



CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS EM UM HOSPITAL TERCIARIO DE RIBEIRÃO PRETO: UM ESTUDO RETROSPECTIVO.

CHARACTERIZATION OF THE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILE IN *Klebsiella pneumoniae* ISOLATED FROM PATIENTS ADMITTED TO A TERTIARY HOSPITAL IN RIBEIRÃO PRETO: A RETROSPECTIVE STUDY.

LARISSA DIAS MAZARÃO CRUZ. CURSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.
UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO¹.

RAFAEL NAKAMURA-SILVA. PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
AMBIENTAL. UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO².

MARIANA DE OLIVEIRA-SILVA. PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA AMBIENTAL. UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO³.

MIGUEL AUGUSTO DE MORAES. CURSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.
UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO⁴.

AMANDA KAMYLA FERREIRA. PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
AMBIENTAL. UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO⁵.

RAFAEL DA SILVA GOULART. PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA. UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO⁶.

CAROLINA NOGUEIRA GOMES. FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO⁷.

ANDRÉ PITONDO-SILVA. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL E PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA. UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO⁸.

DOI 10.5281/zenodo.7447885

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, que está amplamente distribuído no ambiente. É uma das espécies bacterianas pertencentes ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*) que compreende as principais espécies associadas a infecções hospitalares de difícil tratamento devido ao perfil de multirresistência. *K. pneumoniae* é considerado um patógeno oportunista associado a diversas infecções humanas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Nesse estudo foi avaliada a susceptibilidade aos antimicrobianos de 96 *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados em um hospital terciário do interior de São Paulo, Brasil. O perfil de

susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de disco-difusão, testando 35 agentes antimicrobianos pertencentes à 11 classes distintas. Os isolados foram classificados como multidrug-resistance (MDR) quando não-susceptíveis a um ou mais antibióticos em três ou mais classes distintas de antimicrobianos. Os resultados demonstraram que 80,21% dos isolados foram classificados como MDR. Os isolados elevados índices de não-susceptibilidade para sulfonamida (96,87%) e trimetopim (97,91%), seguido de cefuroxima (77,08%), cefazolina (64,94%), amoxicilina+clavulanato (64,58%) e a nitrofurantoína (69,79%). As enterobactérias multirresistentes estão entre as maiores preocupações para saúde pública mundial. Portanto, identificar e caracterizar esses patógenos contribui para o controle e diminuição da disseminação da resistência antimicrobiana tanto no ambiente

hospitalar quanto na comunidade.

PALAVRAS-CHAVES: *Klebsiella pneumoniae*, multirresistência, resistência aos antimicrobianos, saúde pública.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacillus belonging to the Enterobacteriaceae family, which is widely distributed in the environment. It is one of the bacterial species belonging to the ESKAPE group (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter spp.) which comprises the main species associated with hospital infections that are difficult to treat due to their multidrug resistance profile. *K. pneumoniae* is considered an opportunistic pathogen associated with several human infections, mainly in immunocompromised individuals. In this study, the antimicrobial susceptibility of 96 *K. pneumoniae* isolated from patients admitted to a tertiary hospital in the interior of São Paulo, Brazil, was evaluated. The antimicrobial susceptibility profile was determined by the disk-diffusion method, testing 35 antimicrobial agents belonging to 11 different classes.

Isolates were classified as multidrug-

resistance (MDR) when not susceptible to one or more antibiotics in three or more different classes of antimicrobials. The results showed that 80.21% of the isolates were classified as MDR. The isolates had high non-susceptibility rates for sulfonamide (96.87%) and trimethoprim (97.91%), followed by cefuroxime (77.08%), cefazolin (64.94%), amoxicillin+clavulanate (64.58 %) and nitrofurantoin (69.79%). Multidrug-resistant enterobacteria are among the biggest public health concerns worldwide. Therefore, identifying and characterizing these pathogens contributes to the control and reduction of the spread of antimicrobial resistance both in the hospital environment and in the community.

KEYWORDS: *Klebsiella pneumoniae*, multidrug resistance, antimicrobial resistance, public health.

INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae. É considerada uma bactéria oportunista presente em infecções hospitalares e comunitárias, principalmente em pacientes imunocomprometidos

(TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A família *Enterobacteriaceae* compreende um grupo importante de microrganismos que possui diversos mecanismos relacionados à resistência aos antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Desta família, *K. pneumoniae* é uma das espécies bacterianas com maior importância clínica por ser um dos principais agentes causadores das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (SOUZA; RAMALHO; CAMARGO, 2020).

Nas últimas décadas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, houve um aumento considerável na prevalência de linhagens de *K. pneumoniae* com resistência a diversos antibióticos (CARDOSO, 2019). Infecções por esta espécie bacteriana tornaram-se um desafio para a comunidade médica devido à sua crescente capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos, pois reduzem significativamente as opções terapêuticas dos pacientes acometidos (ANVISA, 2017). Quando expostas à pressão seletiva por uso frequente de antimicrobianos, cepas de *K.pneumoniae* podem colonizar locais onde muitas outras espécies não conseguem sobreviver, devido à sua

plasticidade genética e à sua capacidade de se adaptar por meio da aquisição ou

desenvolvimento de mecanismos de resistência (GOMEZ-SIMMONDS; UHLEMANN, 2017).

A resistência antimicrobiana por *K. pneumoniae* é um problema global e sua identificação precoce é primordial, principalmente para o controle de infecções no ambiente hospitalar (ELLEM; PARTRIDGE; IREDELL, 2011). Assim, o presente estudo avaliou a susceptibilidade aos antimicrobianos em *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados em um hospital terciário de Ribeirão Preto, no interior de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, foram inicialmente avaliados 100 isolados bacterianos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes internados em um hospital terciário de Ribeirão Preto, cidade localizada no interior de São Paulo, Brasil. A coleção bacteriana foi organizada no período de fevereiro a novembro de 2015, sendo coletadas 10 cepas mensalmente. As bactérias foram isoladas de diferentes pacientes e origens, como urina, sangue, secreção traqueal, escarro e cateter intravenoso, sendo denominadas de BS001 a BS100.

Os isolados bacterianos foram estocados em meios de cultura *Brain Heart*

Infusion (BHI) líquido (Oxoid), acrescido de glicerol 15%, e crio-conservados em a -80°C.

As espécies bacterianas foram inicialmente identificadas por métodos fenotípicos e bioquímicos convencionais, conforme descrito por Murray *et al.* (2009). Para assegurar a identificação das espécies bacterianas destinadas ao estudo, a identificação foi confirmada molecularmente por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, utilizando os primers 5'-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3' e 5'-TTCACCTCTGAAGTTTTCTTGTGTT C-3', conforme descrito por Turton *et al.* (2010). Por meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada a comparação com sequências homólogas depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Com as análises do sequenciamento do gene 16S rRNA, verificou-se que quatro (BS009, BS014, BS031 e BS038) dos 100 isolados, não correspondiam a *K. pneumoniae* os quais pertenciam à espécie *Enterobacter cloacae*, sendo estes excluídos do

estudo. Portanto, o estudo seguiu com 96 isolados bacterianos molecularmente confirmados como *K. pneumoniae*.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado por disco-difusão em Agar Müeller-Hinton (MH) (Oxoid), conforme recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), utilizando 35 diferentes antimicrobianos recomendados para *Enterobacteriaceae*.

Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados foram inoculados em Agar MH e mantidos em estufa a 37°C por 18 horas. Após o crescimento, foi preparado um inóculo com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, e realizou-se a semeadura por sobreposição, adicionando os discos de antimicrobianos sobre a superfície da placa de MH. Com 18 horas de incubação a 37°C, realizou-se a leitura dos halos de inibição ao redor dos discos em concordância com as recomendações do CLSI (2018). A partir da leitura dos halos de inibição, os isolados foram considerados susceptíveis ou não-susceptíveis (isolados resistentes ou com resistência intermediária) aos antimicrobianos testados.

Os discos de antibióticos testados

(Oxoid) e suas respectivas concentrações foram: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina+sulbactam (10/10 µg),

amoxicilina+clavulanato (20/10 µg), aztreonam (30 µg), cefaclor (30 µg), cefazolina (30 µg), cefepima (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftarolina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefuroxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), doripenem (10 µg), doxiciclina (30 µg), ertapenem (10 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacina (5 µg), lomefloxacina (10 µg), meropenem (10 µg), minociclina (30 µg), nitrofurantoina (300 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (5 µg), piperacilina+tazobactam (100/10 µg), sulfametazol+trimetoprim (23,75/1,25 µg), sulfonamida (300 µg), tetraciclina (30 µg), tobramicina (10 µg) e trimetoprim (5 µg).

Como controle do experimento, as linhagens *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, ATCC 35218 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, foram utilizadas como parâmetros para manter a confiabilidade dos resultados.

Com base nos resultados dos

testes de sensibilidade aos antimicrobianos, os isolados bacterianos foram considerados *multidrug-resistance* (MDR) quando apresentaram não-susceptibilidade a um ou mais

discos de antibióticos em três ou mais classes distintas de antimicrobianos.

O presente estudo foi previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brasil) [aprovação no. CEP / FCFRP 362; CAEE 36031914.9.0000.5403].

RESULTADOS

Dos 96 isolados analisados, 80,21% (n=77) foram classificados como MDR, inclusive, o isolado BS040 demonstrou-se resistente a todos os antimicrobianos testados (Tabela 1). Os isolados apresentaram maior não-susceptibilidade à classe de inibidores da via de folato, cujos maiores índices foram para sulfonamida e trimetoprim, com 96,87% (n=93) e 97,91% (n=94), respectivamente. Os isolados bacterianos também apresentaram altos índices de não-susceptibilidade a outras

classes de antimicrobianos, como as cefalosporinas, penicilinas associadas com inibidores de beta-lactamases e nitrofurantoína. Para as cefalosporinas, os isolados apresentaram maiores

índices de não-susceptibilidade para cefuroxima 77,08% (n=74), cefazolina 64,94% (n=63), cefaclor 61,45% (n=59) e 62,50% (n=60) para os antimicrobianos cefepima, ceftriaxona, ceftarolina e cefotaxima (Figura 1).

Para as penicilinas associadas com inibidores de beta-lactamases, os percentuais encontrados foram, amoxicilina+clavulanato 64,58% (n=62), ampicilina+sulbactam 61,45% (n=59), piperacilina+tazobactam 60,42%, (n=58). O índice de não-susceptibilidade para nitrofurantoína foi de 69,79% (n=67) (Figura 1).

Para as outras classes de antimicrobianos como os carbapenêmicos doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem, os índices de não-susceptibilidade foram 26,04% (n=25), 31,25% (n=30), 27,08% (n=26), e 26,04% (n=25), respectivamente. O menor índice de não-susceptibilidade demonstrado pelos isolados estudados foi para amicacina, com 15,62% (n=15) (Figura 1).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em um estudo realizado por Moradigaravand *et al.* (2017), com 250 *K. pneumoniae*-MDR (KP-MDR) no Reino Unido e Irlanda, também foi

encontrada uma alta resistência para cefuroxima (94%), cefotaxima (58%), amoxicilina+clavulanato (68%) e ciprofloxacina (65,6%). As KP-MDR também apresentaram alta sensibilidade à imipenem (99,2%), corroborando com os nossos resultados de multirresistência entre as classes de cefalosporinas e penicilinas com inibidores de beta-lactamases, além de também mostrar resistência a fluoroquinolonas e alta sensibilidade aos carbapenêmicos. Gonçalves *et. al.* (2017), avaliaram 26 *K. pneumoniae* isoladas de um hospital terciário na região sul do Brasil, mostrando que 53,8% (n=14) foram classificadas como MDR. Tais resultados sugerem a dispersão das linhagens KP-MDR em várias localidades do Brasil e do mundo.

A alta resistência aos antimicrobianos desperta uma preocupação para a terapêutica das IRAS, devido à limitação nos tratamentos contra patógenos resistentes, somadas ao lento desenvolvimento de novos antibióticos. A resistência aos

antimicrobianos começou a ser desenvolvida desde os primeiros usos dos antibióticos, devido à exposição das bactérias aos mesmos. Nos últimos tempos tem sido crescente a preocupação com o uso racional dos antimicrobianos. Estudos apontam que a efetividades dos mesmos pode ser muito reduzida nos próximos 20 anos (ALMEIDA; MIRANDA, 2020). Por isso, estudos retrospectivos e monitoramento epidemiológico constante de bactérias MDR, são essenciais para acompanhar a evolução da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Portanto, identificar, caracterizar e conhecer a epidemiologia de bactérias MDR, principalmente no ambiente hospitalar, é uma importante estratégia para o controle da disseminação da resistência aos antimicrobianos, especialmente em *K. pneumoniae*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Processo Nº. 2013/22581-5]. R.N-S, M.O.S e R.S.G são doutorandos com bolsas financiadas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), portanto, este estudo

foi parcialmente financiado pela CAPES [processo nº 88882.365161/2019-01, 88887.601821/2021-00 e 88887.493929/2020-00, respectivamente].

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. C.; MIRANDA, C. V. A importância do farmacêutico na dispensação e controle de medicamentos classificados como antimicrobianos. **Revista Saúde Multidisciplinar**, n. 1, v. 7, p. 1-12, 2020. Disponível em: <<http://revistas.famp.edu.br/revistas-audemultidisciplinar/article/view/112>>. Acesso em: 26 out. 2020.

BRASIL. ANVISA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. 15 mai. 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/plano-nacional-para-a-prevencao-e-o-controle-da-resistencia-microbiana-nos-servicos-de-saude>>.

CARDOSO, A. P. **Caracterização biológica de isolados clínicos de *Klebsiella spp* do Hospital Universitário de Brasília –HUB/UnB**. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for**

antimicrobial susceptibility testing, 28th ed CLSI supplement M100 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.

ELLEM, J.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. R. Efficient direct extended-spectrum β -lactamase

detection by multiplex real-time PCR: accurate assignment of phenotype by use of a limited set of genetic markers. **J Clin Microbiol.** 49(8):3074-7.

GOMMES-SIMMONDS, A.; UHLEMANN, A. C. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n.1, p. S18-S27, mar. 2017. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw378>

GONÇALVES, G. B.; FURLAN, J. P. R.; VESPERO, E. C.; PELISSON, M.; STEHLING, E. G.; PITONDO-SILVA, A. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.L.], v. 56, p. 1-7, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.011>.

MORADIGARAVAND, D.; MARTIN, V.; PEACOCK, S. J.; PARKHILL, J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *Mbio*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 01976--16,

8 mar. 2017. **American Society for Microbiology**. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01976-16>.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. 2009. 6ª. Edição. Editora Elsevier.

OLIVEIRA, C. B. S. *et al.* Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 589-594, 2011.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2016, p. 1-8, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2475067>.

SOUZA, A. B. A; RAMALHO, F. L.; CAMARGO, B. Prevalence of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in hospitalized. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915-1932, 2020.

TURTON J.F.; PERRY C.; ELGOHARI, S.; HAMPTON C.V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of Medical Microbiology**. v.59, n.5. p.541-7. 2010

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.
Microbiologia. 6 ed. São Paulo:
Atheneu, 2015. p. 296-297.

Legendas

Figura 1 Discos de antimicrobianos: ácido nalidíxico (NAL), amicacina (AMI), ampicilina+sulbactam (APS), amoxicilina+clavulanato (AMC), aztreonam (ATM), cefaclor (CFC), cefotaxima (CTX), cefazolina (CFZ), cefepima (CPM), ceftazidina (CFT), ceftazidina (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CRX), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), doripenem (DOR), doxiciclina (DOX), ertapenem (ERT), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), levofloxacina (LEV), lomefloxacina (LMX), meropenem (MPM), minociclina (MIN), nitrofurantoina (NIT), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX), piperacilina+tazobactam (PIT), sulfametazol+trimetoprim (SUT), sulfonamida (SUL), tetraciclina (TET), tobramicina (TOB) e trimetoprim (TRI).

lomefloxacina (LMX), meropenem (MPM), minociclina (MIN), nitrofurantoina (NIT), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX), piperacilina+tazobactam (PIT), sulfametazol+trimetoprim (SUT), sulfonamida (SUL), tetraciclina (TET), tobramicina (TOB) e trimetoprim (TRI).

Tabela 1 Class., classificação de resistência. NC, não classificado. MDR, multirresistente. Discos de antimicrobianos: ácido nalidíxico (NAL), amicacina (AMI), ampicilina+sulbactam (APS), amoxicilina+clavulanato (AMC), aztreonam (ATM), cefaclor (CFC), cefotaxima (CTX), cefazolina (CFZ), cefepima (CPM), ceftazidina (CFT), ceftazidina (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CRX), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), doripenem (DOR), doxiciclina (DOX), ertapenem (ERT), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), levofloxacina (LEV),

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS EM KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS EM UM HOSPITAL TERCIARIO DE RIBEIRÃO PRETO: UM ESTUDO RETROSPECTIVO.

Figura 1 Perfil de não-susceptibilidade dos 96 isolados de *K. pneumoniae* estudados.

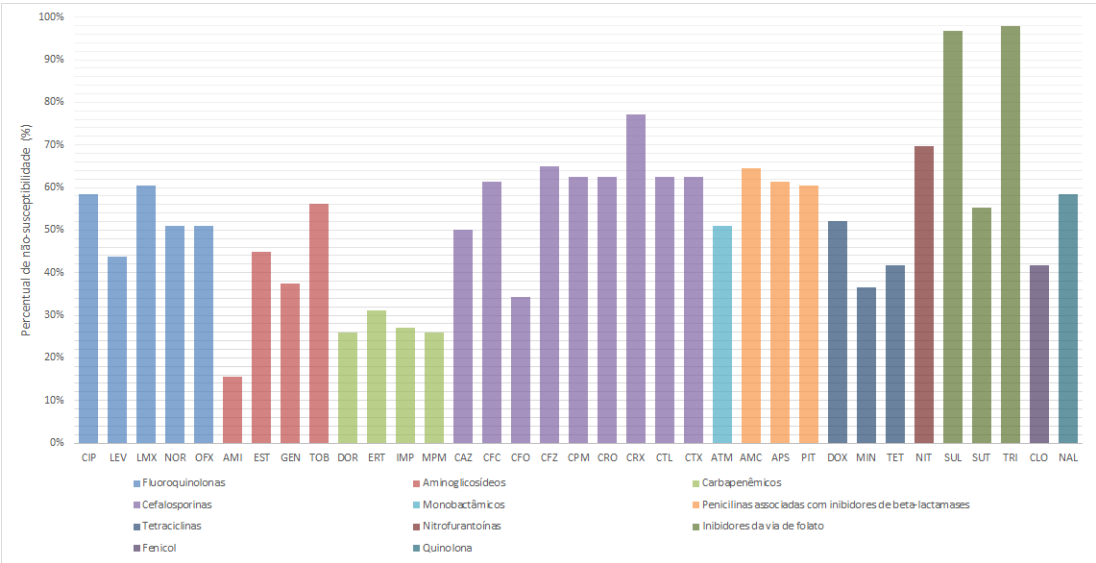


Tabela 1 Classificação do perfil de resistência e teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos 96 isolados de *K. pneumoniae* estudados.

[illegible]