



XII Salão de
Iniciação
Científica
PUCRS

Detecção de genes de resistência em cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* Spp.
resistentes ao ertapenem isoladas de infecções em dois Hospitais de Porto
Alegre/RS

Bruna Chagas Medeiros¹⁻², Mariluce da R. Jaskulski², Michelle Domingues², Vanessa Esteves², Daniel
Marinowicz², Denise Cantarelli Machado².

¹Faculdade de Fisioterapia, PUCRS

²Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS

Resumo: A emergência e disseminação dos mecanismos de resistência em bacilos Gram-negativos têm complicado o tratamento de sérias infecções nosocomiais. Devido à ineficácia dos sistemas automatizados na detecção de isolados produtores de KPC (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase) há a necessidade do desenvolvimento de melhores metodologias. Uma possibilidade é avaliar os isolados quanto à resistência ao ertapenem, o qual tem maior sensibilidade para detectar a expressão dos isolados produtores de KPC. Contudo, a especificidade pode ser reduzida devido a resistência conferida por outros mecanismos, tais como AmpC ou a produção de ESBL associado a perda de porina. (Castanheira, 2007)

A *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno nosocomial frequente, sendo a décima quarta e décima quinta causa de pneumonia e bacteremia, respectivamente, em unidades de cuidados intensivos de pacientes (Bratu S, 2005). O *Enterobacter* spp. é o terceiro patógeno mais comum causador de pneumonia e o quinto patógeno mais comum causador de septicemia e infecções em sítios cirúrgicos em pacientes internados em centros de tratamentos intensivos nos Estados Unidos. (Weber DJ, 1999)

O presente estudo consistiu na aplicação de métodos fenotípicos e genotípicos para a detecção dos genes de resistência em *Klebsiella* spp. produtora de ESBL e *Enterobacter* spp. visando contribuir na detecção destes patógenos em laboratórios clínicos, assim como sua aplicação no uso racional de antimicrobianos e estudos epidemiológicos.

Metodologia

O estudo foi realizado com amostras clínicas de pacientes internados no Hospital São Lucas da Universidade Pontifícia do Rio Grande do Sul e do Hospital Nossa Senhora da

Conceição, localizados em Porto Alegre/RS. Trata-se de um estudo retrospectivo experimental onde foram incluídas 128 amostras de bacilos Gram-negativos representantes do gênero *Klebsiella* spp. produtores de ESBL e de *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem. Os testes de suscetibilidade foram confirmados através da metodologia de E-test e disco difusão, para posterior pesquisa dos genes de resistência através da técnica da Reação de polimerase em cadeia PCR.

A extração de DNA procariótico foi realizada utilizando um protocolo com Proteinase K (20mg/mL). Após incubação a 55°C por 3 horas a amostra foi tratada com Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico e centrifugada. O DNA foi precipitado pela adição de 800 µL de isopropanol gelado e 180 µL de NaOAc 3M pH 5,2, colocada a 20°C por pelo menos 2 horas e após centrifugada. O precipitado de DNA foi ressuspensão com 50 µL de água MilliQ e armazenado à -20°C até ser utilizado.

O método da reação em cadeia da polimerase para verificar a detecção dos genes de resistência dos microrganismos *Klebsiella pneumoniae* que foram produtores de ESBL resistentes ao ertapenem e *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem foram submetidos aos testes moleculares e pesquisados respectivamente os genes e porinas *blaKPC*, *blaTEM*, *blaSHV*, *bla-CTX-M*, *blaCTX-M-2*, e *blaKPC*, com os seguintes reagentes: 1 µL de DNA, 1µL de dNTPs, 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL cada *primer*, 1 µL de MgCl₂ e água destilada estéril para um volume final de 25 µL. Foram incluídos, em cada série de PCR, controles positivos, negativos e uma mistura de reação que não contém DNA. Todas as reações da PCR foram submetidas a trinta ciclos, um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos em termociclador (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler). Os resultados foram obtidos através da eletroforese em gel de agarose 2% contendo 2µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM pH 8,0) a 100 volts por 30 minutos. Finalmente, os produtos da PCR foram visualizados sob luz ultravioleta.

Resultados

Das 128 amostras de bacilos Gram-negativos representantes do gênero *Klebsiella* spp. produtores de ESBL e de *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem analisadas, 14 amostras (10,9%) foram positivas para o gene *blaKPC* (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase). Os isolados com resistência plena e intermediária ao ertapenem foram

submetidos aos testes moleculares e pesquisados os genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaCTX-M-2* para *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL (n=17). Dessas, o gene *blaTEM* foi detectado em nove (52,9%), das quais quatro amostras (23,5%) também carregavam *blaSHV* e duas amostras (11,7%) *blaCTXM-2*. . Uma amostra (5,8%) apresentou *blaSHV* associado com *blaCTXM-2* e foi detectado somente *blaCTXM-2* em uma amostra (5,8%).

Conclusão

A detecção de genes de resistência em isolados produtores de carbapenemases pode estar associado a diversos mecanismos de resistência, contribuindo para falha terapêutica, necessitando estratégias de vigilância.

Referências

Castanheira M, Mendes ER, Rhomberg RP, Jones NR. Rapid emergence of *bla*_{CTX-M} among *Enterobacteriaceae* in U.S. medical centers: molecular evaluation from the Mystic Program (2007). Microb Drug Resist 2008a; 14 (3): 211-6.

Bratu S, Landman D, Haag Robin, Recco R, Eramo A, Alam M, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York city. Arch Intern Med 2005a; (165): 1430-5.

Weber DJ, Raasch R, Rutala WA. Nosocomial infections in the ICU. The growing importance of antibiotic-resistance pathogens. Chest 1999; (115):34S-41S.

Souli M et al. *In vitro* activity of tigecycline against multiple drug resistant including panresistant Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals Antimicrob Agents Chemother 2006;50(9):3166-9.

Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim KA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; (7):88-91.