surgimento de beta-lactamases do tipo KPC, é preocupante e agravante a sua disseminação em várias partes do mundo, tendo em vista que vários antibióticos são inúteis para o uso nos organismos multirresistentes. Medicamentos da classe dos carbapenêmicos, como imipenem, meropenem e ertapenem, estão aos poucos ficando ineficazes.

O conhecimento da presença e epidemiologia de bactérias resistentes a carbapenêmicos, bem como a estrutura e os seus mecanismos de resistência, é de fundamental importância para a adoção de medidas de prevenção e controle de infecções nos hospitais, para, assim, reduzir a proliferação de microrganismos multirresistentes como a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases.<sup>5</sup>

A mudança no padrão de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos vem diminuindo, e microrganismos multirresistentes estão surgindo em função da produção de enzimas inativantes de antibióticos, principalmente, devido ao uso descontrolado de antimicrobianos. Pesquisa realizada no ano de 2009 em Teresina-PI detectou um surto de *K. pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro expandido em unidade de terapia intensiva neonatal. E dois anos após, estudo realizado na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital de urgência de Teresina-PI, a maioria das espécies bacterianas isoladas eram *Klebsiella* sp., e algumas apresentavam produção de ESBL.<sup>6,7</sup>

Levando-se em conta esse aspecto, surgiu o interesse em pesquisar a *K. pneumoniae*, devido à resistência que ela vem adquirindo a vários antibióticos, em especial aos carbapenêmicos, considerados até pouco tempo a

última opção terapêutica para esse tipo de bactéria.

Este estudo teve como objetivo geral a avaliação do perfil de suscetibilidade da *K. pneumoniae* em relação aos carbapenêmicos. E como objetivos específicos, os seguintes: a determinação do perfil de suscetibilidade da *K. pneumoniae* em relação aos carbapenêmicos; caracterização fenotípica de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases; e verificação da suscetibilidade de *K. pneumoniae* a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

## MÉTODOS

Trata-se de pesquisa de caráter experimental, com abordagem quantitativa e qualitativa que foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Imunologia de uma faculdade particular de medicina em Teresina-PI, no período de agosto a outubro de 2014. Foi utilizada uma amostra de conveniência fornecida pelo Laboratório Central de Teresina (LACEN). Foram utilizados 27 isolados de *K. pneumoniae* derivados de diversos espécimes clínicos de pacientes que realizaram exames nesse Laboratório. As amostras fornecidas pelo LACEN foram repicadas em meio de cultura MacConkey e incubadas a 37°C por 24 h. Para a realização do teste de suscetibilidade aos beta-lactâmicos, as colônias previamente selecionadas, em torno de 5 UFC (unidades formadoras de colônias) por vez, foram transferidas para um tubo de ensaio contendo o caldo BHI de modo a produzir turvação moderada de densidade equivalente a escala de 0,5 de McFarland. Após serem incubadas por 20 min em caldo BHI, a suspensão foi semeada, com "swab" estéril, na placa de dimensão 150mm contendo ágar Muller Hinton com espessura média de 4mm. A placa foi colocada em repouso durante 10 min antes de adicionar os discos de antibióticos adicionados. Os discos dos antibióticos utilizados foram: amoxicilina-clavulanato (20/10 $\mu$ g), cefoxitina (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), cefepima (30  $\mu$ g), meropenem (30  $\mu$ g), ertapenem (30  $\mu$ g) e imipenem (30  $\mu$ g), foram postos sobre o inóculo bacteriano na placa com o auxílio de uma pinça e obedecendo uma distância de 20mm das bordas da placa e 30mm entre eles. Posteriormente, essas placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 h em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio), em posição invertida. Após período de incubação, foi realizada a mensuração dos halos de inibição por meio de régua milimetrada e posterior interpretação do teste de suscetibilidade, seguindo critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014*.<sup>8</sup>

O teste de Hodge Modificado foi realizado da seguinte forma: inicialmente suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922, cepa padrão, foi preparada com turbidez equivalente a escala 0.5 de McFarland e semeada na placa petri contendo Muller Hinton. Em seguida, cepas de *K. pneumoniae* ATCC 2705 (positiva para a produção de carbapenemase), *K. pneumoniae* ATCC 2706 (negativa para a produção de carbapenemase) e a cepa teste foram semeadas na forma de estrias no centro da placa até a periferia obedecendo a um comprimento mínimo de 20 a 25mm. Em seguida, discos de 10 $\mu$ g meropenem e 10 $\mu$ g

ertapenem foram colocados no centro de cada placa e a seguir fez-se a incubação na posição invertida a 35°C por um período de 16-20 horas. Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios do CLSI-2014.<sup>8</sup>

A análise estatística dos resultados do teste de difusão pelo método de Kirby-Bauer e do Teste de Hodge Modificado foi realizada por meio de estatística descritiva. Os resultados foram organizados nas planilhas do Excel 2010 e utilizando o programa prisma e o software SPSS20.0.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade Integral e Diferencial (CEP-FACID), CAAE 25696314.9.0000.5211. A execução da pesquisa ocorreu de acordo com os princípios éticos em experimentos envolvendo seres humanos, preconizados na Resolução 196/12 do Conselho Nacional de Saúde, incluindo análise pelo Laboratório Central de Teresina, através do termo de fiel depositário, onde o material biológico foi coletado.

## RESULTADOS

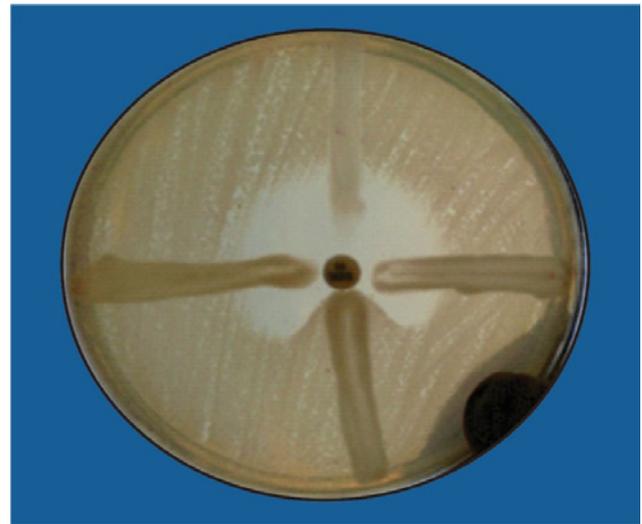
No período de estudo foram analisadas 27 amostras de *K. pneumoniae*, 48,1 % das amostras foram isoladas da urina e os outros 51,9 % das amostras foram obtidas de sangue (11,11 %), secreção traqueal (11,11 %), biliar (7,4 %), ferida (7,4 %) e outros materiais biológicos (11,11 %).

A produção de beta-lactamase de espectro estendido ocorreu em 18,5% dos isolados, na qual foi evidenciada pela presença de halo de suscetibilidade e formação de zona fantasma, entre os discos de antibióticos testados (cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cefepime e amoxicilina com ácido clavulânico), no teste de suscetibilidade para os beta-lactâmicos (Figura 1).

Um total de 40,7 % das amostras foi resistente aos beta-lactâmicos. Parte dessa resistência foi devido à produção de ESBL. Embora tenha havido cepas produtoras de ESBL, todas as cepas foram sensíveis aos carbapenêmicos: Meropenem e Ertapenem no Teste de Hodge

Modificado (Figura 2). Não foi possível determinar qual o mecanismo de resistência presente em algumas cepas que não produziram de forma evidente ESBL.

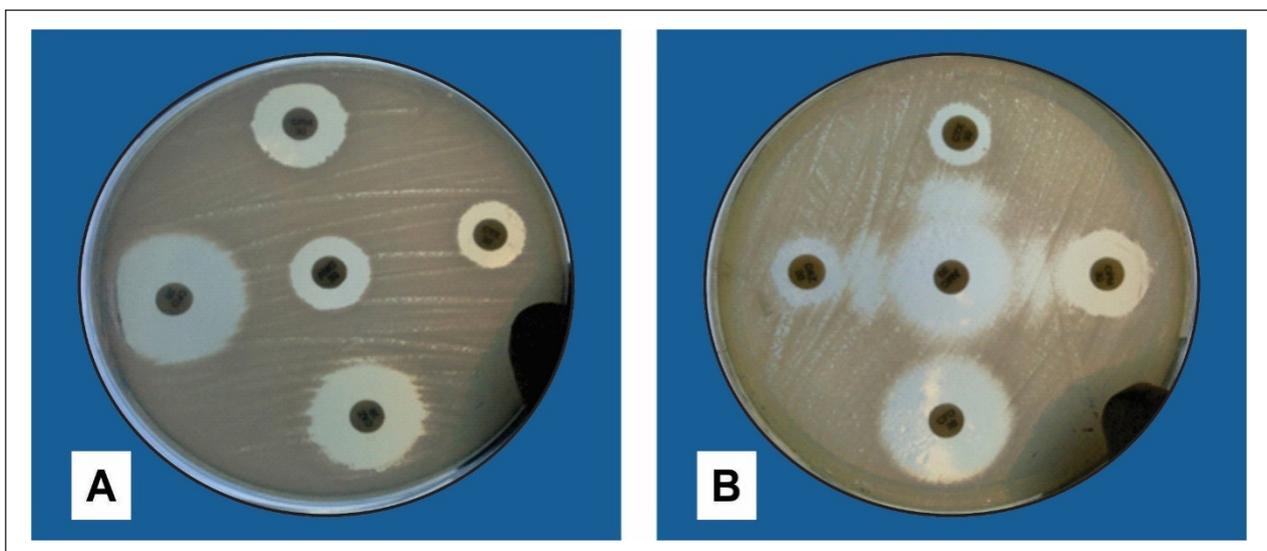
Cinco (18,5 %) das 27 cepas apresentaram zona fantasma no teste de disco-difusão e apresentaram halo tanto para a ceftazidima como para cefotaxima indicativo para ESBL, porém outras amostras apresentaram halo resistente para esses dois antibióticos, mas não houve formação da zona fantasma, como mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Placa de Agar Muller-Hinton com colocação do disco de Meropenem (10µg) para avaliação da produção de carbapenemase pelo teste de Hodge Modificado. Nesta situação observamos o Teste de Hodge Modificado negativo.

## DISCUSSÃO

A *K. pneumoniae* é um microrganismo que tem preferência pelo trato urinário, respiratório e biliar. É encontrado como membro do microbioma normal do intestino dos seres humanos, especialmente nas fezes.



**Figura 1.** Placas de Agar Muller-Hinton mostrando a produção de ESBL nas cepas de *K. pneumoniae*. A) sem zona fantasma (ausência de produção de ESBL) e B) com zona fantasma (produção de ESBL).

Então, a proximidade da porção final do trato digestivo com a porção inicial do aparelho genito-urinário aumenta a possibilidade de penetração de microrganismos das fezes, nesse último. Portanto, é normal a presença dessa bactéria ou de outras enterobactérias como causa de infecção urinária.<sup>9</sup>

Entre as amostras utilizadas, 18,5% foram positivas para a produção de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido. De um total de 27 cepas, 11 apresentaram resistência, e destas 6 produziram ESBL. A interpretação do teste para a produção da enzima demonstrou a formação de zona fantasma, entre os discos de antibióticos testados (cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cefepime e amoxicilina com ácido clavulânico) como indicativos da síntese da enzima. Estudo recente demonstrou que 87,1% dos isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes aos beta-lactâmicos, em função da produção de  $\beta$ -lactamases.<sup>10</sup> Outra pesquisa encontrou uma prevalência de 56,7% de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL.<sup>11</sup> Essa enzima é frequentemente encontrada nessa bactéria, pois apresentam plasmídeos grandes que carregam essa enzima e também apresentam um tempo maior de sobrevivência no ambiente hospitalar o que facilita a transmissão cruzada.<sup>12</sup> Embora tenham sido identificadas cepas produtoras de ESBL, todas foram sensíveis aos beta-lactâmicos do grupo dos carbapenêmicos e tiveram o Teste de Hodge Modificado negativo. Esses resultados corroboram com o estabelecido pelo CLSI, que preconiza a realização do teste de Hodge, quando não ocorre sensibilidade às cefalosporinas no teste da difusão em disco. Resultado semelhante foi encontrado em pesquisa realizada no ano de 2009, onde todas as cepas que produziram ESBL foram sensíveis ao imipenem.<sup>8,13</sup>

Pesquisas correlacionaram a redução na sensibilidade ou resistência a algum carbapenêmico com a presença de ESBL e/ou AmpC presente em algumas cepas. E encontraram a beta-lactamase ESBL como fenótipo de resistência mais frequente e a maioria das cepas testadas apresentaram algum resistência aos carbapenêmicos. Entretanto, na pesquisa em questão todas as cepas foram sensíveis aos carbapenêmicos, independente da produção de beta-lactamases.<sup>5,14</sup>

Pesquisa realizada no ano de 2013 utilizou 50 amostras de *K.pneumoniae* e desse total 32 tiveram o teste *screening* positivo para ESBL, porém quando foi realizado o teste confirmatório apenas 13 amostras eram produtoras de ESBL.<sup>15</sup> Pesquisadores afirmam que quando se realiza a detecção fenotípica de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido por inibição com o ácido clavulânico, a enzima pode ser mascarada pela expressão de carbapenemases e/ou cefalosporinases que hidrolisam este inibidor. Outros autores afirmam que na presença de AmpC pode haver falso negativo para a produção de ESBL, pois essa enzima hidroliza o ácido clavulânico.<sup>16</sup> No trabalho realizado no ano de 2009, houve dificuldade na triagem das cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL devido a presença de AmpC. Outro estudioso encontrou na sua pesquisa a presença, na maioria das amostras de *Klebsiella pneumoniae*, dos dois fenótipos (ESBL e AmpC) simultaneamente. Eventos estes que po-

dem ter interferido na não formação de zona fantasma em alguns isolados que apresentaram resistência. E para a confirmação ou não da produção de ESBL nessas cepas utilizadas que não formaram a zona fantasma, seria necessário a realização do teste confirmatório com os discos combinados, só assim seria avaliado se outros mecanismos de resistência estariam ou não envolvidos.<sup>8,14,17</sup>

A presença de resistência aos beta-lactâmicos sem a detecção de beta-lactamase específica pode estar relacionado a outros mecanismos de resistência frequentes na *K. pneumoniae*, como a redução da expressão de proteínas na membrana externa e perda de porinas, porém esses mecanismos estão associados com a resistência aos carbapenêmicos, fato que não ocorreu na pesquisa, já que todos os isolados foram sensíveis ao imipenem, meropenem e ertapenem.<sup>18</sup> Ressalva deve ser feita com o aumento crescente de cepas produtoras de ESBL, fato que tem provocado falha terapêutica com uso de beta-lactâmicos de amplo espectro. Situação essa que se faz necessário o uso de carbapenêmicos como opção terapêutica eficaz, porém essa medida facilita o surgimento de cepas resistentes a essas drogas.<sup>5</sup>

O estudo realizado mostra que todas as cepas de *K. pneumoniae* foram sensíveis aos beta-lactêmicos do grupo dos carbapenêmicos e com os testes realizados, não houve cepas de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. Dos isolados de *K. pneumoniae* utilizados nas experimentações laboratoriais, cinco foram produtores de beta-lactamase de amplo espectro e seis cepas de *K. pneumoniae* foram resistentes aos outros beta-lactâmicos, entretanto, não foi possível identificar o mecanismo de resistência envolvido.

## REFERÊNCIAS

1. Murray PR, et al. Microbiologia médica. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p.299-313.
2. Davin-Regli A. et al. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" enterobacterial pathogens. *Curr Drugs Targets* 2008; 9(9): 750-9.
3. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiology, 7th ed, New York, USA: McGraw-Hill Companies 2008; 835-853.
4. O'brien TF. Emergence, spread and environmental effects of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis* 2002; 34(Supl): 78S-84.
5. Picoli S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab* 2011; 47(1): 25-31.
6. Amaral EJLS, Lima MRS, Soares NS. Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. *Epidemiol Serv Saúde* 2014; 23(1): 177-182.
7. Paz IFR. Identificação dos Problemas relacionados com antimicrobianos em Unidade de terapia Intensiva em um hospital público de Teresina [Graduação em farmácia]. Teresina-PI, Universidade Federal do Piauí; 2011.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2014; 34(1): 51-60.
9. Schenkel TS, Picoli Su, Meyer G. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae em ambiente hospitalar. J Bras Patol Med Lab 2010; 46(1): 23-27.
10. Moreira APA, Batistão DWF, Dantes RDD. Infecções hospitalares por amostras de Enterobacteraceae resistentes as cefalosporinas de terceira geração em um hospital universitário brasileiro: fenótipo ESBL VS. Outros mecanismos. 4º Congresso Mineiro de Infectologia. Belo Horizonte, 2011.
11. Ruschel KPO.  $\beta$ -lactamases na família Enterobacteriaceae: Métodos de detecção e prevalência(dissertação). Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
12. Paterson D, Bobomo R. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18(1): 657-86.
13. Tolentino FM. Detecção e Identificação dos genes de beta-lactamases blaSHV, blaTEM e blaCTX-M em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo (Dissertação). São José do Rio Preto, Instituto de Biociências Universidade Estadual Julio de Mesquita Feilho. 2009.
14. Vieira VPA. Infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em hospital de nível terciário: Epidemiologia e caracterização (Dissertação). Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia, 2013.
15. Chika E, Moses I, Peter E. et al. Phenotypic Detection of *Klebsiella pneumoniae* Strains: Producing Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase Enzymes. SchAcad J Biosci 2013; 1(1): 20-23.
16. Kassis C, Thiolet M, Jarlier V, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1539-40.
17. Pavez M. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros (Dissertação) São Paulo, Universidade de São Paulo, 2009.
18. Livermore DM. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 2001; 47(3): 247-50.