

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO DE MICROBIOLOGIA**

MAYANA SOARES DOS SANTOS

***Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) e a
importância de seu estudo**

Belo Horizonte

2018

MAYANA SOARES DOS SANTOS

***Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) e a
importância de seu estudo**

Monografia apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Soares Motta Noronha

Belo Horizonte

2018

Este trabalho é uma realização pessoal a qual dedico a minha família que sempre esteve do meu lado.

AGREDECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus familiares por estarem sempre presentes e por darem o apoio necessário para alcançar meus objetivos.

Aos amigos que mesmo com minha ausência sempre me deram o incentivo necessário para concluir esta minha caminhada.

*“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A família *Enterobacteriaceae* compreende a maioria de todas as amostras clínicas bacterianas hospitalares. O aparecimento das carbapenemases constitui uma grande ameaça, prejudicando o tratamento das infecções bacterianas, devido à sua capacidade de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos, principalmente da classe dos carbapenêmicos. *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase KPC é um grave problema clínico e epidemiológico nas instituições de saúde brasileiras, devido ao alto índice de infecções nosocomiais e sua grande capacidade de desenvolver resistência a antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre as infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase e aspectos relacionados à resistência aos antimicrobianos. A metodologia utilizada foi revisão de literatura, onde se realizou a pesquisa nas bases de dados Scielo, Pubmed e Google Acadêmico, nas línguas, português, inglês e espanhol e estudos no período de 2011 a 2017, utilizando-se os seguintes descritores: *Klebsiella pneumoniae*, resistência bacteriana, carbapenemase e carbapenêmicos. Os estudos apresentaram evidências da evolução de *Klebsiella pneumoniae* produtora de enzima carbapenemase português, como uma bactéria de grande interesse médico, devido ao seu alto grau de resistência a antimicrobianos e à sua grande relevância no contexto de infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). O entendimento do mecanismo de infecção da KPC, o diagnóstico das infecções, o tratamento e as medidas de prevenção, são de suma importância para uma boa atuação dos profissionais no ambiente hospitalar a fim de minimizar as infecções por esta bactéria, diminuindo o índice de morbidade e mortalidade.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, resistência bacteriana, carbapenemase e carbapenêmicos.

ABSTRACT

The Enterobacteriaceae family comprises the majority of all clinical bacterial hospital samples. The appearance of carbapenemases is a major threat, which impairs the treatment of bacterial infections, due to its ability to hydrolyze most β -lactams, especially of the carbapenems. *Klebsiella pneumoniae*, a producer of the enzyme carbapenemase KPC, is a serious clinical and epidemiological health problem in Brazilian health institutions due to the high degree of nosocomial infection and its high antimicrobial resistance. The objective of the study was to deepen the knowledge about the infections caused by *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase and its impact on the prognosis of the patient. The methodology used was a literature review, where the research was conducted in the databases Scielo, Pubmed and Google Academic, in the Portuguese, English and Spanish languages and studies in the period from 2011 to 2017, using the following descriptors: *Klebsiella pneumoniae*, bacterial resistance, carbapenemase, and carbapenems. The studies presented, according to the evidence, the evolution of *Klebsiella pneumoniae*, relating the concepts of the bacterium producing enzyme carbapenemase, as well as its prominence as a bacterium of great medical interest, due to its high degree of antimicrobial resistance and its great relevance in the context of Health Care-related Infections (IRAS). The understanding of the KPC infection mechanism, its diagnosis, treatment and prevention measures are of paramount importance for a good performance of the professionals in the hospital environment in order to minimize the infections by this bacterium, reducing the morbidity index and mortality.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, bacterial resistance, carbapenemase and carbapenem.

LISTA FIGURAS

Figura 1 – <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp.....	16
Figura 2 – Mecanismo de resistência bacteriana.....	18
Figura 3 – Teste de Hodge modificado.....	23
Figura 4 – Fita de E-test.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC:** *American Type Culture Collection*
- BGN:** Bacilos Gram-negativos
- CCIH:** Comissão de controle de infecção hospitalar
- CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CIM:** Concentração inibitória mínima
- EPI:** Equipamento de proteção individual
- IMP:** Imipenem resistentes
- IRAS:** Infecções relacionadas à assistência a saúde
- ITU:** Infecções do trato urinário
- KPC:** *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase
- LACEN:** Laboratório central de saúde pública
- MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicilina
- MBL:** *Metallo β -lactamase*
- MHT:** Teste de Hodge modificado
- MS:** Ministério da Saúde
- NDM:** *New Delhi β -lactamase*
- OXA:** Oxacilina
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase
- RDC:** Resolução da diretoria colegiada
- RS:** Rio Grande do Sul
- SCIELO:** *Scientific Electronic Library Online*
- spp:** Espécie
- UFC:** Unidade formadora de colônia
- UTI:** Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. METODOLOGIA	14
4. REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1. Família <i>Enterobacteriaceae</i>.....	15
4.1.1. <i>Klebsiella</i> spp.	15
4.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	16
4.2. Resistência aos antimicrobianos.....	17
4.3. Resistência de <i>K. pneumoniae</i> a antimicrobianos	18
4.3.1. Carbapenêmicos	19
4.3.2 Carbapenemases.....	19
4.4. Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções causadas por KPC....	21
4.5. Métodos de pesquisa das infecções por KPC	21
4.5.1. Teste de Hodge modificado.....	212
4.5.2. Microdiluição em caldo.....	23
4.5.3. E-test	234
4.5.4. Disco-difusão.....	24
4.5.5. Reação em cadeia da polimerase	25
4.6. Tratamento das infecções por KPC.....	25
4.7. Métodos de controle e prevenção da infecção por KPC.....	25
5. CONCLUSÃO	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma espécie de bactéria da família *Enterobacteriaceae* que pode ser classificada com base na morfologia (bacilos) e na constituição da parede celular (Gram-negativa). Na comunidade pode ser encontrada na água, solo, vegetais e nas fezes de animais de sangue quente (aves e mamíferos). É uma espécie de grande importância clínica por sua capacidade mutante de resistir aos antimicrobianos e por seu grande potencial de causar doença (MOREIRA; FREIRE, 2011).

A resistência a antimicrobianos por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) tornou-se uma ameaça relevante à saúde pública global devido aos diferentes mecanismos de resistência e às poucas alternativas de tratamento (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; BIBERG *et al.*, 2015). A presença de enzimas capazes de resistir aos antimicrobianos principalmente da classe dos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) associado a outros mecanismos, como por exemplo, a transferência de material genético facilitada pelo plasmídeo bacteriano, pode tornar essa bactéria resistente a quase todas as classes disponíveis de antimicrobianos do mercado (MARQUES *et al.*, 2015). Os carbapenêmicos constituem a classe de antimicrobianos mais utilizados na terapêutica contra infecções causadas por enterobactérias por possuir um amplo espectro de ação, entretanto, muitas vezes é necessária a terapia que associa tigeiclina e polimixina B o qual apresenta limitações em decorrência de seus efeitos nefrotóxicos e neurotóxicos (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012).

Após o primeiro relato de linhagens de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases há 21 anos nos Estados Unidos, sua propagação vem crescendo cada vez mais (GASPAR *et al.*, 2015). Vários estudos demonstram que a KPC é clinicamente relevante como causadora de infecções nosocomiais (BIBERG *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2015; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; SEIBERT *et al.*, 2014), como pneumonias, doenças do trato gastrointestinal, infecções do trato urinário (ITU), infecções da corrente sanguínea, entre outras. Além disso, é uma bactéria que resiste no ambiente hospitalar por muitos anos e por isso requer uma atenção maior por parte dos profissionais de saúde na manipulação dos pacientes. Neste trabalho buscamos conhecer mais profundamente as

características desta bactéria que permanece ainda como uma grave ameaça no ambiente nosocomial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Aprofundar o conhecimento sobre *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e aspectos relacionados à sua resistência a antimicrobianos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características da bactéria *Klebsiella pneumoniae*;
- Conhecer aspectos das infecções por *Klebsiella pneumoniae* no contexto atual;
- Descrever os carbapenêmicos e as carbapenemases;
- Avaliar o impacto das infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase no prognóstico do paciente;
- Conhecer métodos para o diagnóstico das infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* para carbapenemase;
- Analisar a evolução das medidas de controle e prevenção da infecção por *Klebsiella pneumoniae* para carbapenemase.

3. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo descritivo pela revisão de literatura em artigos científicos, notas técnicas, Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), teses e dissertações publicadas no período de 2011 a 2017. Realizou-se a pesquisa nas bases de dados Scielo, Pubmed e Google Acadêmico, nas línguas português, inglês e espanhol, utilizando-se os seguintes descritores: *Klebsiella pneumoniae*, resistência bacteriana, carbapenemase e carbapenêmicos. Artigos anteriores a 2011 não foram incluídos no estudo por serem considerados desatualizados. Para o levantamento de dados utilizou-se apenas literaturas publicadas na íntegra de acesso livre *online* que relataram estudos realizados envolvendo diretamente seres humanos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Família *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram-negativos (BGN) que constituem 50% de todas as amostras bacterianas isoladas em ambientes hospitalares e 80% das amostras de bactérias Gram-negativas de relevância médica (VERDI *et al.*, 2011). Esta família possui um grande número de gêneros já descritos, em torno de 50, sendo que, destes 20-25 são clinicamente relevantes (CUNHA, 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Os gêneros dessa família apresentam como características gerais serem anaeróbios facultativos, podendo ser móveis ou imóveis, capsuladas ou não, fermentadoras de glicose, comumente oxidase negativos e estando presentes no trato gastrointestinal dos humanos e animais de sangue quente (aves e mamíferos) (CUNHA, 2014).

Os principais gêneros da família *Enterobacteriaceae* são: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Serratia* spp.. Cerca de 99% dos microrganismos de importância clínica isolados de ambientes hospitalares, e até mesmo na comunidade, são enterobactérias (ANVISA, 2013; CABRAL, 2011). As bactérias desta família são importantes causas de infecções hospitalares, sendo *Klebsiella pneumoniae* um dos principais agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (TAPIA *et al.*, 2011).

4.1.1. *Klebsiella* spp.

A identificação do gênero *Klebsiella* ocorreu no final do século XIX e seu nome faz referência em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs. Por outro lado, a bactéria foi também descrita por Carl Friedlander e ficou conhecida por vários anos como uma bactéria causadora de pneumonia grave, muitas vezes fatal (CABRAL, 2011). O gênero *Klebsiella* apresenta 16 espécies e 5 subespécies sendo que *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* tem um papel de destaque pois está relacionada a um número significativo de IRAS.

4.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

Estas bactérias são bacilos Gram-negativos de natureza anaeróbia facultativa. São imóveis, não esporuladas e possuem cápsulas polissacarídicas (CABRAL, 2011). A **figura 1** apresenta as características microscópicas de *K. pneumoniae*.

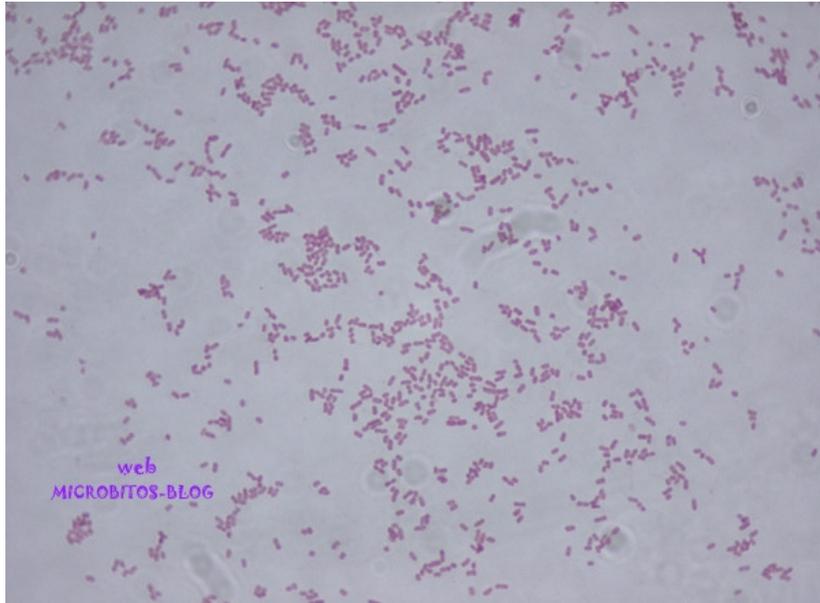


Figura 1 – *Klebsiella pneumoniae*

(Fonte: http://microbitosblog.com/2015/04/20/klebsiella_medio_cultivo_infeccion_gram/)

Esta bactéria pode sobreviver em superfícies e objetos inanimados e fazer parte da microbiota normal de animais de sangue quente assim como de seres humanos. Quando em desequilíbrio a bactéria pode causar infecções urinárias, septicemia, pneumonias associadas à ventilação mecânica, etc. As infecções urinárias, seguidas de pneumonia e septicemia são os principais quadros infecciosos associados a *K. pneumoniae* tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade (CABRAL, 2011).

Em um estudo publicado em 2011, Moreira e Freire chamam a atenção para o fato de que, embora *K. pneumoniae* possa fazer parte da microbiota de seres humanos, sendo encontrada na orofaringe e nas fezes no caso de pessoas saudáveis, esta bactéria apresenta um número significativo de surtos de infecções em situações relacionadas à assistência à saúde (LIMA *et al.*, 2014). Em pessoas imunocromprometidas a bactéria pode levar a infecções graves, especialmente

quando isto ocorre em um ambiente propício, como é o ambiente hospitalar. A transmissão de *K. pneumoniae*, pode ser relacionada ao contato com materiais hospitalares, como termômetros e estetoscópios dentre outros artigos, propiciando a infecção em pacientes imunocomprometidos, devido ao contato oportunista da bactéria com esse hospedeiro potencialmente debilitado (VERDI *et al.*, 2016).

Conforme nota técnica n° 01/2013 da Anvisa, no Brasil a propagação de *K. pneumoniae* é um grave problema clínico e epidemiológico nas instituições de saúde brasileiras (ANVISA, 2013). É considerado um dos principais microrganismos de interesse médico, por possuir um alto índice de morbimortalidade relacionadas às IRAS (SILVA; ESTEVES, 2017). Na relação de casos associados a surtos hospitalares relativos à *K. pneumoniae* podem ser citados quadros de pneumonia relacionado à ventilação mecânica, bacteremia, infecção urinária e enterites (VERDI *et al.*, 2016). *K. pneumoniae* apresenta vários fatores de virulência que justifica seu papel importante em infecções relacionadas à assistência à saúde, como: fibrinas e cápsulas polissacarídicas que atua como uma proteção contra a fagocitose de macrófagos, expressão de adesinas que viabiliza a formação de biofilme e permite uma maior aderência as células epiteliais humana e produção de toxinas (MELO, 2013).

4.2. Resistência aos antimicrobianos

O histórico de registros sobre a resistência aos antimicrobianos relacionados às bactérias tem seu início nos anos 1940, decorrente do uso indiscriminado da penicilina, evoluindo nos anos 1960 e 1970, quando, em 1968 ocorreu o primeiro registro de emergência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Deste então, uma crescente prevalência de registros de resistência das bactérias a antimicrobianos vem sendo mantida até os dias atuais. Este fato está relacionado ao uso indiscriminado de antimicrobianos associado ao processo evolutivo das bactérias que possuem uma grande adaptação genética ao meio em que está inserida. (CUNHA, 2014). O conhecimento sobre os mecanismos de resistência aos antibacterianos por algumas enterobactérias mostrou a importância de fatores como: alteração da permeabilidade de membrana, que dificulta a entrada de antimicrobianos nas células; perda de porinas; expressão de genes de resistência; ativação da bomba de efluxo, que permite a expulsão do fármaco para fora da

célula; hidrólise não só de carbapenêmicos, mas também dos demais β -lactâmicos, modificando a conformação de grupos funcionais dos fármacos. Como ilustrado na **figura 2**, os mecanismos de resistência aos antimicrobianos são variados e podem diferir entre as bactérias (NAVARRO *et al.*, 2015; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; OLIVEIRA, 2014; RECHENCHOSKI *et al.*, 2017).

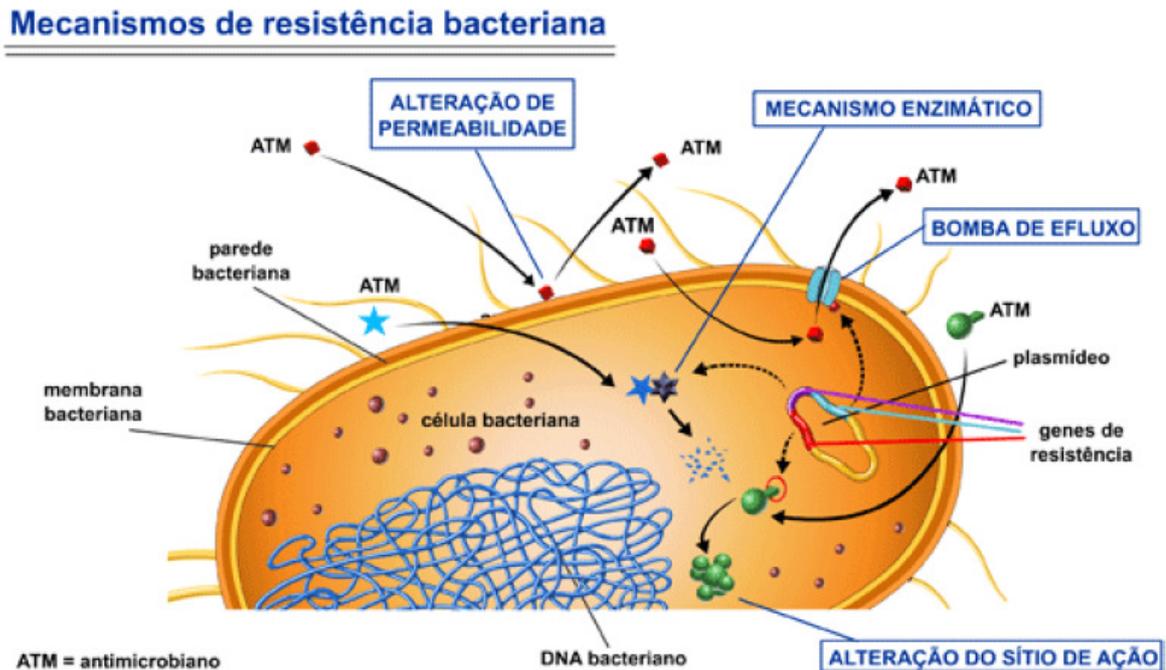


FIGURA 2 – Mecanismo de resistência bacteriana

Fonte: DE MATTOS, 2013.

4.3. Resistência de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos

Conforme Silva e Esteves (2017), os mecanismos mais comuns de resistência apresentados por *K. pneumoniae* estão relacionados à redução da permeabilidade da membrana, perda de porinas ou produção de enzimas β -lactamase, mencionados na **figura 2**. Por apresentar diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, as opções terapêuticas para o combate das infecções por esta bactéria, acabam ficando reduzidas, o que confere maior grau de morbimortalidade ao paciente que está acometido por essa bactéria.

É importante chamar a atenção para os desafios relacionados a descobertas de novos fármacos para tratamento de bactérias multirresistentes, o que aponta

fortemente para necessária diminuição do uso de antimicrobianos de forma indiscriminada e para prevenção de infecções (VERDI *et al.*, 2016).

4.3.1 Carbapenêmicos

Desde a descoberta da penicilina em 1928 até os anos de 1970 muitos antimicrobianos foram sintetizados e a maioria dos microrganismos com características patogênicas era suscetível a esses fármacos. Por volta de 1980 foram descobertas novas classes de fármacos entre elas os carbapenêmicos e os monobactâmicos (WHO, 2014, VERDI *et al.*, 2016).

Os carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem) pertencem à classe dos β -lactâmicos, antibacterianos de amplo espectro utilizados para tratar infecções causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Os antibióticos β -lactâmicos são caracterizados por possuírem anel β -lactâmico com uma cadeia lateral variada. Eles atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, através da hidrólise do anel β -lactâmico que quebra a ligação amida, um mecanismo que bloqueia a transpeptidação responsável pela união dos componentes individuais do peptidoglicano. Isolados clínicos identificados como agentes produtores de carbapenemases geralmente são resistentes à várias outras classes de antimicrobianos, desta forma a resistência a amicacina e a falta de difusão nos tecidos da tigeciclina são questões graves, fazendo com que a única possibilidade terapêutica real seja a polimixina B, que tem uma baixa difusão no tecido pulmonar e efeitos nefrotóxicos e neurotóxicos importantes. Ressalta-se a importância de não ser utilizada a monoterapia, para evitar a seleção de novas estirpes resistentes aos poucos antimicrobianos alternativos disponíveis (RECHENCHOSKI *et al.*, 2017). É oportuno chamar a atenção que no estudo realizado por Rechenchoski e colaboradores (2017), no qual investigaram a susceptibilidade de amostras de *K. pneumoniae* a carbapenêmicos, o ertapenem foi a droga contra a qual foi encontrado um maior percentual de resistência.

4.3.2 Carbapenemases

O surgimento das carbapenemases constitui uma grande ameaça ao sucesso do tratamento de infecções por drogas do grupo dos β -lactâmicos, decorrente de sua capacidade de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos, principalmente da classe dos

carbapenêmicos, prejudicando assim o tratamento das infecções bacterianas causadas pelas enterobactérias (GAVRONSKI, 2017).

Atualmente existem três grandes classes de carbapenemases (CUNHA, 2014):

- 1) MBL (Metallo β -lactamase), dos tipos IMP (resistentes ao Imipenem), VIM e NDM (New Delhi Metallo β -lactamase), encontradas principalmente em *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.*
- 2) OXA-carbapenemases, três subgrupos de carbapenemases de OXA adquiridas (tipo OXA-23, tipo OXA-24 e OXA-58) parece estar presente em *Acinetobacter spp.*, e um quarto subgrupo, OXA-51-like, que é intrínseco a *Acinetobacter baumannii*.
- 3) Carbapenemases tipo KPC diferenciada em KPC-1 a 3, com a seguinte descrição: KPC-1 em isolados de *Klebsiella pneumoniae*; KPC-2 em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter spp.*; KPC-3 em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*.

A enzima KPC foi isolada pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae* em 1996, na Carolina do Norte nos Estados Unidos, tendo seu primeiro relato de caso no Brasil no ano de 2005 (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012). Desde então sua disseminação vem crescendo, trazendo grandes preocupações para a saúde pública mundial (MEYER; PICOLI, 2011; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012), devido às dificuldades no tratamento, longos períodos de internação gerando elevados custos e altos índices de morbimortalidade.

Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase inibe a ação de vários antimicrobianos, tais como: as cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, levando a uma escassa opção terapêutica para o tratamento contra infecções por esta bactéria (SEIBERT *et al.*, 2014).

O gene **bla** KPC, que codifica a enzima responsável pela resistência aos carbapenêmicos, está em um plasmídeo móvel, que permite assim sua transmissão para outras linhagens bacterianas da mesma espécie ou de espécies diferentes (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012). A enzima já foi detectada em vários gêneros

e linhagens da família *Enterobacteriaceae*, além de linhagens de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., de isolados clínicos de infecções urinárias, pneumonias e septicemias. Entretanto o agente infeccioso mais comumente detectado com esta enzima é *K. pneumoniae* que está envolvida em altas taxas de morbimortalidade especialmente IRAS. Em estudo feito em um hospital de Porto Alegre (RS), a presença de *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos β -lactâmicos foi detectada em mais de 75% dos isolados clínicos. Um dado preocupante considerando a rotatividade de pacientes em estado crítico (MEYER; PICOLI, 2011).

4.4. Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções causadas por KPC

O quadro clínico sugestivo de infecção por KPC apresenta febre, taquicardia, piora nos quadros respiratórios, e nos quadros mais graves, hipotensão. O grupo de indivíduos mais acometidos por essa bactéria é composto por pacientes internados por longos períodos de tempo, que fazem uso prolongado de antimicrobianos, pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) com estado imunológico debilitado e os que são submetidos a procedimentos invasivos (SEIBERT *et al.*, 2014; GASPAR *et al.*, 2015). Estudos demonstram que a prevalência da infecção por KPC é maior em pacientes com faixa etária acima de 60 anos, de idade do sexo masculino (ALVES; BEHAR, 2013; SEIBERT *et al.*, 2014).

4.5. Métodos de pesquisa das infecções por KPC

A pesquisa pelo reconhecimento laboratorial de bacilos Gram-negativos produtores de KPC é importante para que seja possível detectar infecções graves por esses microrganismos, e dar início ao tratamento com terapia de escolha adequada, além de identificar os indivíduos portadores desta bactéria para medidas de controle da infecção (DE MELO, 2014).

O processo de identificação para o diagnóstico de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases é feito por meio de exames de comparação bioquímicos que conforme Moreira e Freire (2011) refletem as atividades metabólicas do isolado e os dados publicados por gêneros e espécies conhecidos, isso permite a identificação da família *Enterobacteriaceae*. Atualmente existem sistemas automatizados que permitem a identificação em 24 horas (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014.). Para a detecção da enzima KPC são utilizados métodos que reportem a resistência

aos antimicrobianos desta classe ou o gene que confere resistência à bactéria de interesse.

Pode-se destacar que quanto mais rápido a descoberta do tipo de infecção e da bactéria produtora de carbapenemase, maior eficácia se torna o tratamento. Os testes que possuem um melhor diagnóstico são o teste de Hodge modificado, microdiluição em caldo, E-test, disco-difusão e PCR.

4.5.1. Teste de Hodge modificado

O teste de Hodge modificado (MHT) é um teste para detecção de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*. Utilizada a partir de 2009 devido à grande disseminação proporcionada pelas bactérias multirresistentes, este teste possui uma elevada sensibilidade, maior que 90%, e a facilidade de execução. Entretanto, o teste é descrito por muitos autores como possuindo resultados inconsistentes (BARTH; RIBEIRO, 2012).

Este teste, segundo Zanol e Cantarelli (2016), é utilizado para inferir a presença de KPC em isolados que apresentem resistência a cefotaxima, ceftazidima e/ou ceftriaxona (cefalosporinas de 3^a geração) e sensibilidade diminuída a carbapenêmicos, relacionando o meropenem e ertapenem. Estes autores colocam que o teste de Hodge modificado “consiste em semear isolados de bactérias suspeitas de produzir KPC, de acordo com as normas da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)”. O teste é realizado como descrito a seguir: em uma placa contendo Ágar Muller Hinton semear a linhagem *E. coli* ATCC 25922, sabidamente sensível, formando um tapete sobre toda a placa. No centro colocar um disco de carbapenêmico (imipenem, meropenem ou ertapenem de 10µg) e fazer uma estria de cada lado da placa com a linhagem que se pretende testar, até o final da placa, sem encostar no disco. Fazer da mesma forma com a linhagem controle negativo de *K. pneumoniae* ATCC 700603. O teste será positivo indicando a presença da enzima KPC quando houver distorção do halo de inibição como mostra na **figura 3**.

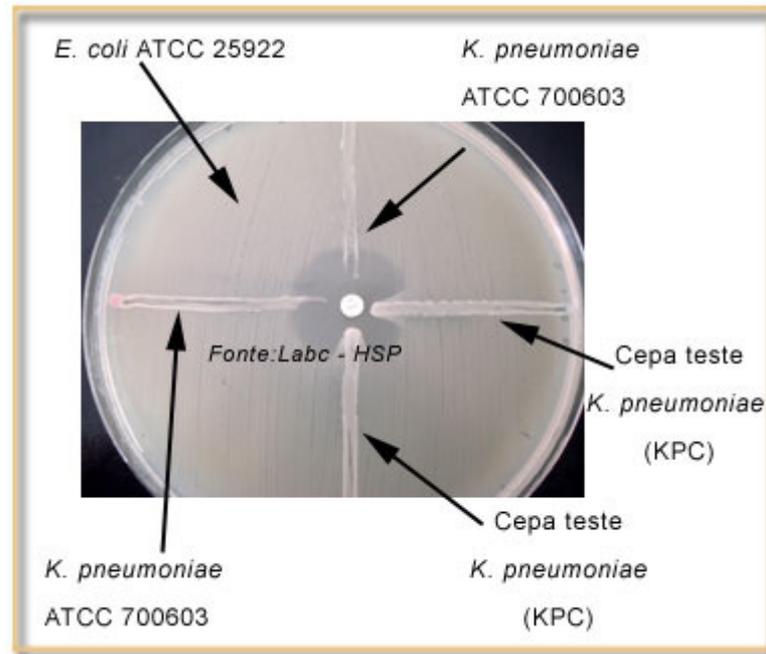


Figura 3 – Teste de Hodge modificado

(Fonte: <http://www.biomedicinaemacao.com.br/2013/06/teste-de-hodge-verificacao-de-bacterias.html>)

Oplustil *et al.* (2010) relatam que este teste verifica apenas a descoberta da resistência bacteriana a carbapenêmicos e não indica o tipo de mecanismo apresentado.

4.5.2. Microdiluição em caldo

O teste consiste na utilização de uma placa de microdiluição com 96 poços, descartável e estéril. A suspensão preparada para o teste deve ser duas vezes a concentração da droga, sendo diluída 1:2 enquanto são dispensadas em fileiras de 1 a 10 das placas de microdiluição utilizando-se uma pipeta multicanal em volumes de 100µL. Estas fileiras devem conter maior concentração da droga na primeira (16µg/ml) e na última fileira a menor concentração da droga (0,12 ou 0,03µg/ml). Estas placas podem ser armazenadas em temperatura de -70 °C, colocadas em filme plástico e em saco plástico, podendo ficar por um período de até 6 meses sem deterioração da droga (CUNHA, 2014).

Conforme descrito pela ANVISA (2013) a microdiluição em caldo tem vantagem de utilizar a placa, onde pode-se testar a bactéria e assim utilizar uma variedade de antimicrobianos, preconizado em torno de 12 drogas de distintas concentrações.

4.5.3. E-test

Trata-se de um teste realizado com uma fita plástica contendo em uma de suas faces doses decrescentes do antimicrobiano. Esta fita é posta sobre uma placa de ágar semeado com a amostra teste na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml 15 min após a semeadura. Após o período de incubação observa-se a concentração inibitória mínima (CIM), que é determinada pelo ponto de interseção entre a fita do E-test e a zona de inibição do crescimento do microrganismo, como verifica-se na **figura 4** (GIRLICH *et al.*, 2013).

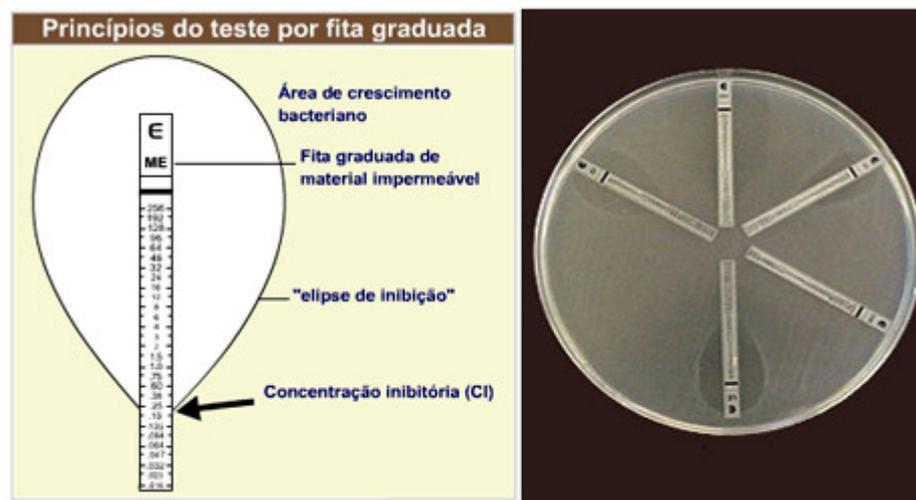


Figura 4 – Fita de E-test
Fonte: Anvisa, 2013.

A ANVISA (2013) estabelece que uma placa de 150mm de diâmetro deve-se aplicar no máximo cinco fitas e no diâmetro de 90 mm duas fitas.

4.5.4. Disco-difusão

A identificação laboratorial de isolados clínicos produtores de KPC é crítica para limitar a disseminação da resistência a drogas. Embora sejam adequados para a avaliação de grande número de amostras clínicas, os sistemas automatizados de teste de susceptibilidade para detectar a resistência mediada por KPC tem apresentado limitações em alguns casos. Como alternativa, o teste de disco difusão consiste em um dos métodos mais utilizados e tratando-se de um dos mais simples e mais confiáveis no que se refere ao diagnóstico (ANVISA, 2013).

A técnica do disco-difusão, segundo Maciel e De Matos (2013), consiste na semeadura do inóculo bacteriano na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml em Ágar Muller Hilton. Sobre este inóculo são colocados os discos de papel filtro contendo os diferentes antimicrobianos em concentrações padronizadas. Para placas de 150mm de diâmetro devem ser postos no máximo 12 discos e em uma placa de 90mm, 5 discos. Estas placas devem ser incubadas por 18 a 24 horas na temperatura de 34,5 a 36,5 ou a 5%-7% de CO₂. Na técnica de disco-difusão são mensurados os halos conforme a sensibilidade da amostra ao antimicrobiano e a velocidade de difusão no ágar. A partir desta mensuração utilizam-se os critérios estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) que serão específicos para a bactéria pesquisada.

4.5.5. Reação em cadeia da polimerase

A detecção da KPC por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método rápido e preciso, pois é sensível e altamente específico como é descrito por Cotrim, Rocha e Ferreira (2012). Este teste é feito utilizando iniciadores específicos para os genes *blaKPC*, *blaKPC2* ou *blaKPC3* para a identificação de amostras portadoras dos genes. São utilizados isolados tanto de colônias bacterianas ou espécimes clínicos. Trata-se de um teste com resultados disponíveis mais rapidamente quando comparados a culturas *in vitro* (MACIEL; DE MATOS, 2013). O exame molecular é muito importante para diferenciar carbapenemase tipo KPC das outras como MBL e OXA-carbapenemases. Como ponto negativo desta metodologia, Cunha (2014) chama a atenção para o fato de que apenas algumas variações poderiam se distinguidas, por possuir limitações para uma PCR multiplex, além do custo elevado.

4.6. Tratamento das infecções por KPC

As infecções causadas por KPC são de difícil tratamento, pois esta bactéria é resistente a 95% dos antimicrobianos.

Esta bactéria pode hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos, promovendo assim uma resistência ampliada a alguns antimicrobianos conforme descrito anteriormente (SILVA, ESTEVES, 2017).

Guimarães e Vieira (2013) descrevem que no Brasil ainda são utilizadas como forma de tratamento a polimixina e a tigeclina. Um estudo realizado por Seibert e colaboradores (2014) observou uma alta sensibilidade aos aminoglicosídeos como a amicacina e tetraciclina.

A Nota Técnica nº 01/2013 da ANVISA estabelece a terapia empírica que está relacionada à terapêutica para bactérias multirresistentes e corroboram Guimarães e Vieira (2013) no uso da polimixina B ou E, mas com associação com um ou mais outros tipos de antimicrobianos, podendo ser aminoglicosídeos, carbapenêmicos e tigeclina. Quando é estabelecido o perfil de sensibilidade realiza-se uma adequação do tratamento que vai se basear em manter no mínimo dois fármacos com sensibilidade comprovada *in vitro*.

4.7. Métodos de controle e prevenção da infecção por KPC

O laboratório de microbiologia juntamente com a CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar) de cada hospital tem um papel de suma importância para o controle e prevenção das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase, de modo que minimize sua disseminação. Deve haver uma comunicação direta destes dois setores, para que as medidas possam ser tomadas em casos de suspeita ou confirmação dos casos e para notificação ao órgão responsável. As linhagens suspeitas de resistência aos carbapenêmicos e envolvidas em surtos deverão ser enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de cada região para confirmação por método molecular (NOTA TÉCNICA ANVISA, 2013).

Dentre as medidas de controle e prevenção podemos citar as orientações da ANVISA:

- Uma das formas mais frequentes de propagação do microrganismo no ambiente hospitalar está ligada a má higienização das mãos do profissional de saúde, visitantes e acompanhantes que lidam diretamente com o paciente colonizado/infectado, transportando aquele agente infeccioso para outros pacientes. Em vista disso, todos devem ser treinados quanto à técnica de lavagem das mãos antes e após contato com o paciente ou amostras biológicas do mesmo.

- Conforme RDC N° 42/2010, além de água e sabão, deve ser disponibilizado insumos a base de álcool para correta higienização das mãos nos serviços de saúde.
- O uso de equipamentos e proteção individual (EPI) como avental, luvas, óculos de proteção e máscara é de suma importância no manejo dos pacientes, para evitar o contato direto com o mesmo. No caso de precaução de contato deve-se utilizar equipamentos exclusivos para aquele paciente.
- Paciente com suspeita ou confirmação de infecção por bactérias multirresistentes devem ser mantidos em precaução de contato, onde somente o profissional de saúde pode ter acesso, evitando assim a disseminação a outros pacientes. Culturas de vigilância devem ser coletadas na admissão e no decorrer do período de internação do paciente para monitoramento.
- Terapias empíricas devem ser adotadas nos casos de suspeita da infecção, utilizando sempre administrações combinadas de polimixina B ou E (colistina) com um ou dois antibióticos de outra classe, até que o laudo do teste de susceptibilidade aos antibacterianos seja liberado pelo laboratório de microbiologia.
- Padronizar e disponibilizar o procedimento escrito sobre medidas de higiene do ambiente hospitalar aos colaboradores da instituição.
- Implementar o uso restrito de terapias com algumas classes de antimicrobianos susceptíveis a seleção de microrganismos resistentes, como fluoroquinolonas, as cefalosporinas de terceira geração e os carbapenêmicos.

5. CONCLUSÃO

O conhecimento sobre *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase, e sobre os métodos de diagnóstico, tratamento e medidas de prevenção e controle relacionados às infecções por esta bactéria é importante, uma vez que a presença da enzima carbapenemase leva à resistência a vários antimicrobianos, em especial aos carbapenêmicos. A relevância de estudos sobre estes microrganismos está relacionada à necessidade de se buscar uma forma de limitação de sua disseminação permitindo um melhor controle nos índices de morbidade e mortalidade, aspecto de alta relevância nas infecções nosocomiais.

A eliminação de *Klebsiella pneumoniae* resistente à carbapenemase é determinante para barrar a disseminação de genes que conferem resistência aos carbapenêmicos.

A resistência a antimicrobianos aumentada reflete a grande capacidade que as bactérias possuem de se adaptar a diversas condições utilizando diferentes mecanismos de ação no desenvolvimento de resistência a drogas. À medida que bactérias vão apresentando resistência aos antimicrobianos mais utilizados, novos fármacos são produzidos buscando combater os microrganismos. Entretanto, discute-se que no futuro pode não haver antimicrobianos disponíveis para o combate a determinadas bactérias. Dentro desta linha de conhecimento, fica evidente a importância do diagnóstico correto para a identificação de linhagens resistentes às drogas e conseqüentemente para a instituição do tratamento adequado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, Anelise Pezzi; BEHAR, Paulo Renato Petersen. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. *Rev. AMRIGS*.57(3). 213-8. 2013.
- ANVISA. Nota Técnica N. 1/2013: Medidas de prevenção e controle de Infecções por enterobactérias multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF 17 de abril de 2013.
- ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) N° 42. Dispõe sobre a obrigatoriedade de disponibilização de preparação alcoólica para fricção antisséptica das mãos, pelos serviços de saúde do país e dá outras providências. Brasília, DF. Diário Oficial da União de 26 de outubro de 2010.
- BARTH, Afonso Luís; RIBEIRO, Vanessa Bley. 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
- BIBERG, Camila Arguelo *et al.* KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwestregion of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 2. 501-504 p. 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Protocolo para a prática de higiene das mãos em serviços de saúde. Brasília, DF: Anvisa; 2013.
- CABRAL, Adriane Borges. Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos beta-lactâmicos de ultima geração provenientes de Recife/PE. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco. 2011.
- COTRIM, Érica Ribeiro; ROCHA, Roberta D. Rodrigues; FERREIRA, Mônica de F. Ribeiro. KLEBSIELLA PNEUMONIAE CARBAPENEMASE – KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. *Rev. Do Centro Universitário Newton Paiva*. 5. ed. 2012
- CHANG, Marilene Rodrigues *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* 46(1). 114-115 p. Jan-Feb, 2013.
- CUNHA, Vinicius de Oliveira. Bactérias multirresistentes *Klebsiella pneumoniae* carbanemase – Enzima KPC nas infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). Monografia. 2014. Universidade Federal de Minas Gerais.
- DE MELO, Fernanda Maciel. O teste de Hodge Modificado – Avaliação de enterobacterias sensíveis a carbapenêmicos. Monografia. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Ribeirão Preto. 2014.
- GASPAR, Gilberto Gambero *et al.* Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(4):483-487 p. Jul-Aug, 2015.
- GAVRONSKI, Suellen *et al.* Investigação da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em um hospital de Blumenau/SC: detecção laboratorial e aspectos epidemiológicos. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. 2017.

GIRLICH, Delphine *et al.* Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 77, n. 3, p. 200-201, 2013.

GUIMARÃES, P.D.C ; VIEIRA, F.O. A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): Bacterias multirresistentes. Centro Universitario Metodista Izabela Hendrix. Acervo da Iniciação Científica. n.2 2013.

LIMA, Marcos Resende Sousa *et al.* Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 23, n. 1, p. 177-182, 2014.

MACIEL, Bruna Calil; DE MATTOS, Liliana Patricia Vital. A BACTERIA MULTIRRESISTENTE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CARBAPENAMASE (KPC). Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753), v. 1, n. 2, 2013.

MARQUES, Jaciane B. *et al.* Molecular characterization of *Enterobacteriaceae* resistant to carbapenem antimicrobials. J Bras Patol Med Lab, v. 51, n. 3, p. 162-165, June 2015.

MELO, A.C.R. Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores e não produtores de KPC: relação com a presença dos genes de virulência *fimH*, *mrkD*, E *irp2*. Dissertação apresentada no programa de pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco. 2013.

MEYER, Gabriela; PICOLI, Simone Ulrich. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. J Bras Patol Med Lab. V. 47. n. 1. 25-31 p. Fevereiro de 2011.

MOREIRA, Vanessa Carvalho; FREIRE, Daniel. *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos. Trabalho de conclusão do curso de pós-graduação em Vigilância Sanitária, pela Universidade Católica de Goiás. 2011.

MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER. Microbiologia Médica. 7ª ed. Elsevier: 2014. Acesso em: 13 de fevereiro de 2018.

NAVARRO, Aida Oliveiros *et al.* Bacteriemia por enterobacterias resistentes a carbapenemicos. Un estudio transversal. Revista Infectio. 60-66 p. 2015.

OLIVEIRA, Anna Laiza Davila *et al.* MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS NA INFECÇÃO URINÁRIA. Revista Uningá Review. Vol.20,n.3,pp.65-71 Out - Dez 2014.

OPLUSTIL, CP; ZOCCOLI, CM; TOBOUTI, NR; SINTO, SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3ª ed. São Paulo: SARVIER, 2010.

PITOUT, Johann D. D.; NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Setfor Global Nosocomial Dominance. Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy. V.59 n. 10. October 2015.

RECHENCHOSKI, Daniele Zandrini *et al.* Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacter spp. Isolates. Brazilian journal of microbiology. 509-514 p. 2017.

SEIBERT, Gabriela *et al.* Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. Journal Ainsten. V 12. N 13. São Paulo July/Sept. 2014

SILVA, Thays Viana da; ESTEVES, Deigilam Cestari. Infecção hospitalar: a emergência de *Klebsiella pneumoniae*. Revista conexão eletrônica. Três Lagoas/RS. v.14, n.1. 2017.

TAPIA, Carolina *et al.* BACILOS GRAM NEGATIVOS: ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA. Universidade de Valparaíso Chile, San Felipe, 23 de Diciembre de 2011.

VERDI, Camila Marina *et al.* DETECÇÃO LABORATORIAL DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: UMA REVISÃO. REVISTA SAÚDE INTEGRADA, v. 9, n. 17, p. 16-27, 2016.

ZANOL, Franciele Maria. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): um mecanismo de resistência emergente. SUPLEMENTO ESPECIAL DE MICROBIOLOGIA E MICOLOGIA, v. 48, n. 3 supl 1, p. 4-9, 2016.