

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIAN PIERIN WIEDMER

**AVALIAÇÃO DE UM CALDO SELETIVO E DIFERENCIAL/CROMOGÊNICO
NA DETECÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE
CARBAPEMENASE**

CURITIBA

2012

LILIAN PIERIN WIEDMER

**AVALIAÇÃO DE UM CALDO SELETIVO E DIFERENCIAL/CROMOGÊNICO
NA DETECÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE
CARBAPEMENASE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientador: Marcelo Pilonetto

CURITIBA

2012

RESUMO

Introdução: O aumento gradual na ocorrência e disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapamenase - KPC entre as bactérias gram-negativas torna crítica a rápida detecção destas enzimas. **Objetivos:** Avaliar a detecção e identificação presuntiva precoce de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapamenases através de um caldo seletivo e diferencial (cromogênico) para KPC. **Materiais e métodos:** A utilização de um caldo seletivo e diferencial para a detecção presuntiva de KPC foi de grande valor. Foram testadas 69 amostras de swab retal. Estas foram submetidas à metodologia preconizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e concomitantemente utilizou-se o caldo seletivo/diferencial em teste e posterior inoculação a partir desse caldo em placa com Agar cromogênico para ESBL, sendo testado ertapenem e meropenem. **Resultados:** Dentre as amostras testadas 6 apresentaram-se positivas nas provas presuntivas e definitivas. Pode-se observar a viragem do caldo em questão após 24 horas de incubação somente para as amostras positivas para KPC, além da redução na sensibilidade ao ertapenem e meropenem. **Conclusões:** Este prático e simples caldo mostrou-se de grande valor devido a sua grande sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico presuntivo frente as cepas positivas para KPC.

Palavras chaves: caldo seletivo/diferencial, KPC, detecção

ABSTRACT

Introduction: The gradual increase in the occurrence and spread of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapamenase - KPC among gram-negative bacteria makes critical the early detection of these enzymes. **Objectives:** To evaluate the detection and presumptive identification of strains of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapamenases using a selective broth and differential (chromogenic) to KPC. **Material and method:** The use of a selective and differential broth for the presumptive detection of KPC was of great value. We tested 69 samples of rectal swabs. These were submitted to the methodology recommended by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária and concomitantly used the broth selective/differential testing and subsequent inoculation from this broth agar plates for chromogenic ESBL, meropenem and ertapenem being tested. **Results:** Among the six samples tested were positive in the presumptive and definitive evidence. It can be seen the turning of the stock in question after 24 hours incubation the samples only positive for KPC, besides the reduction in sensitivity to ertapenem and meropenem. **Conclusions:** This practical and simple broth proved to be of great value because of its high sensitivity, specificity and speed in front of the presumptive diagnosis of strains positive for KPC.

Key words: Selective/differential broth, KPC, detection

LISTA DE TABELAS

FIGURA 1	Provas positivas e negativas. Observação apos 24 horas de incubação a 37°C	9
TABELA 1	Análise comparativa entre a metodologia padrão e a metodologia proposta.....	11

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBPI	Caldo de Púrpura de Bromocresol/Inositol
ESBL	Beta Lactamase de Expectro Extendido
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapamenase
TSB	Tripico de soja (caldo)

INTRODUÇÃO

A resistência aos carbapenêmicos, em especial pela *Klebsiella pneumoniae* (KPC) é um problema freqüente e importante no ambiente nosocomial. Nos dias de hoje, a redução na sensibilidade para os carbapenens é motivo de alerta pelas agências nacionais de saúde, devido à peculiaridades desses isolados em acumular e transferir importantes determinantes de resistência.^{1,2,3}

Atualmente o mecanismo de resistência à KPC possui grande importância em contexto mundial. A relevância da pesquisa destas enzimas tem como objetivo limitar a disseminação, contribuindo para redução nos índices de morbidade e mortalidade correlacionados a infecções multirresistentes, onde é de suma importância a vigilância microbiológica no laboratório em conjunto com a comissão de infecção hospitalar.^{1,4}

Sendo assim, a detecção e identificação presuntiva se dá através do teste de sensibilidade com discos de cefalosporinas e imipenem, meropenem e ertapenem, além do Teste de Hodge modificado.¹

Atualmente a utilização de meios cromogênicos vem ganhando cada dia mais adeptos, devido a facilidade e agilidade na identificação presuntiva e em alguns casos definitiva de micro-organismos, como é o caso da *Escherichia coli* em meio cromogênico para urina.⁵ A identificação direta em 24h pode orientar o clínico na escolha do antimicrobiano antes mesmo da liberação do teste de sensibilidade.⁵

A resistência aos carbapenêmicos pode mostrar-se somente como aumento das concentrações inibitórias mínimas para ertapenem, meropenem e imipenem. Isto dificulta a capacidade dos laboratórios em detectar a presença de isolados produtores de KPC por meio de métodos convencionais de determinação da susceptibilidade antimicrobiana. Este estudo teve a finalidade de propor um novo caldo seletivo e diferencial para triagem de KPC, para uma detecção rápida e confiável, constituindo um importante método de controle de infecção e prevenção da disseminação deste micro-organismo em ambiente hospitalar.

MATERIAIS E MÉTODOS

A identificação presuntiva de *Klebsiella pneumoniae* Produtora de Carbapemenase foi testada em 138 amostras de swab retal de 69 pacientes internados no Hospital do Trabalhador, em Curitiba. As análises foram realizadas no laboratório desta instituição.

Foram colhidos dois swabs retal de cada paciente. O primeiro swab foi processado conforme Norma Técnica N^o1 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para culturas de vigilância - Detecção de Enterobactérias Produtoras de Carbapamenase, onde a amostra era inoculada em 5mL de caldo TSB contendo um disco de meropenem (10µg). O segundo swab foi inoculado em 5mL de caldo de Púrpura de Bromocresol adicionado de 1,5mL de inositol e um disco de meropenem (10µg). O inositol foi incluído como componente diferencial e fonte de energia para os microorganismos capazes de fermentar o inositol, como é o caso da *Klebsiella pneumoniae*.⁶

Feito isto, após 24 horas de incubação, a 37°C, o primeiro caldo foi repicado por esgotamento em uma placa de Agar MacConkey e aplicado sobre a superfície um disco de imipenem (10µg) e meropenem (10µg). O segundo caldo (cromogênico/diferencial) era repicado em uma placa de Agar Cromogênico chromID ESBL bio-Mérieux® e aplicado sobre a superfície um disco de meropenem (10µg) e ertapenem (10µg). Esse procedimento foi realizado somente para as amostras possíveis KPCs, ou seja, para aquelas em que ocorria a viragem do caldo da coloração púrpura para o amarelo, dentro de 24 horas. Essas placas eram analisadas quando a resistência ao ertapenem e meropenem, ao invés de imipenem e meropenem como na metodologia preconizada pela ANVISA.



FIGURA 1 – Provas positivas e negativas. Observação após 24 horas de incubação a 37°C

As amostras com provas presuntivas positivas para KPC eram submetidas a um teste de sensibilidade com avaliação do imipenem, meropenem e cefalosporinas e posterior Teste de Hodge Modificado.

Como preconizado, as amostras possíveis produtoras de carbapamenase foram encaminhadas a um Laboratório de referência, LACEN, para confirmação de KPC através da identificação do gene *bla_{kpc}* por PCR em tempo real, utilizando o kit EasyQ-KPC bio-Mérieux®⁷.

RESULTADOS

Um total de 138 amostras foram testadas, 69 pela metodologia tradicional e 69 utilizando o novo caldo seletivo e diferencial para KPC. Destas amostras, 6 apresentaram-se positivas para KPC em ambas as metodologias utilizadas.

Todas as amostras positivas promoveram a viragem do Caldo de Púrpura de Bromocresol+Inositol (CPBI) do púrpura para o amarelo dentro de 24 horas. Após 48 horas de incubação, a 37°C, houve fermentação do inositol pelo *Acinetobacter baumannii*, única bactéria, não KPC, que promoveu alteração da coloração inicial do caldo. As amostras positivas (caldo amarelo) foram repicadas em placa de Agar Cromogênico chromID ESBL bio-Mérieux®

e adicionadas de discos de ertapenem e meropenem, pode-se observar o crescimento da bactéria ao redor do disco de ertapenem, não havendo qualquer inibição do ertapenem frente a KPC. Já o disco de meropenem apresentava-se com diminuição significativa do halo de inibição, em torno de 10 a 15mm. A metodologia tradicional foi realizada concomitantemente. ⁸ Pode-se observar que na metodologia usada como padrão, após inoculação do swab retal em caldo TSB com meropenem e posterior repique para Agar MacConkey, houve diminuição dos halos do imipenem e principalmente do meropenem. O desenvolvimento de *Acinetobacter baumannii* também foi freqüente neste caldo.

Apenas uma amostra mostrou-se falso negativo para a metodologia proposta, uma amostra, possível KPC, não promoveu a viragem do caldo. Este fato é explicado, possivelmente pelo fato do inositol ter sido adicionado ao caldo de Púrpura de Bromocresol 10 dias antes da inoculação do swab retal. Normalmente os açúcares são adicionados ao caldo no momento da sua utilização.

Não houve resultados falso positivos.

Das 62 duas amostras negativas na metodologia proposta as 62 foram confirmadas negativas na metodologia padrão.

		ANVISA		
		Metodologia		
		Positivo	Negativo	Total
Metodologia	Positivo	6	0	6
Proposta	Negativo	1	62	63
		Total	7	62
			62	69

Tabela 1 – Análise comparativa da metodologia padrão com a metodologia proposta.

De acordo com os resultados obtidos foi verificado uma sensibilidade de 85%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 98% e acurácia de 98%.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de *Klebsiella pneumoniae* Produtora de carbapemenase – KPC foi detectado através da fermentação do inositol no caldo de Púrpura de Bromocresol acrescido de 10ug de meropenem.

A vantagem da utilização deste caldo é a identificação direta de uma provável KPC, com o simples procedimento de inocular um swab retal diretamente no caldo.

O uso deste caldo diminui o tempo e os custos de repiques cegos sem necessidade, como é realizado na metodologia convencional, onde todos os caldos TSB contendo meropenem são repicados em Agar MacConkey. A proposta principal que foi avaliada foi de se repicar somente as amostras que fermentassem o inositol após 24 horas, ou seja, somente as amostras que mudassem a cor do púrpura para o amarelo. Com este primeiro resultado positivo, a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar da instituição já pode ser alertada quanto aos cuidados e isolamento do paciente.

Os resultados obtidos quanto a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo mostraram que a metodologia proposta é confiável e de grande valor na identificação desta bactéria e seu mecanismo de resistência. A sensibilidade de 85% mesmo sendo alta, poderia ser melhorada se o número de amostras positivas fosse maior. Dentro de 7 amostras positivas, 6 confirmaram a positividade e somente uma apresentou-se negativa, fato esse que pode ser justificado pelo preparo dos caldos ter ocorrido 10 dias antes da inoculação das amostras. Segundo a literatura, os açúcares devem ser adicionados no momento da inoculação, Depois de um certo período vão sendo consumidos pelo meio e diminuindo a sua concentração, com isso quantidades maiores de bactéria são necessárias para promoverem o crescimento e fermentação. Isto foi observado ao se tocar uma colônia e diluí-la a 0,5 na escala de MacFarland e concomitantemente inocular uma colônia da mesma bactéria diretamente no caldo. O caldo contendo 1UFC/mL foi positivo após 24 horas enquanto a amostra diluída não cresceu.

A especificidade do teste foi de 98%. Após 24 horas de incubação somente as KPC promoviam a fermentação do meio. Como a metodologia tradicional foi realizada como referência, eram feitas pesquisas para enterobactérias produtoras de ESBL. Pode-se observar que mesmo as

Klebsiella pneumoniae produtoras de ESBL não se desenvolviam e tampouco fermentavam o inositol, mesmo sendo uma característica desta bactéria promover a fermentação do inositol.⁶

A acurácia do teste também foi avaliada mostrando 98% de resultados verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos.

O CPBI mostrou-se um caldo confiável e de fácil adaptação e preparação em um laboratório clínico.

As amostras prováveis KPC foram repicadas para um meio cromogênico para ESBL, ao contrário da metodologia tradicional onde são repicadas para o Agar MacConkey, e testado ertapenem e meropenem, ao invés de imipenem e meropenem. Foi optado pela utilização do ertapenem para avaliar um aumento da sensibilidade na detecção da resistência aos carbapenêmicos. Apesar da orientação de não se utilizar o ertapenem para triagem de KPC, alegando-se que existe um elevado número de amostras de *K.pneumoniae* produtoras de cefotaximases apresentarem simultaneamente perda de porinas e consequentemente apresentarem-se falsamente detectadas como produtoras de carbapamenases, entretanto observou-se uma grande sensibilidade e especificidade com a utilização deste antimicrobiano.⁸

Segundo Lolans, 2010, em um trabalho comparando duas metodologias, onde a primeira consistia em um meio de cultura contendo imipenem e a segunda disco-difusão com ertapenem, esta apresentou uma sensibilidade e especificidade de 97% e 90,5% respectivamente, muito superior quando comparada a primeira metodologia utilizando o imipenem, onde a sensibilidade e especificidade eram de 65,5% e 49,6% respectivamente.⁹

Conforme visto nas amostras realizadas, a resistência total ao ertapenem foi mais sensível do que a resistência ao imipenem. A utilização do ertapenem como screening para detecção de resistência apresenta níveis de valor preditivo positivo de 74% e especificidade de 99,2%.¹⁰

A utilização do ertapenem é um indicador mais sensível de resistência KPC quando comparada ao imipenem e meropenem independente do método utilizado.^{11,12} Segundo CLSI (2010) a detecção fenotípica de KPC é baseada na redução da susceptibilidade ao ertapenem e meropenem, entretanto existem trabalhos onde se coloca o imipenem como mais sensível e específico, como é preconizado pela metodologia tradicional.^{13,14}

Dentre os 62 pacientes com amostras de swab retal negativas para KPC, uma destas pacientes apresentou amostra de swab retal negativa, mas positiva para KPC em ponta de cateter. Este fato mostra-nos a importância de se fazer a cultura de vigilância colhendo além das amostras de swab nasal e retal, incluir neste protocolo as culturas de swab inguinal e axilar aumentando a sensibilidade das culturas de vigília, como forma de estratégia para controle e prevenção da disseminação desta bactéria.^{15,16}

CONCLUSÃO

A identificação utilizando a metodologia proposta foi confirmada como sendo de grande valor pela sua alta sensibilidade e especificidade, além da fácil aplicabilidade em laboratórios clínicos. O tempo da inoculação até o alerta a equipe de controle de infecção hospitalar seria de apenas 24 horas. Fato este que poderá auxiliar, e muito, no controle e prevenção de KPC. A triagem utilizando ertapenem e meropenem também mostrou-se bastante sensível, podendo ser utilizado na rotina como forma de triagem destas bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DIENSTMANN, R.; PICOLI, S.U.; MEYER, G.; STEYER, J. **Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar.** *Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial*, v 46, no1, p. 23-27. 2010
2. BEIRÃO, E.M., FURTADO, J.J.D.; GIRARDELLO, R.; FERREIRA, H.F.; GALES, A.C. **Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Vol 15, no.1. 2011
3. TSAKRIS, A., KRISTO, I., POULOU, A., THEMELI-DIGALAKI, K., IKONOMIDIS, A., PETROPOLOU, D., POURNARAS, S., SOFIANOU, D. **Evaluation of Boronic Acid Disk Testes for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Clinical Laboratory.** *Journal of Clinical Microbiology*. p.362-367. Fev-2009
4. MEYER, G., PICOLI, S.U. **Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae***

- de hospital de emergência em Porto Alegre.** Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial. Vol 47. P.23-51. Fev 2011
5. OLIVEIRA, B.G.; ALBINI, C.A.; BOTÃO, G.M.D.; SOUZA, H.H.M. **A identificação direta pelos meios cromogênicos é confiável a ponto de dispensar as provas bioquímicas?.** Rev. NewsLab, Ed 75, p. 130-142. 2006
 6. SILVA, C.H.P.M. **Elaboration and Evaluation of a new screening medium for detection and presumptive identification of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms (ESBL).** Brazilian Journal of Microbiology, Vol 31, p. 271-274. 2000
 7. RAGHUNATHAN A., SAMUEL L., TIBBETTS R.J. **Evaluation of a real-time PCR assay for the detection of the Klebsiella pneumoniae carbapenemase genes in microbiological samples in comparison with the modified Hodge test.** American Journal of Clinical Pathology, Apr135(4), p.566-571. 2011
 8. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microorganismos multirresistentes,** Norma Técnica N°1, 2010.
 9. LOLANS K., CALVERT K., WON S., CLARK J., HAYDEN.M.A. **Direct Ertapenem Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in Surveillance Swab Specimens.** Journal of Clinical Microbiology.. Vol 48. P.836-842. Mar 2010
 10. MCGETTIGAN, S.E., ANDREACCHIO K., EDELSTEIN P.H. **Specificity of Ertapenem Susceptibility Screening for Detection of Klebsiella pneumoniae Carbapenemases.** Journal of Clinical Microbiology., VOL 47, P.785-786. MAR.2009
 11. ANDERSON, K.F.; LONSWAY,J.K.; RASHEED, J.B.; JENSEN B.; MCDUGAL L.K.; CAREY, R.B.; THOMPSON, S.; STOCKER, S.; LIMBAGO B.; PATEL J.B. **Evaluation of Methods To Identify the Klebsiella pneumoniae Carbapenemase in Enterobacteriaceae.** Journal of Clinical Microbiology, Vol45(8), p.2723-2725. 2007
 12. BRATU, S., MOOTY, M., NICHANI, S., LANDMAN D., GULLANS C., PETTINATO B., KARUMUDI U., TOLANEY P., QUALE J. **Emergence of KPC-Possessing pneumoniae in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations of Detection.** p.3018-3020. Jul 2005

13. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. M2-A8 Vol.23 No1. 2003** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf
14. BENENSON S., TEMPER V., COHEN M.J., SCHWARTZ C., HIDALGO-GRASS C., BLOCK C. **Imipenem Disc for Detection of KPC Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Practice.** *Journal of Clinical Microbiology.* Vol.49. p.1617-1620. Abr 2011 □
15. LAUTENBACH E., NACHAMKIN I., HU B., FISHMAN O.N., TOLOMEO P., PRASAD P., BILKER B.W., ZAOUTIS T.E. **Surveillance Cultures for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Diagnostic Yield of Anatomic Sites and Comparison of Provider- and Patient-Collected Samples.** *Infect Control Hosp Epidemiol.* Vol 30. P.380-382. Abr 2009
16. GASINK, L.B, EDELSTEIN P.H., LAUTENBACH E., SYNNESTVEDT M., FISHMAN, N.O. **Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*.** *Infect Control Hosp Epidemiology.* Vol 30. p.1180-1185. Dez 2009