

CARACTERIZAÇÃO ANTIMICROBIANA FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Klebsiella* spp. RESISTENTES À POLIMIXINA

Karoline Rissele Henrique de Almeida; Natally dos Santos Silva; Eliana Maria Chaves de Paiva; Sibebe Ribeiro de Oliveira

Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES/UNITA), Caruaru, Pernambuco, Brasil.

Resumo: Tendo em vista a problemática crescente da resistência bacteriana, o presente estudo teve por objetivo analisar fenotipicamente o perfil de sensibilidade e resistência cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às polimixinas, avaliando as tendências da resistência *in vitro* frente aos principais antimicrobianos de uso corrente no tratamento de infecções nosocomiais em um hospital de emergência no município de Caruaru-PE. Trata-se de um estudo descritivo transversal, realizado entre abril e agosto de 2017 onde foi realizada a caracterização antimicrobiana de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à polimixina, frente aos principais antibióticos de uso clínico, através da realização de antibiograma pelo método de Kirby-Bauer para determinação do perfil de sensibilidade e resistência das cepas. Neste estudo um total de 18 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a polimixina foram analisados. Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antibiótico testada, sendo as classes das penicilinas, inibidores de β -lactamases e cefalosporinas as mais prevalentes. As infecções ocasionadas por bactérias multirresistentes têm sido uma preocupação relacionada principalmente à falta de desenvolvimento de novos medicamentos. O comportamento das bactérias resistentes a polimixina frente a demais classes de antibióticos tem apresentado uma situação preocupante, uma vez que já se mostram resistentes a todas as classes antimicrobianas disponíveis, apontando cada vez mais para o surgimento de uma era de grandes limitações relacionadas a utilização de antimicrobianos.

Palavras-chave: Antimicrobianos, resistência, infecções nosocomiais.

PHENOTYPIC ANTIMICROBIAL CHARACTERIZATION OF GENUS BACTERIA *Klebsiella* spp. RESISTANT TO POLYMYXIN

Abstract: Owing to the growing problem of bacterial resistance, of the present study aimed at analyze phenotypically the sensitivity and resistance profile of polymyxin resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* by evaluating the trends of *in vitro* resistance against the main antimicrobials commonly used in the treatment of infections hospital in the municipality of Caruaru-PE. This is a cross-sectional descriptive study carried out between April and August 2017, where the antimicrobial characterization of strains of *Klebsiella pneumoniae* resistant to polymyxin against the main antibiotics of clinical use was carried out through the Kirby-Bauer method to determine the sensitivity and resistance profile of the strains. In this study a total of 18 isolates of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* were analyzed. All isolates showed resistance to at least one

class of antibiotic tested, and the classes of penicillins, β -lactamase inhibitors and cephalosporins were the most prevalent. Infections caused by multiresistant bacteria have been a concern mainly related to the lack of development of new drugs. The behavior of polymyxin-resistant bacteria against other classes of antibiotics has presented a worrying situation, since they are already resistant to all available antimicrobial classes, pointing increasingly to the emergence of an era of great limitations related to the use of antimicrobials.

Keywords: Antimicrobials, resistance, cross infection.

Introdução:

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo, uma vez que muitas bactérias que anteriormente se apresentavam suscetíveis a antibióticos eficazes no tratamento das infecções têm demonstrado altos níveis de resistência à maioria destes agentes antimicrobianos. A resistência é responsável por consequências relacionadas com a morbidade e mortalidade dos pacientes, além de prolongar a hospitalização dos mesmos, afetando diretamente os custos relacionados aos cuidados de saúde¹⁻³. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções nosocomiais são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento dos pacientes⁴.

Dentre os microrganismos comumente envolvidos nos casos de infecções nosocomiais, *Klebsiella* spp. tem apresentado grandes preocupações dentro deste contexto, sendo a espécie *Klebsiella pneumoniae* a mais frequente⁵. Trata-se de uma bactéria Gram negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, que naturalmente apresenta resistência intrínseca apenas às aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina)⁶. Entretanto, nas últimas décadas, casos de cepas de *Klebsiella* resistentes aos β -lactâmicos têm sido comumente reportados, principalmente associados à produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). A *Klebsiella* KPC expressa resistência a cerca de 95% dos antimicrobianos disponíveis, restringindo de maneira acentuada as opções terapêuticas⁷.

A correlação existente entre a utilização de antimicrobianos e o aparecimento de cepas de *Klebsiella* resistentes é evidenciada principalmente nos antibióticos β -lactâmicos, que tem sua atividade inibida pela ação das enzimas β -lactamases⁸. Dentro

deste contexto, destacamos a produção de beta lactamases de espectro estendido (Extended-Spectrum Betalactamase = ESBL) que hidrolisam as cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a gerações, monobactâmicos (aztreonam), penicilinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, e tetraciclina⁹. Diante da situação emergente a cerca do panorama de resistência ocasionado por microrganismos produtores de ESBLs, os carbapenêmicos passaram a ser a classe principal de antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções ocasionadas por estes multirresistentes¹⁰, no entanto, essa opção terapêutica tem exercido uma maior pressão seletiva no contexto hospitalar ocasionando a seleção natural de bactérias resistentes aos carbapenêmicos⁸.

De maneira frequente o tratamento das infecções ocasionadas por Gram negativos envolve a utilização de cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, quinolonas, antimicrobianos associados à inibidores de beta-lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), aminoglicosídeos e carbapenêmicos¹¹, porém, a ampla utilização destes antimicrobianos tem tornado cada vez mais frequente o aparecimento de isolados apresentando resistência⁸.

Com a emergência de microrganismos multirresistentes, antimicrobianos a polimixina B e colistina (polimixina E), voltaram a ser utilizadas como última opção terapêutica com atividade contra microrganismos Gram negativos multirresistentes¹²⁻¹⁴. Embora as taxas de resistência às polimixinas ainda sejam consideradas baixas, estudos já relatam a resistência total a estes antibióticos principalmente em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter* spp¹⁵.

Tendo em vista a problemática crescente da resistência bacteriana, o presente estudo teve por objetivo analisar fenotipicamente o perfil de sensibilidade e resistência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às polimixinas, avaliando as tendências da resistência *in vitro* frente aos principais antimicrobianos de uso corrente no tratamento de infecções nosocomiais em um hospital de emergência no município de Caruaru-PE.

Material e Métodos:

Estudo descritivo transversal, realizado entre abril e agosto de 2017, em um hospital de emergência da cidade de Caruaru-PE, Brasil.

As amostras utilizadas foram fornecidas pelo hospital de estudo, sendo previamente coletados conforme metodologia própria de diversos sítios de infecção, cultivadas e identificadas como *Klebsiella pneumoniae*. A caracterização do perfil de resistência à polimixina se deu através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) conforme metodologia do E-test® que baseia-se na difusão de um gradiente de concentrações diferentes do antimicrobiano testado (polimixina) na superfície de uma placa de ágar Mueller Hinton, com a finalidade de fornecer a informação da concentração mínima que aquele antibiótico apresenta para ser considerado eficiente para o tratamento. Em seguida, as cepas foram repicadas em Ágar Mac Conkey e posteriormente submetidas ao teste de susceptibilidade frente aos principais antibióticos de uso clínico, através da realização de antibiograma pelo método de Kirby-Bauer para determinação do perfil de sensibilidade e resistência das cepas.

Para a análise dos resultados acerca dos padrões de resistência, utilizou-se a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2017(16)*, através de antibióticos recomendados para bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae. Discos contendo os seguintes agentes antimicrobianos foram utilizados: amicacina, ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, aztreonam, cefazolina, ceftazidima, cefepime, cefoxitina, cefuroxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperaciclina com tazobactam, tobramicina.

Resultados:

Foram obtidas 18 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a polimixina B. Em relação ao perfil de susceptibilidade frente às demais classes de antibióticos, 100% das cepas testadas apresentaram resistência a todos os representantes das classes das penicilinas, inibidores de β -lactamases e cefalosporinas. Em relação à classe das quinolonas 77,77% das cepas apresentaram resistência. Na classe dos monobactâmicos, 88,88% das cepas se mostraram resistentes. Um total de 72,22 % foram resistentes aos carbapênemicos e 61,11% foram resistentes a classe dos fenicois. Já os

aminoglicosídeos, apresentaram um total de 50% de cepas resistentes, conforme evidenciado no Gráfico 1.

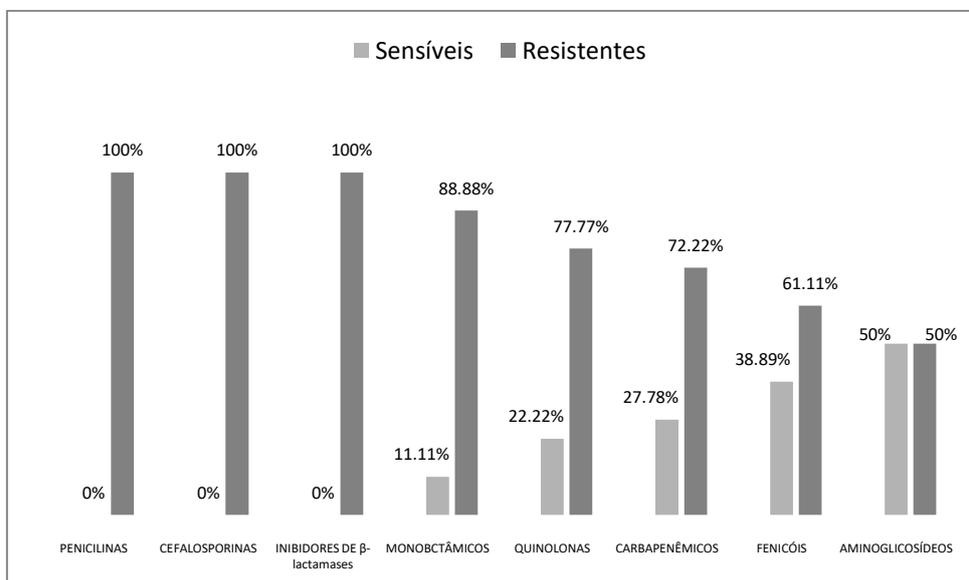


Gráfico 1: Perfil de sensibilidade e resistência apresentada por classe antimicrobiana.

Discussão

O aumento da resistência antimicrobiana principalmente apresentada pelos bacilos Gram negativos, e a ausência do desenvolvimento de novas drogas ativas neste grupo, motivou a reintrodução da utilização das polimixinas, no entanto, a eficácia clínica deste antimicrobiano já se torna limitada e casos de resistência já podem ser identificados, principalmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae*^{17,18}.

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é considerada um importante patógeno de interesse hospitalar frequentemente associado ao surgimento de infecções nosocomiais oportunistas, sendo uma das principais espécies envolvidas no aparecimento de mecanismos de resistência a diferentes classes antibióticas, incluindo a resistência às polimixinas^{10,19}.

Os resultados do presente estudo apontam de maneira evidente para a problemática da resistência aos β -lactâmicos, que são antimicrobianos de amplo espectro. Fazem parte da classe dos β -lactâmicos as cefalosporinas, carbapenêmicos e as

penicilinas. Um total de 41,88% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* testadas neste estudo apresentaram resistência aos β -lactâmicos, corroborando com estudo publicado por Silva et al. (2014)²⁰ em que 73,33% do total de amostras analisadas apresentaram resistência a esta classe.

A classe das quinolonas, representada pelos antibióticos levofloxacina e ciprofloxacina, representou neste estudo 11,96% do total de resistência, corroborando com estudos como o de Souza (2014)²¹, em que foi observado baixa efetividade das quinolonas frente a família das Enterobacteriaceae, principalmente a *Klebsiella pneumoniae*, além de ter sido constatado que a levofloxacina apresentou uma maior efetividade quando comparada com a efetividade da ciprofloxacina, este dado foi observado também no presente estudo.

A classe dos aminoglicosídeos é considerada uma importante opção terapêutica no tratamento de infecções hospitalares, sendo muitas vezes utilizada em combinação com outras classes de antibióticos, principalmente os β -lactâmicos. Neste estudo foi observado que a classe dos aminoglicosídeos representada pelos antibióticos amicacina e gentamicina, obteve um percentual de apenas 7,69% de resistência. Dados semelhantes foram observados em estudo desenvolvido por Seibert et al. (2014)²² em que os aminoglicosídeos apresentaram sensibilidade em 91,5% dos isolados testados de *Klebsiella pneumoniae*, sugerindo que apesar do aumento e disseminação de cepas resistentes em todo o mundo, esta classe com seu alto potencial bactericida, ainda pode ser eficaz no tratamento de algumas infecções.

A resistência às cefalosporinas, evidenciada em 100% das cepas testadas neste trabalho aponta para a problemática de cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), uma vez que os primeiros relatos do aparecimento de Enterobactérias produtoras de ESBL estavam associados com a resistência as cefalosporinas de terceira geração. As cefalosporinas são hidrolisadas por cepas produtoras de β -lactamases do tipo Amp^{23,24}.

Conclusões

A rápida disseminação de bactérias resistentes tem colocado em risco a eficácia da maioria dos antibióticos, incluindo aqueles com amplo espectro de atividade. As infecções ocasionadas por bactérias multirresistentes têm sido uma preocupação relacionada principalmente ao desenvolvimento limitado de novos medicamentos.

Este contexto reflete diretamente no fardo econômico do sistema de saúde, pois, uma resposta não eficaz ao tratamento através de drogas de primeira escolha leva a utilização de antimicrobianos que apresentam alta toxicidade, como as polimixinas, que apesar de geralmente apresentarem resposta ao tratamento, seu uso de maneira recorrente já tem levado ao surgimento de bactérias resistentes também a esta última opção terapêutica.

O comportamento das bactérias resistentes a polimixina frente a demais classes de antibióticos tem apresentado uma situação preocupante, uma vez que já se mostram resistentes a todas as classes antimicrobianas disponíveis, apontando cada vez mais para o surgimento de uma era de grandes limitações relacionadas a utilização de antimicrobianos.

Referências:

1. Loureiro RJ, Roque F, Teixeira Rodrigues A, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. Rev Port Saude Publica [Internet]. Escola Nacional de Saúde Pública; 2016;34(1):77–84.
2. Marinho HRP. Resistência bacteriana: uma revisão da literatura Páginas 122 a 128 122. 2016;16:122–8.
3. Kadosaki LL, Falcão De Sousa S, Cibene J, Borges M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar Analysis of use and bacterial resistance to antimicrobial in level hospital. Rev Bras Farm. 2012;93(2):128–35.
4. Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. 2016;83.
5. Fabíola D, Santos DOS. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. 2007;1–98.
6. Martins WMB da S. Estudo de mecanismos de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase. 2014;
7. Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Wang H, Woodford N, Quinn JP. HHS Public Access. 2015;13(9):785–96.
8. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2010;74(3):417–33. Recuperado de: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00016-10>
9. Andrew B, Kagirita A, Bazira J. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing Microorganisms in Patients Admitted at KRRH, Southwestern Uganda. Int J Microbiol. Hindawi Publishing Corporation; 2017;2017.
10. Investigation O. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant. 2006;165:1430–5.
11. Rossi, F.; Andreatzi, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 118 p. 2005;2005.
12. Pogue JM, Ortwine JK, Kaye KS. Are there any ways around the exposure-limiting

- nephrotoxicity of the polymyxins? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;48(6):622–6. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.001>
13. Roberts KD, Azad MAK, Wang J, Horne AS, Thompson PE, Nation RL, et al. Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-Line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *ACS Infect Dis*. 2016;1(11):568–75.
 14. Vardakas KZ, Falagas ME. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;49(2):233–8. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.023>
 15. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):2070–4.
 16. (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Vol. 27. 2017. 1-250 p.
 17. Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. Colistín en la era post-antibiótica. *Rev Chil Infectol*. 2016;33(2):166–76.
 18. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: An epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents*. Elsevier B.V.; 2014;44(6):500–7.
 19. Em PDEP, Biológicas C, Polimixina RÀ, Bactérias BEM, Carbapenemos N, Isoladas R, et al. Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte Em Hospitais Do Rio Grande Do Norte.
 20. Silva RCG da, Silva AC de O, Oliveira SR de. Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures. *J Bras Patol e Med Lab*. 2014;50:421–7.
 21. Rogério R, Sousa F De, Paulo S. Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem

clínica e ambiental Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental. 2014;

22. Seibert G, Hörner R, Meneghetti BH, Righi RA, Forno NLFD, Salla A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. Einstein (São Paulo) [Internet]. 2014;12(3):282–6. Recuperado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082014000300282&lng=en&tlng=en
23. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. Brazilian J Microbiol. Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2016;47:31–7.
24. Pic RC, Federal U. Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas* . 2009;