

KALINCA MIRANDA FERREIRA

**INVESTIGAÇÃO DE BETA-LACTAMASES EM *KLEBSIELLA*  
*PNEUMONIAE* E *ESCHERICHIA COLI* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO  
DE CAMPO GRANDE-MS**

ACT – ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

SETEMBRO/2015

KALINCA MIRANDA FERREIRA

**INVESTIGAÇÃO DE BETA-LACTAMASES EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *ESCHERICHA COLI* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO DE CAMPO GRANDE-MS**

Artigo Científico apresentado à  
ACT – Academia de Ciência e  
Tecnologia para a obtenção do  
grau de Especialista em  
Microbiologia clínica

Aprovado: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

ACT – ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

# INVESTIGAÇÃO DE BETA-LACTAMASES EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *ESCHERICHIA COLI* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO DE CAMPO GRANDE-MS

Kalinca Miranda Ferreira<sup>1</sup>, Ana Carolina Watanabe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

## RESUMO

O tratamento de pacientes com infecção por bactéria multirresistente tem sido considerado um dos principais desafios para classe médica na atualidade. Objetivou-se neste estudo investigar a produção de Beta-Lactamase de Espectro Estendido-ESBL, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-KPC e AmpC em *K. pneumoniae* e *E. coli* isoladas de pacientes de um hospital público de Mato Grosso do Sul. A detecção de beta-lactamases foi realizada por técnicas fenotípicas previamente descritas. De 41 *K. pneumoniae*, 95,1% foram produtoras de ESBL, 19,5% de AmpC e 22,0% de KPC. Das 33 *Escherichia coli*, 54,5% foram produtoras de ESBL, 6,1% de AmpC e nenhuma de KPC. A ampliação dos conhecimentos a respeito dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos contribui com estudos epidemiológicos e auxiliam a Comissão de Controle de Infecção na instituição de estratégias para minimizar a disseminação desses patógenos.

Palavras-chave: beta-lactamases. *Klebsiella pneumoniae*. Infecção Hospitalar. Resistência Microbiana a Antibióticos. *E. coli*.

## ABSTRACT

Treatment of patients with multidrug-resistant bacterial infection has been considered one of the major challenges for physicians today. This study aimed to investigate the production of Extended Spectrum Beta-Lactamase-ESBL, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-KPC and AmpC in *K. pneumoniae* and *E. coli* isolated from patients at a public hospital in Mato Grosso do Sul. The detection of beta-lactamases was performed by phenotypic techniques previously described. From 41 *K. pneumoniae*, 95.1% were ESBL-producing, 19.5% were AmpC-producing and 22.0% were KPC-producing. From 33 *Escherichia coli*, 54.5% were ESBL-producing, 6.1% (2/370) of AmpC-producing and none KPC-producing. The expansion of knowledge regarding the mechanisms of antimicrobial resistance contribute to epidemiological studies and assist the Commission for Hospital Infection Control in establishing strategies to minimize the spread of these pathogens.

Keywords: Beta-lactamases. *Klebsiella pneumoniae*. Cross Infection. Drug Resistance Microbial. *E. coli*.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 6  |
| <b>2 MÉTODOS</b> .....   | 6  |
| <b>2.1 Identificação fenotípica das <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemase</b> ..... | 7  |
| <b>2.2 Perfil dos pacientes</b> .....  | 7  |
| <b>2.3 Considerações éticas</b> .....  | 7  |
| <b>3 RESULTADOS</b> .....  | 8  |
| <b>4 DISCUSSÃO</b> .....   | 9  |
| <b>5 CONCLUSÃO</b> .....   | 11 |
| <b>6 REFERÊNCIAS</b> .....   | 11 |

## 1 INTRODUÇÃO

*Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno hospitalar, responsável principalmente por quadros de pneumonia, sepse e infecção do trato urinário (WHO, 2002). A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo que possui ampla distribuição na natureza e assim como *K. pneumoniae*, faz parte da microbiota intestinal. O isolamento de *E. coli* em outro sítio, como na pele e mucosas de pacientes hospitalizados, pode caracterizar infecção (NAVON *et al.*, 2003; SCHWABER *et al.*, 2006).

Entre os principais mecanismos de resistência dessas bactérias citam-se a produção de enzimas como: beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), beta-lactamase classe C (AmpC) e New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM).

As ESBL hidrolisam a cadeia oximino-beta-lactâmica, degradam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, não degradam carbapenêmicos e cefamicinas, e são inibidas por inibidores de beta-lactamases (PICAO & GALES, 2007).

As AmpC beta-lactamases são cefalosporinases que não são inibidas por inibidores de beta-lactamases, conferem resistência às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e a maioria das penicilinas (BLACK; MOLAND; THOMSON, 2005; COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000).

A enzima KPC confere resistência a todos os agentes beta-lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Esses últimos são considerados os antibióticos de escolha no tratamento de infecções graves por bactérias produtoras de ESBL (BABIC; HUJER; BOMONO, 2006).

O presente estudo teve por objetivo investigar a produção de ESBL, KPC e AmpC em *K. pneumoniae* e *E. coli* isoladas de pacientes atendidos em um Hospital Público terciário de Campo Grande - MS.

## 2 MÉTODOS

Foram incluídas no estudo *K. pneumoniae* e *E. coli* ESBL positivas e/ou que apresentaram sensibilidade intermediária ou resistência para cefalosporinas (de terceira e quarta geração), para cefoxitina e/ou para carbapenêmicos, isoladas entre agosto 2010 e abril

de 2011, provenientes de pacientes atendidos em um hospital público terciário de 256 leitos, em Campo Grande-MS.

A identificação dos micro-organismos e a determinação da susceptibilidade antimicrobiana foram realizadas pelo sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França).

### **2.1 Identificação fenotípica das *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemase**

Para investigar a produção das beta-lactamases ESBL e KPC foram utilizados os testes fenotípicos recomendados pelo *Control Laboratory Standard Institute - CLSI* (2012).

Para pesquisa de AmpC, adotou-se a metodologia proposta por Coudron (2005).

Como controle de qualidade dos testes, foi utilizada a cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **2.2 Perfil dos pacientes**

Dados demográficos, setor, tempo de internação e evolução dos pacientes foram consultados nos prontuários médicos. Esses dados foram analisados no programa Epi-info 3.4.3 (*Center for Disease Control and Prevention Software*).

### **2.3 Considerações éticas**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo nº 1752/2010.

### 3 RESULTADOS

Um total de 115 *K. pneumoniae* e 470 *E. coli* provenientes de diferentes amostras clínicas foram isoladas no período de estudo. Destas, 41 *K. pneumoniae* e 33 *E. coli* foram selecionadas de acordo com o perfil de susceptibilidade.

A média de idade dos pacientes infectados por *K. pneumoniae* e *E. coli* foi de 62,6 ( $\pm$  24,8) e 58,7 ( $\pm$ 22,6) anos, respectivamente. O tempo médio de internação dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* e *E. coli* foi de 30,7 dias e 18 dias, respectivamente. A frequência de óbitos durante a hospitalização foi de 31,7% (13/41) para pacientes com isolados de *K. pneumoniae* e de 21,2 % (7/33) para *E. coli*.

*Klebsiella pneumoniae* foi isolada principalmente de pacientes internados em enfermaria de Clínica Médica - CM (34,1%), Centro de Terapia Intensiva – CTI de adultos (17,1%) e Pronto Atendimento Médico - PAM (17,1%). Por sua vez, *E. coli* foi isolada principalmente de pacientes do PAM (55,5%), CM (11,1%) e CTI de adulto (27,8%).

As espécimes clínicas das quais foram isoladas *K. pneumoniae* foram: urina (68,0%), sangue (15,0%), aspirado traqueal (10,0%), exsudato de ferida (5,0%) e ponta de cateter (2,0%). *Escherichia coli* foram isoladas de urina (83,3%), de sangue (11,1%) e de lavado vesical (5,5%).

A **Tabela** mostra o perfil de resistência aos antimicrobianos das *K. pneumoniae* e *E. coli* selecionadas.

Entre todas as *K. pneumoniae* isoladas no período, 95,1% (39/41) foram produtoras de ESBL, 19,5% (8/41) de AmpC e 22,0% (9/41) de carbapenemase -KPC. Das *E. coli*, 54,5% (18/33) foram produtoras de ESBL, 6,1% (2/33) de AmpC e ESBL simultaneamente e não foi encontrada nenhuma produtora de KPC.

O sistema automatizado Vitek 2 identificou 35 *K. pneumoniae* e 6 *E. coli* positivas para ESBL, enquanto que o teste fenotípico manual foi positivo para 39 e 18, respectivamente.

**Tabela** - Perfil de resistência de 41 *K. pneumoniae* e 33 *E. coli* selecionadas para pesquisa de beta-lactamases, agosto 2010 a abril 2011, Hospital Universitário de Campo Grande-MS.

| Antibiótico             | <i>E. coli</i> (%) |            | <i>K. pneumoniae</i> (%) |            |
|-------------------------|--------------------|------------|--------------------------|------------|
|                         | Sensível           | Resistente | Sensível                 | Resistente |
| Amicacina               | 89,0               | 11,0       | 87,8                     | 12,2       |
| Cefalotina              | 3,0                | 97,0       | 4,9                      | 95,1       |
| Cefoxitina              | 44,4               | 55,6       | 41,5                     | 58,5       |
| Ceftazidima             | 15,2               | 84,8       | 4,9                      | 95,1       |
| Cefotaxima              | 27,3               | 72,7       | 4,9                      | 95,1       |
| Cefepime                | 27,3               | 72,7       | 4,9                      | 95,1       |
| Ertapenem               | 94,0               | 6,0        | 70,7                     | 29,3       |
| Meropenem               | 100,0              | 0,0        | 80,5                     | 19,5       |
| Piperacilina/Tazobactam | 78,8               | 21,2       | 70,7                     | 29,3       |
| Ciprofloxacino          | 21,2               | 78,8       | 22,0                     | 78,0       |

#### 4 DISCUSSÃO

Dados da literatura referem que pacientes em extremos de idade são mais susceptíveis a infecções oportunistas por micro-organismos multirresistentes. Corroborando com estudo prévio (LUZZARO *et al.*, 2006), na presente casuística, a maioria dos pacientes tinha idade superior a 60 anos. Pacientes nessa faixa etária normalmente são portadores de doenças crônicas e tem o sistema imune menos eficiente (PATERSON, 2006).

As infecções por bactérias multirresistentes podem estar relacionadas, entre outros motivos, com o maior número de óbitos dos pacientes e tempo de internação prolongado, entretanto estes dados não foram observados na presente investigação (ANDRADE *et al.*, 2006; MILLAN *et al.*, 2012).

Assim como em outro estudo brasileiro de Passo Fundo/RS, neste estudo, as enterobactérias produtoras de ESBL foram isoladas principalmente em Centros de Terapia Intensiva (CTI), provavelmente devido ao uso excessivo de antimicrobianos e o risco de



transmissão de agentes infecciosos entre pacientes (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010).

No momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes estava internada em enfermaria de Clínica Médica, local este onde normalmente são encaminhados pacientes em alta do CTI. Os casos de pronto atendimento médico podem estar relacionados com a entrada de pacientes colonizados provenientes de outras instituições hospitalares.

Estudos prévios relatam *K. pneumoniae* e *E. coli* como importante agentes de infecções do trato urinário tanto em pacientes hospitalizados como ambulatoriais (BEIRÃO *et al.*, 2011; LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010), fato esse que justifica o maior número de isolamentos provenientes de amostras de urina em nosso estudo (MENEZES *et al.*, 2007; NAVON *et al.*, 2003).

Na presente investigação foi possível verificar que a frequência de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtora de ESBL encontrada é superior a média nacional de (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006; SADER *et al.*, 2004). Digno de nota foi a observação de que a positividade de ESBL no sistema automatizado Vitek 2 foi inferior a encontrada no teste manual. Esse fato pode ser devido a resultado falso-negativo que esse sistema automatizado pode liberar na presença de micro-organismos com baixo nível de resistência a oximino-cefalosporinas (SPANU *et al.*, 2006). Outros autores referem que se o micro-organismo for produtor simultâneo de ESBL e AmpC, o sistema automatizado pode não detectar a presença de ESBL (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

A frequência de AmpC encontrada em *K. pneumoniae* foi semelhante ao descrito por Meyer *et al.* (2011), em hospital de emergência de Porto Alegre/RS/Brasil. Amostras AmpC positivas apresentam sensibilidade *in vitro* para cefalosporinas de amplo espectro, porém não demonstram resultado clínico satisfatório (COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000), por isso faz-se importante a sua detecção no laboratório. De acordo com estudos prévios (COUDRON, 2005; TSAKRIS *et al.*, 2009), o emprego do AFB em laboratórios de rotina melhora a identificação de isolados AmpC e possibilita a detecção de isolados produtores de ESBL, AmpC e KPC, simultaneamente.

Algumas bactérias expressam mais de um mecanismo de resistência e conseqüentemente, ocorre falha terapêutica mesmo em uso de diferentes classes de antibióticos (PATERSON, 2006).

Por outro lado, foi observado que algumas bactérias com elevada resistência aos carbapenêmicos e/ou cefalosporinas de terceira e quarta geração não

expressam ESBL, AmpC ou carbapenemase sugerindo que outros mecanismos de resistência que não a produção de beta-lactamases devem estar envolvidos. A exemplo disso pode-se citar perda dos canais de porina os quais interferem na penetração desses fármacos (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

As *E.coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL estudadas apresentaram elevada resistência a ampicilina, cefalosporinas, cefoxitina e ciprofloxacina. Assim, os antibióticos carbapenêmicos e amicacina poderiam ser considerados como opção terapêutica, assim como também observado por Villegas *et al.* (2011).

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo documenta a presença de *K. pneumoniae* produtoras de beta-lactamases ESBL, AmpC e carbapenemase e *E. coli* produtoras de ESBL e AmpC em hospital de referência no Mato Grosso do Sul, assim como descrito em outras regiões do Brasil. A crescente observação de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar impõe a necessidade de esforços multidisciplinares. Os fenótipos e genótipos de resistência aos antimicrobianos devem ser pesquisados pelos laboratórios de microbiologia de modo a melhor contribuir com a escolha terapêutica, além de auxiliar a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar no controle e prevenção da disseminação desses patógenos.

## 6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, Denise; LEOPOLDO, Vanessa Cristina; HAAS, Vanderlei José. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n.1, 2006.

BABIC, Maja; HUJER, Andrea M.; BOMONO, Robert A. What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n.10, p.16-32, 2006.

BEIRÃO, Elisa Maria *et al.* Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 69-73, 2011.

BLACK, Jennifer A.; MOLAND, Ellen Smith; THOMSON, Kenneth S. AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in *Enterobacteriaceae* Lacking

Chromosomal AmpC  $\beta$ -Lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3110-13, 2005.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S22**. Wayne, USA, 2012.

COUDRON, Philip E. Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 8, p. 4163-4167, 2005.

COUDRON, Philip E.; MOLAND, Ellen S.; THOMSON, Kenneth S. Occurrence and Detection of AmpC Beta-Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates at a Veterans Medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 5, p.1791-1796, 2000.

DALMARCO, Eduardo Monguilhot; BLATT, Solange Lúcia; CÓRDOVA, Caio Mauricio Mendes. Identificação laboratorial de  $\beta$ -lactamases de Espectroestendido(ESBLs)-Revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n.3, p. 171-177, 2006.

DIENSTMANN, Rosabel; PICOLI, Simone Ulrich; MEYER, Gabriela; SCHENKEL, Tiago; STEYER, Juçara. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

LAGO, Aldalise; FUENTEFRIA, Sergio Roberto; FUENTEFRIA, Daiane Bopp. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LUZZARO, Francesco *et al.* Trends in Production of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among *Enterobacteria* of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1659-1664, 2006.

MEYER, Gabriela; PICOLI, Simone Ulrich. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 25-31, 2011.

MENEZES, Everado Albuquerque; NASCIMENTO, Kaline Medeiros; SOARES, Karla Pimenta; AMORIM, Lia Nascimento; NETO, José Gadelha Lima; CUNHA, Francisco Afrânio. Avaliação da atividade in vitro do meropenem contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamase de espectro expandido isoladas na cidade de

Fortaleza, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40 (3), p.349-350, 2007.

MILLAN, Lincoln Saito; BENEDETTE, Carlos Eduardo Marins; MAXIMO, Luiza Zonzini; ALMEIDA, Paulo Cezar Cavalcante; GOMES, David Souza; GEMPERLI, Rolf; FERREIRA, Marcus Castro. Infecções de corrente sanguínea por bactérias multirresistentes em UTI de tratamento de queimados: experiência de 4 anos. **Revista Brasileira Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 3, p. 374-8, 2012.

NAVON-VENEZIA, Shiri; HAMMER-MUNZ, Orly; SCHWARTZ, David; TURNER, Dan; KUZMENKO, Boris; CARMELI, Yehuda. Occurrence and Phenotypic Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among Members of the Family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and Evaluation of Diagnostic Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 155-8, 2003.

PATERSON, David L. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S20-S28, 2006.

PAVEZ, Mônica; MAMIZUKA, Elsa M.; LINCOPAN, Nilton. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n. 6, p.2702, 2009.

PICAO, Renata Cristina; GALES, Ana Cristina.  $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar**, Ano IX, n. 49, p.79-84, 2007.

SADER, Hélio S. *et al.* SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SCHWABER Mitchell J; SCHWARTZ David; CARMELI Yehuda. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3098-101, 2006.

SPANU, Teresa *et al.* Evaluation of the New VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for Rapid Detection of ESBL Production in *Enterobacteriaceae* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3257-3262, 2006.

VILLEGAS, Maria Virginia *et al.* Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America - 2008 update from the Study for Monitoring

Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 34-39, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevention of hospital-acquired infections - A Practical Guide**. Malta, 2002.