

Carolina Silva Nodari<sup>1</sup>, Vanessa Bley Ribeiro<sup>1</sup>, Alexandre Prehn Zavascki<sup>2,3</sup> e Afonso Luis Barth<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); <sup>2</sup> Faculdade de Medicina, UFRGS;

<sup>3</sup> Unidade de Infectologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA); <sup>4</sup> Serviço de Patologia Clínica, HCPA

## Introdução

- O gênero *Kluyvera* spp. pertence à família Enterobacteriaceae sendo que as espécies deste gênero são usualmente saprófitas do trato respiratório, gastrointestinal e urinário, com raros relatos de patogenicidade;
- Embora acredite-se que o gênero *Kluyvera* seja a origem do gene codificante para  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) do tipo CTX-M, são incomuns os relatos de multirresistência em isolados deste gênero;
- A produção de KPC constitui um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias, sendo que a presença da enzima já foi descrita em praticamente todas as espécies desta família, porém, até o momento sua presença não foi relatada no gênero *Kluyvera*.

## Objetivo

- Caracterizar fenotípica e genotipicamente um isolado de *Kluyvera* sp. resistente aos antibióticos carbapenêmicos, proveniente de um aspirado traqueal de paciente internado em um hospital de Porto Alegre em 2011.

## Materiais e Métodos

- A confirmação da espécie bacteriana foi realizada a partir da análise do sequenciamento do gene 16S (Maiwald, 2004);
- O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado por microdiluição em caldo de acordo com CLSI;
- A detecção fenotípica de ESBL foi realizada na presença de ácido borônico (BA) (Tsakris *et al.*, 2009) e a confirmação genotípica foi realizada por PCR para os genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> (Paterson *et al.*, 2003);
- Na triagem fenotípica de carbapenemases foram realizados o teste de Hodge modificado (MHT) (CLSI, 2009) e o teste dos discos combinados com BA (Pasteran *et al.*, 2009). A PCR foi utilizada como método confirmatório para a detecção do gene *bla*<sub>KPC</sub>;
- O sequenciamento do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi realizado de acordo com o método descrito por Bradford (2009). A sequência obtida foi comparada àquelas depositadas no GenBank, com o auxílio do programa BioEdit.
- O DNA plasmidial da cepa foi obtido por lise alcalina e eletroporado em *E. coli* Top10. As cepas transformantes foram selecionadas em ágar LB contendo ceftazidima 1,0mg/L para posterior análise.
- A avaliação do ambiente genético do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi realizada pela amplificação e sequenciamento do DNA genômico da *K. georgiana* utilizando-se primers específicos (Naas *et al.*, 2008).

## Resultados e Conclusões

- O sequenciamento do fragmento amplificado do gene 16S apresentou 99,85% de similaridade com o descrito para a *K. georgiana* ATCC 51603;
- O isolado apresentou resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos testados, demonstrando sensibilidade a outras classes de antibióticos (tabela 1).

**Tabela 1:** Concentrações inibitórias mínimas (MIC) da *Kluyvera georgiana* para os antibióticos CAZ – ceftazidima, FEP – cefepime, SAM – ampicilina-sulbactam, IMP – imipenem, MEM – meropenem, ERT – ertapenem, AMK – ampicacina, CIP – ciprofloxacino, POL – polimixina B, TIG – tigeciclina.

	MIC (mg/L)									
	CAZ	FEP	SAM	IMP	MEM	ERT	AMK	CIP	POL <sup>a</sup>	TIG <sup>a</sup>
<i>K. georgiana</i>	16 (R)	32 (R)	> 256 (R)	256 (R)	128 (R)	128 (R)	2,0 (S)	< 0,125 (S)	0,25	0,5

<sup>a</sup> Não possuem pontos de corte padronizados pelo CLSI para enterobactérias. S - sensível, R - resistente, conforme pontos de corte CLSI 2011.

- As pesquisas fenotípica e genotípica de ESBL não revelaram resultados positivos;
- Os testes fenotípicos para pesquisa de carbapenemases (MHT e BA) foram positivos;
- A PCR confirmou a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> e o sequenciamento do produto amplificado apresentou 100% de similaridade com o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>;
- Os transformantes obtidos a partir da eletroporação apresentaram resultados positivos para as pesquisas fenotípica e genotípica do gene *bla*<sub>KPC</sub>, sendo obtido um plasmídeo de ~36kb, compatível com o presente na *K. georgiana*.
- A análise do ambiente genético sugere que o gene *bla*<sub>KPC</sub> está inserido em um transposon Tn801-like. A sequência parcial do transposon da *K. georgiana* (130bp “upstream” e 459bp “downstream” ao gene) apresentou 99,8% de similaridade com a sequência de um *Enterobacter cloacae* com esse transposon.
- Este é o primeiro relato da presença da enzima KPC em um isolado do gênero *Kluyvera*, o que justifica sua elevada resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

## Referências

- Bradford PA, Bratu S, Urban C *et al.* Emergence of carbapenem-resistant Klebsiella species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30  $\beta$ -lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 55–60.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
- Maiwald M. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing D, ed. *Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2004; 379–90.
- Naas T, Cuzon G, Villegas MV *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1257–63.
- Pasteran F, Mendez T, Guerriero L *et al.* Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1631–9.
- Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM *et al.* Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3554–60.
- Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K *et al.* Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3420–6.