

Resistência à polimixina em isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemase

Autores:

João Carlos Cavalcanti de Albuquerque Junior

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife

Igor Vasconcelos Rocha

Doutor em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz-PE, Recife

Carlos Alberto das Neves de Andrade

Mestre em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz-PE, Recife

DOI: 10.58203/Licuri.21717

Como citar este capítulo:

ALBUQUERQUE JUNIO, João Carlos Cavalcanti; ROCHA, Igor Vasconcelos; ANDRADE, Carlos Alberto das Neves. Resistência à polimixina em isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemase. In: ANDRADE, Jaily Kerller Batista (Org.). **Desafios globais, soluções locais: Avanços em Ciências Agrárias e Ambientais**. Campina Grande: Licuri, 2023, p. 64-74.

ISBN: 978-65-85562-17-1

Resumo

A terapia antimicrobiana é um dos componentes essenciais para a prática médica e o pilar para a intervenção clínica em pacientes acometidos por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Isolados de *Klebsiella pneumoniae* fazem parte da microbiota, mas que podem provocar doenças em casos de imunossupressão do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana às polimixinas em isolado de *K. pneumoniae* produtor de carbapenemase proveniente de amostra clínica de paciente assistido em um hospital terciário de Recife-PE. Para determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram utilizadas as técnicas *Drop Test* e Polimixina NP. Os principais genes de resistência aos carbapenêmicos foram investigados pela técnica de PCR e identificados por sequenciamento de DNA. Os resultados revelaram fenótipo variável de resistência às polimixinas no isolado avaliado, indicando a presença de heterorresistência de baixo nível. O ensaio molecular de transferência interespecífica demonstrou a presença de elemento móvel no isolado. Os ensaios de PCR revelaram a presença do gene *bla_{KPC}*. A presença de isolados *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e polimixinas em amostras clínicas de pacientes hospitalizados reforça a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para combater a ameaça da resistência aos antimicrobianos de última linha e também a necessidade de fomentar estudos de epidemiologia molecular para compreender esses mecanismos genéticos de resistência antimicrobiana com baixos níveis de expressão.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Infecções Relacionadas à Saúde Assistencial (IRAS). KPC-2. Antibioticoterapia. Heterorresistência.

INTRODUÇÃO

A notável adaptabilidade dos isolados bacterianos da família Enterobacteriaceae é equiparada apenas pela sua patogenicidade em humanos e animais. Embora essas bactérias tenham uma presença ampla na natureza e colonizem uma variedade de hospedeiros, também são agentes causadores de infecções graves. Entre as várias espécies pertencentes a essa família, a *K. pneumoniae* se destaca como a principal Enterobactéria multirresistente em âmbito global nos últimos anos (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2022).

No âmbito das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), essa espécie se destaca devido à sua prevalência e habilidade em desenvolver resistência. Sua presença eleva os índices de mortalidade em aproximadamente 35% quando associada a Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2022).

Nesse contexto, a propagação de isolados de *K. pneumoniae* com resistência concomitante a carbapenêmicos e polimixinas (PR-CRKP), duas classes primordiais de antimicrobianos na prática médica, se apresenta como uma ameaça substancial à saúde pública (MARR; RUSSO, 2019). Isso é particularmente preocupante em nações em desenvolvimento, onde o acesso a tratamentos inovadores ainda é restrito (AYANDELE et al., 2020).

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos nesses isolados é a produção de carbapenemases, enzimas que também desativam outras classes de antimicrobianos betalactâmicos (RUSSO, 2023). A resistência à polimixina, um antimicrobiano de reserva crucial para tratar infecções ocasionadas por isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (CR-KPN), está diretamente relacionada à incorporação de genes *mcr* (*mobile colistin resistance*) e mutações no material genético da bactéria, resultando no surgimento de padrões de resistência Extensiva (XDR) e Pan resistência (PDR) entre os isolados de *K. pneumoniae* (LI et al., 2023).

O aumento progressivo da ocorrência de isolados de *K. pneumoniae* resistentes tanto a carbapenêmicos quanto a polimixinas (PR-CRKP) está resultando em um aumento dos custos, prolongamento do tempo de internação, aumento da toxicidade e agravamento da gravidade das infecções relacionadas à assistência à saúde, tendo um impacto significativo na morbimortalidade (CORREA, 2022). Aliado a isto, a dificuldade

de diagnóstico desses isolados tem se mostrado um fator preocupante nos laboratórios de microbiologia, principalmente em casos de baixo nível de resistência às polimixinas (ou seja, 13 MIC entre 4-16 µg/mL), pois estes isolados estão sendo apontados como a causa principal de disseminação da resistência por mecanismos de plasmídeo e também por gene *mcr* (LAI et al, 2018). Diante disto, o escasso arsenal de métodos de detecção associado a falta de recursos para otimizar os métodos conhecidos torna o cenário ainda mais preocupante.

O presente trabalho foi conduzido para avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana à polimixina em isolado de *K. pneumoniae* produtor de carbapenemase obtido a partir de amostra clínica de paciente assistido em Hospital Terciário do Recife-PE. A análise desses perfis de resistência pode contribuir para aprimorar programas de vigilância epidemiológica e ajudar a estabelecer novos patógenos de prioridade crítica dentro de uma perspectiva de saúde pública.

METODOLOGIA

Isolado clínico

O isolado clínico de *K. pneumoniae* foi obtido a partir de amostra de urocultura de paciente assistido em um hospital terciário de Recife-PE em janeiro de 2023. A identificação das espécies bacterianas e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana foram primariamente determinados no laboratório de Microbiologia Clínica do próprio hospital, através de provas bioquímicas fenotípicas de rotina e por meio de metodologia automatizada, Vitek® 2 (bioMérieux). O isolado clínico foi coletado da rotina do laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital e armazenado em meio LB suplementado com 15% de glicerol à temperatura de 80 °C negativos. As subculturas foram posteriormente realizadas em meio de cultura LB (Luria-Bertani) e/ou Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas para seguimento das etapas subsequentes deste estudo.

Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) para a polimixina B e meropenem foi avaliada por microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do BrCAST

(*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Para isto, o inóculo bacteriano foi preparado pela técnica de suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo ágar Müller-Hinton (Himedia) em 1 mL de Caldo Müller-Hinton Cátion-ajustado (CA-MHB) estéril até uma densidade óptica (OD) 625_{nm} de 0,08 - 0,13 UA, determinada em espectrofotômetro UV 1101 Biotech Photometer (WPA), correspondente a 0,5 da escala de McFarland ou $1-5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa suspensão foi subsequentemente diluída 1:1000 em CA-MHB em volume suficiente para inoculação dos poços da placa de microdiluição. Um volume de 50 μ L desta última diluição foi inoculado simultaneamente com o auxílio de pipetador automático multicanal em cada poço da placa previamente confeccionada, de modo que, ao final dessa etapa, cada poço contivesse um volume final de 100 μ L, contendo a concentração final desejada para cada antimicrobiano e uma densidade celular bacteriana de cerca de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. Para avaliar a possibilidade de interferência do plástico no resultado do ensaio de microdiluição em caldo, o experimento foi realizado em placa de 96 poços de Poliestireno não tratada (placa hidrofóbica) e tratada (placa hidrofílica).

Como controle positivo do crescimento bacteriano foram inoculados poços contendo CA-MHB livre de antimicrobianos e, como controle negativo de crescimento foram reservados poços contendo apenas CA-MHB, sem inoculação. Após inoculação, as placas de microdiluição foram incubadas por 18-24 horas, a 35 ± 2 °C e após esse período, inspecionadas visualmente após adição de resazurina para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A resistência à colistina também foi avaliada por *Drop Test* e Polimixina NP. No primeiro, 10 μ L de Colistina (16 μ g/mL) foi adicionado ao meio ágar Muller Hinton previamente inoculado com o isolado clínico selecionado para este estudo (ajustado a uma densidade de 0,5 na escala nefelométrica de McFarland). A placa permaneceu em repouso a temperatura ambiente para secagem da gota de antimicrobiano e posteriormente incubada a 37°C por 24h para leitura visual para verificar a formação ou não de zona de clareamento (sensibilidade).

O teste de Polimixina NP foi conduzido conforme protocolo estabelecido por Nordmann, Jayol e Poirel (2016). Para isto, uma suspensão do isolado de *K. pneumoniae* foi ajustada em uma placa de 96 poços (poliestireno) a uma concentração de 10^8 CFU/mL em uma solução contendo glicose anidra a 1%, 0,005% de vermelho de fenol e 3,75 μ g/mL de colistina, sendo incubado por duas 2h a 37°C. Após esse período, a placa

de 96 poços foi analisada para verificar a produção de ácido (coloração amarelada) pelo isolado avaliado (critério de resistência).

Os testes de sensibilidade a ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, meropenem, amicacina, gentamicina, ertapenem, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol foram determinados por metodologia automatizada em Vitek® 2 Compact (bioMérieux), seguindo o fluxo de rotina do laboratório de Microbiologia Clínica do hospital, utilizando-se os painéis de ID/AST.

Teste fenotípico de detecção enzimática das principais carbapenemases de interesse clínico

O teste fenotípico de detecção enzimática foi realizado a partir da utilização do *NG-Test CARBA 5* (Laborclin), ao qual são imobilizados anticorpos monoclonais de ratos dirigidos contra KPC (K), OXA (O), VIM (V), IMP (I), e NDM (N) em zonas de teste de membrana de nitrocelulose designadas por K, O, V, I, e N. O ensaio foi realizado a partir da aplicação de uma suspensão do inóculo do isolado-teste no poço do cassete.

Resumidamente, a amostra migra através do bloco conjugado e caso estejam presentes, as carbapenemases reagem com os anticorpos monoclonais anti-carbapenemases marcados. O complexo migra através da membrana de nitrocelulose via capilaridade e interage com os anticorpos monoclonais anti-carbapenemases correspondentes, imobilizados na membrana. A linha de controle C, é formada por estreptavidina marcada e anticorpos monoclonais que reagem com biotina-BSA e anticorpos policlonais de cabra e anti-rato, imobilizados na membrana. Caso a amostra seja positiva para uma ou para várias carbapenemases, irá aparecer uma linha vermelha na(s) zona(s) de teste e na zona controle da membrana. Caso contrário, apenas irá aparecer uma linha vermelha na zona do controle.

Detecção dos principais determinantes genéticos de resistência aos carbapenêmicos.

Foram conduzidos testes para identificar os principais genes associados à resistência aos carbapenêmicos, visando confirmar os resultados dos testes fenotípicos que detectam as principais carbapenemases de relevância clínica. Além disso, a análise teve o objetivo de verificar a possível existência de genes que codificam outras betalactamases de importância clínica, que não são abordadas nos testes fenotípicos.

Para esse propósito, o DNA total foi extraído do isolado utilizando o kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit da Qiagen, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do kit.

O DNA foi quantificado através do equipamento *NanoDrop 2000C* e estocado a -20°C , sendo posteriormente diluído para concentração de uso. A pesquisa dos principais determinantes genéticos de resistência foi realizada por PCR, em reações individuais com volume final de 25 μL , contendo tampão para PCR (Invitrogen), MgCl_2 (Invitrogen), 1U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2,5 mM de dNTP's (Invitrogen), além das sequências iniciadoras dos genes de *K. pneumoniae* carbapenemase KPC-F (5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3') e KPC-R (5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'); New Delhi metalobetalactamase NDM-F (5'-CTGAGCACCGCATTAGCC-3') e NDM-R (5'-GGGCCGTATGAGTGATTGC-3'); Brazilian *Klebsiella* carbapenemase BKC-F (5'-ACATAATCTCGCAACGGGCG-3') e BKC-R (5'-TCGCCGGTCTTGTTTCATCAC-3'); Imipenemase IMP-F (5'-GAATAGAATGGTAACTCTC-3') e IMP-R (5'-CCAAACCACTAGGTTATC-3'); São Paulo metalobetalactamase SPM-F (5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3') e SPM-R (5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'); e Verona imipenemase VIM-F (5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3') e VIM-R (5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'), a 10 mM cada. As reações foram realizadas em termociclador *GeneAmp 9700* (Applied Biosystems) iniciando a partir de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos, finalizando por um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, por 45 minutos a 120V e posteriormente visualizados sob luz UV em transiluminador.

Os *amplicons* visualizados em gel de agarose foram então excisados com o auxílio de um bisturi estéril e purificados utilizando o *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, sendo posteriormente submetidos ao sequenciamento de DNA por metodologia de Sanger. As sequências de nucleotídeos foram visualizadas e tratadas utilizando o *software Chromas* (Technelysium Pty Ltd) e alinhados com sequências disponíveis no NCBI utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), sendo visualizadas pelo *BioEdit 7.2* (Informer Technologies, Inc.).

Avaliação da capacidade de transferência interespecífica dos mecanismos de resistência às polimixinas

A avaliação da capacidade de transferência dos genes de resistência foi realizada com o intuito de determinar se o microrganismo era detentor de mecanismos móveis de resistência. Resumidamente, o DNA plasmidial da *K. pneumoniae* foi extraído a partir de uma cultura de 2 ml do isolado, utilizando o *Plasmid DNA Isolation kit* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi então transformado em células de *Escherichia coli* quimiocompetentes, em banho-maria a 42 °C por 30 segundos.

As células transformantes foram semeadas em placas de Petri contendo ágar cromogênico acrescido de 2 µg/mL de polimixinas B e/ou 16 µg/mL de meropenem, sendo incubadas a 37 °C por 16 horas para inspeção visual de crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do perfil de sensibilidade do isolado de *K. pneumoniae* deste estudo demonstrou elevada resistência à ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, meropenem, amicacina, gentamicina, ertapenem, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, conforme evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1. Teste fenotípico de resistência de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos.

Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
Ampicilina-Sulbactam	≥32	Amicacina	≥32
Piperacilina-Tazobactam	≥128	Gentamicina	≥16
ceftriaxona	≥64	Ertapenem	≥1
ceftazidima	≥64	Azitromicina	≥64
Cefepime	≥64	Ciprofloxacina	≥4
Meropenem	≥32	Trimetoprim-Sulfametoxazol	≥32

Todos os testes fenotípicos realizados foram capazes de detectar a resistência à polimixina B no isolado. No teste de microdiluição, o isolado demonstrou resistência com valores de CIM variando entre 2 e 8 µg/mL. Essa variação, que abrangeu tanto faixas de sensibilidade (2 µg/mL) quanto de resistência (8 µg/mL) ao fármaco, indica uma forma de resistência de baixo nível não consistente.

Os experimentos conduzidos em placas tratadas (hidrofílicas) e não tratadas (hidrofóbicas) exibiram resultados idênticos, sugerindo que não houve influência de uma possível interação entre o antimicrobiano e o material plástico das placas usadas nos ensaios.

Vale ressaltar que o teste também revelou a presença de padrões de "skipped wells", ou seja, poços nos quais não ocorreu crescimento bacteriano, contrastando com poços que continham concentrações mais elevadas de antimicrobianos, onde o crescimento foi observado (Figura 1, poços A5 e A7), indicando a presença de heterorresistência às polimixinas.

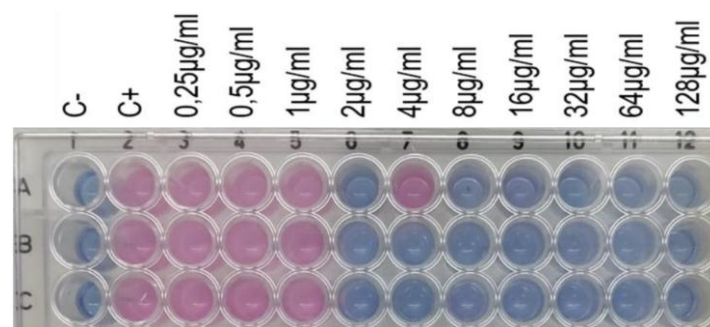


Figura 1. Teste de microdiluição em caldo realizado com diferentes concentrações de polimixina B. Legenda: Em azul, poços sem crescimento bacteriano, indicando susceptibilidade à polimixina. Em rosa, poços nos quais houve crescimento bacteriano, indicando resistência ao antimicrobiano testado.

Dentre os genes de resistência pesquisados no isolado desse estudo, foi detectado apenas o gene *bla*_{KPC} (Figura 2). Os demais genes para carbapenemases, incluindo os de metalobetalactamase pesquisados, não foram encontrados pela técnica utilizada. A análise do sequenciamento por metodologia de Sanger e alinhamento contra as sequências depositadas no NCBI revelou a presença da variante enzimática KPC-2.

O *NG-Test CARBA 5* evidenciou a produção da enzima KPC pelo isolado testado, apresentando resultado negativo para as demais enzimas investigadas, incluindo OXA (O), VIM (V), IMP (I) e NDM (N).

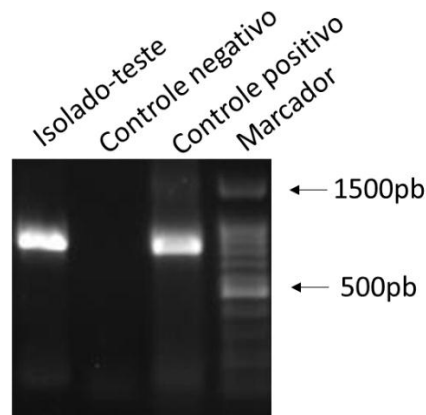


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto obtido após PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores KPC-F e KPC-R.

Para investigar a presença de genes móveis no isolado de *K. pneumoniae* resistente à polimixina, foi adotada uma abordagem que utilizou uma cepa de *E. coli* suscetível à polimixina como a célula receptora. Após a realização dos ensaios de transferência, a observação dos resultados (Figura 3) revelou que a *E. coli* receptora foi capaz de crescer em um meio contendo polimixina B, indicando transferência bem-sucedida dos genes de resistência provenientes da *K. pneumoniae*.

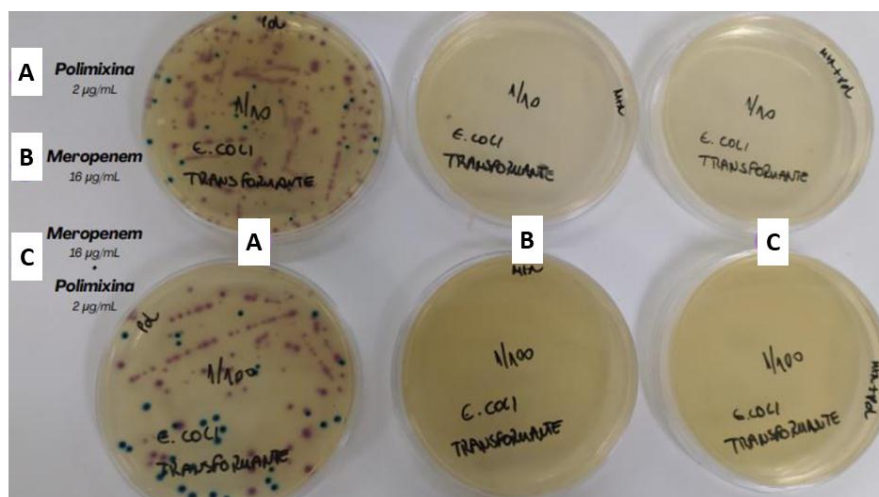


Figura 3. Ensaio de transferência para detecção da presença de elementos móveis relacionados à resistência à polimixina B e aos carbapenêmicos em isolado de *K. pneumoniae* testado. Legenda: A - Placas de *Chromagar* contendo 2 µg/mL de polimixina B. B - Placas de *Chromagar* contendo 16 µg/mL de meropenem. C - Placas de *Chromagar* contendo a combinação de ambos os antimicrobianos indicados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo enfatizou as limitações dos testes fenotípicos ao detectar resistência em níveis baixos, concordando com a literatura. A imprecisão desses testes destaca a necessidade da análise genética para identificação precisa, evidenciada pelo gene móvel de resistência detectado pelo ensaio de transferência. A falta de métodos confiáveis de diagnóstico em situações semelhantes é um desafio na prática clínica, ressaltando a urgência de ampliar o arsenal contra infecções multirresistentes.

A carência de novos antimicrobianos eficazes e a otimização dos tratamentos atuais sublinham a importância de soluções abrangentes. A pesquisa genética e o engajamento hospitalar são essenciais, assim como a educação sobre prevenção de infecções. O estudo reforça a necessidade de abordagens colaborativas para enfrentar a propagação de infecções multirresistentes, protegendo a saúde das gerações futuras.

REFERÊNCIAS

AYANDELE, A. et al. Prevalence of Multi-Antibiotic Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* species obtained from a Tertiary Medical Institution in Oyo State, Nigeria. *Qatar Medical Journal*, v. 2020, n. 1, 2 mar. 2020.

CONCEIÇÃO-NETO, Orlando C. et al. Polymyxin resistance in clinical isolates of *K. pneumoniae* in Brazil: Update on molecular mechanisms, clonal dissemination and relationship with KPC-producing strains. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, p. 1012, 2022.

CORRÊA, Juliana Silva et al. Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 56, 2022.

LAI, Chih-Cheng et al. Clinical characteristics of patients with bacteraemia due to the emergence of mcr-1-harboursing Enterobacteriaceae in humans and pigs in Taiwan. *International journal of antimicrobial agents*, v. 52, n. 5, p. 651-657, 2018.

LI, Ziyao et al. Genetic Diversity of Polymyxin-Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae*: a Multicenter Study in China. *Microbiology Spectrum*, p. e05231-22, 2023.

MARR, C. M.; RUSSO, T. A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new public health threat. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 17, n. 2, p. 71-73, fev. 2019.

RUSSO, A. *et al.* New advances in management and treatment of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 21, n. 1, p. 41-55, 2 jan. 2023.