

# Desempenho do disco de ertapenem como preditor da produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por bacilos Gram-negativos isolados de culturas em um hospital municipal de São Paulo

Ertapenem disk performance to predict *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase produced by Gram-negative bacilli isolated in a São Paulo city public hospital

Lais Pinto de Almeida<sup>1</sup>, Fabiana Puerro de Carvalho<sup>2</sup>, Alexandre Gimenes Marques<sup>1</sup>, Andrea dos Santos Pereira<sup>1</sup>, Renata Puzzo Bortoleto<sup>2</sup>, Marinês Dalla Valle Martino<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o desempenho do disco de ertapenem para prever micro-organismos produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Métodos:** Bacilos Gram-negativos isolados em cultura entre janeiro de 2010 e junho de 2011 foram testados por disco-difusão (Oxoid™) para ertapenem, meropenem e imipenem. As cepas consideradas intermediárias ou resistentes (halo ≤ 22mm) para ertapenem foram encaminhadas para a pesquisa do *bla<sub>KPC</sub>* por reação em cadeia da polimerase. Calcularam-se o valor preditivo positivo e a especificidade do disco. **Resultados:** Foram realizadas 21.839 culturas nesse período, sendo 3.010 (13,78%) positivas. Bacilos Gram-negativos foram isolados em 708 (23,52%) destas. A zona de inibição do disco de ertapenem foi ≤ 22mm para 111 (15,67%) dos isolados. A pesquisa do *bla<sub>KPC</sub>* caracterizou 40 cepas produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Não houve nenhum caso de disco intermediário ou resistente para meropenem ou imipenem com ertapenem sensível. O valor preditivo positivo foi de 36% e a especificidade calculada do disco de ertapenem para produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase foi de 89% em nosso serviço. **Conclusão:** A resistência ao disco de ertapenem não define bacilo produtor de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Mecanismos, como produção de outras betalactamases e perda de porinas, podem estar implicados. Sugere-se a necessidade da confirmação da presença do gene *bla<sub>KPC</sub>*. O ertapenem, portanto, mostrou-se fraco preditor para discriminar cepas produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

**Descritores:** Klebsiella; Carbapenêmicos; Farmacorresistência bacteriana múltipla

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate ertapenem disk performance to predict *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase production by Gram-negative bacilli. **Methods:** All Gram-negative bacilli isolated between January 2010 and June 2011 were tested by disk diffusion (Oxoid™) for sensitivity to ertapenem, meropenem and imipenem. Resistant or intermediate sensitivity strains (diameter ≤ 22 mm for ertapenem) were also tested for the *bla<sub>KPC</sub>* gene by polymerase chain reaction. Disk predictive positive value for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and specificity were calculated. **Results:** Out of the 21839 cultures performed, 3010 (13.78%) were positive, and Gram-negative bacilli were isolated in 708 (23.52%) of them. Zone of inhibition diameter for ertapenem disk was ≤ 22 mm for 111 isolates, representing 15.7% of all Gram-negative isolates. The PCR assay for *bla<sub>KPC</sub>* detected 40 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing strains. No strains intermediate or resistant to meropenem and imipenem were sensitive to ertapenem. The ertapenem disk presented a positive predictive value of 36% to predict *bla<sub>KPC</sub>* and 89% specificity. **Conclusion:** The resistance of Gram-negative bacilli detected by disk diffusion against ertapenem does not predict *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase production. Other mechanisms, such as production of other betalactamases and porin loss, may be implicated. The need to confirm the presence of the *bla<sub>KPC</sub>* is suggested. Therefore, ertapenem was a weak predictor for discriminating strains that produce *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

**Keywords:** Klebsiella; Carbapenems; Drug resistance, multiple, bacterial

Trabalho realizado no Hospital Municipal Dr. Moysés Deustch – M'boi Mirim, São Paulo (SP), Brasil; e no Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Hospital Municipal Dr. Moysés Deustch – M'boi Mirim, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Lais Pinto de Almeida – Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi – CEP: 05652-000 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-2530 – E-mail: laispinto@yahoo.com.br

Data de submissão: 5/7/2012 – Data de aceite: 25/10/2012

Conflitos de interesse: não há.

## INTRODUÇÃO

O ertapenem (ERT) é um beta-metil-carbapenêmico ativo contra bactérias Gram-negativas produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) ou AmpC, amplamente utilizado na prática clínica desde 2001. Nos Estados Unidos, a emergência de resistência aos carbapenêmicos está relacionada mais comumente à produção de carbapenemases, como as metalobetalactamases e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). No entanto, outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência a essa classe de antibióticos, como a perda de porinas em associação à produção de ESBL ou AmpC<sup>(1)</sup>.

A KPC é uma carbapenemase da classe A que inativa todos os betalactâmicos, identificada inicialmente em *Klebsiella pneumoniae*, porém descrita esporadicamente em outras enterobactérias. Essa enzima é codificada por sequências relacionadas à transposons e identificadas em plasmídios conjugativos com alto poder de disseminação<sup>(2)</sup>.

O reconhecimento de bacilos Gram-negativos (BGN) produtores de KPC é mandatório, uma vez que esses micro-organismos podem determinar infecções graves, e os carbapenêmicos (imipenem – IMP e meropenem – MER) são terapia de escolha para muitas infecções nosocomiais, além da identificação dos indivíduos portadores da bactéria permitir o controle da disseminação desses agentes. Uma ferramenta fenotípica ideal para identificação ainda não foi descrita; as que estão disponíveis não diferenciam os mecanismos de resistência<sup>(3,4)</sup>.

A recomendação atual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) consiste na realização de *screening* por disco-difusão com carbapenêmicos e na determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), seguidas da confirmação pela pesquisa do gene *bla*<sub>KPC</sub> por biologia molecular<sup>(5)</sup>. O disco de ERT é considerado marcador bastante sensível, porém os dados sobre sua especificidade são subjetivos e conflitantes, quando comparadas a literatura nacional e internacional<sup>(6-8)</sup>.

## OBJETIVOS

Avaliar o valor preditivo positivo e a especificidade do disco de ertapenem para predizer bacilos Gram-negativos produtores de KPC.

## MÉTODOS

BGNs isolados em culturas de material biológico, coletadas e processadas no Hospital Municipal Dr Moisés Deutch, em M´Boi Mirim (SP), entre janeiro de 2010 e junho de 2011, foram testados por disco-difusão (Oxoid™) para ERT, MER e IMP em placas de Agar

Mueller-Hinton (BioMérieux®). Utilizaram-se os critérios interpretativos sugeridos por Nota Técnica divulgada pela ANVISA, em 2010.

As cepas consideradas intermediárias ou resistentes para ERT (halo ≤ 22mm), MER (halo ≤ 20mm) ou IMP (halo ≤ 20mm) foram encaminhadas para a pesquisa do gene *bla*<sub>KPC</sub> por reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração do DNA foi realizada como descrito previamente. Utilizaram-se o *primer* direto 5´TCGCTAACTCGAACAGG3´ e o reverso 5´TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC3´ para amplificação.

Calcularam-se o valor preditivo positivo (VPP) e a especificidade do disco de ERT. O VPP foi calculado baseado na razão verdadeiro positivo (VP)/VP+falso positivo (FP), na qual VP representa as cepas positivas para o gene *bla*<sub>KPC</sub> e FP é o número de cepas resistentes para ERT, porém com PCR negativo. Assumindo a sensibilidade de ERT como 100%, a especificidade foi calculada pela razão d/b+d, sendo que d representa as cepas ERT sensíveis e b ERT resistente ou intermediário com pesquisa negativa para *bla*<sub>KPC</sub>.

## RESULTADOS

Foram realizadas 21.839 culturas de diversos materiais biológicos nesse período, sendo 3.010 (13,78%) positivas. BGN foram isolados em 708 (23,52%) destas.

A zona de inibição do disco de ERT foi ≤ 22mm para 111 (15,67%) dos isolados, sendo considerado resistente em 96 (86,48%) e intermediário em 15 (13,51%) delas. As cepas foram encaminhadas para pesquisa molecular.

A pesquisa do *bla*<sub>KPC</sub> caracterizou 40 cepas produtoras de KPC, sendo a *Klebsiella pneumoniae* identificada bioquimicamente em 38 casos e o *Enterobacter cloacae* em 2 casos. Os sítios de isolamento foram urina em 16 dos casos, *swab* retal/anal em 17, secreção traqueal em 4, sangue em 2 e secreção de abscesso pancreático em 1 dos casos. Onze dos pacientes infectados evoluíram a óbito. Em todos os casos positivos para o gene, o halo do disco de ERT foi considerado resistente. Não houve nenhum caso de disco intermediário ou resistente para MER ou IMP com ERT sensível.

Diante dos resultados obtidos, 40 cepas positivas para *bla*<sub>KPC</sub>, em 111 que resultaram resistentes ou intermediárias para ERT, dentre os 708 BGN isolados, o VPP foi de 36% e a especificidade calculada do disco de ERT para produção de KPC foi de 89% em nosso serviço.

## DISCUSSÃO

O estudo de Anderson et al.<sup>(7)</sup> ressalta, pelo potencial impacto clínico, a importância de realizar testes que avaliem a sensibilidade ao ERT, uma vez que se trata do

indicador mais sensível para detecção de KPC, independentemente do método utilizado. No entanto, Woodford et al.<sup>(8)</sup> descreveram que a resistência a esse carbapenêmico *in vitro* não é específica para a produção de KPC, principalmente quando considerados os centros onde bactérias produtoras de carbapenemases são incomuns.

Apresentam-se dados objetivos sobre o VPP e a especificidade do disco de ERT para predizer KPC em nosso serviço. Observou-se que a resistência ao disco de ERT não define BGN produtor de KPC. Outros mecanismos de resistência, como produção de outras betalactamases e perda de porinas, podem estar implicados. Portanto, o ERT mostrou-se fraco preditor para discriminar cepas produtoras de KPC em nossa coorte.

## CONCLUSÃO

Apesar dos esforços na busca de um método fenotípico ideal para rastrear a produção de KPC, ainda não há resultados que corroborem a utilização dessas ferramentas isoladamente. Muitos grupos trabalham atualmente na busca das melhores metodologias, sem conclusões definitivas. Reforçando as orientações da ANVISA, os dados obtidos apontam para a necessidade da confirmação da presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> por técnicas de biologia molecular para definição da produção de KPC.

## REFERÊNCIAS

1. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):969-74.
2. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, et al. Evaluation of Updated Interpretative Criteria for Categorizing *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Carbapenem Susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2010;48(12):4417-25.
3. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1631-9.
4. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):3018-20.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica 1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. 2010 [Internet]. [citado 2012 Jul 5]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Assunto+de+Interesse/Informes+e+Alertas/01+-+NOTA+TECNICA+GGTES+KPC>
6. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):785-6.
7. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2723-5.
8. Woodford N, Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME, et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(4):456-9.