ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

# Carbapenemase KPC-3 em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* numa unidade hospitalar

# *Klebsiella pneumoniae producing carbapenemase KPC-3 identified in hospital wards*

/ F. Calisto[1] / C. Caneiras[1] / S. Cerqueira[1] / L. Lito[2] / J. Melo-Cristino[2,3] / A. Duarte[1]

[1] iMed.UL-Research Institute for Medicines and Pharmaceuticals Sciences. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
[2] Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal
[3] Instituto de Microbiologia, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

Correspondência:
**Aida Duarte**
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Av. Prof. Gama Pinto
1649-003 Lisboa
Portugal
Telefone: +351 21 794 64 40
e-mail: aduarte@ff.ul.pt

**/ Resumo**

A emergência e disseminação global de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos é uma ameaça à saúde pública, pois estão associadas a altas taxas de morbilidade e mortalidade. Este estudo teve como objectivo caracterizar o gene $bla_{KPC-3}$, o seu ambiente genético e outras resistências associadas, em bactérias resistentes e com reduzida susceptibilidade aos carbapenemos no Centro Hospitalar de Lisboa Norte, EPE.

Quarenta e um isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* foram identificados entre Novembro de 2009 e Junho de 2011 e todos os isolados eram produtores de uma carbapenemase KPC-3.

Associada a esta carbapenemase foram detectados outras ß-lactamases: de espectro restrito TEM-1 e SHV-1; de espectro alargado SHV-12, SHV-35, CTX-M-15 e a cefalosporinase DHA-1. A ausência das porinas OmpK35 e OmpK36 da membrana externa justificou o aumento da resistência dos isolados para os carbapenemos e cefalosporinas.

O gene $bla_{KPC-3}$ está associado ao plasmídeo conjugativo do grupo de incompatibilidade IncF, com capacidade de conjugação entre diferentes géneros bacterianos o que justifica a facilidade de aquisição em estirpes do género *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Escherichia* provenientes de diferentes serviços nesta unidade hospitalar.

**Palavras-chave:** carbapenemase KPC-3, *Enterobacteriaceae*, disseminação horizontal e vertical.

***/ Abstract***

*The emergence and global spread of Enterobacteriaceae carbapenem-resistant is a public health threat because they are associated with high morbidity and mortality. The aim of this study was to characterize the* $bla_{KPC-3}$ *gene, their genetic environment and other resistances associated in bacteria with reduced susceptibility to carbapenems in the North of Lisbon Hospital Centre, EPE.*

*Forty-one clinical isolates of Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli and Citrobacter freundii were*

*identified between November 2009 and June 2011 and all isolates were KPC-3 carbapenemase producing.*
*Associated with this carbapenemase we detected other ß-lactamases: broad spectrum ß-lactamases, TEM-1 and SHV-1; extended-spectrum ß-lactamases SHV-12, SHV-35, CTX-M-15 and DHA-1 cefalosporinase. The absence of OmpK35 and OmpK36 outer membrane porins justify the increased of resistance in the strains to carbapenems and cephalosporins.*
*The gene* $bla_{KPC-3}$ *is associated with a plasmid, capable of conjugation between different genera of bacterial that explain their easy acquisition by strains of the genus* ***Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter*** *and* ***Escherichia*** *from different services in this hospital.*

***Palavras-chave:*** *KPC-3 carbapenemase, Enterobacteriaceae, hospital spread.*

## / Introdução

A emergência e disseminação global de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos é uma ameaça à saúde pública. Estirpes produtoras de carbapenemases são caracterizadas por resistência a todos os ß-lactâmicos (incluindo cefalosporinas e carbapenemos), fluoroquinolonas e aminoglicosídeos[1, 2, 3]. Infecções invasivas com estas estirpes estão associadas a altas taxas de morbilidade e mortalidade[2].

As carbapenemases do tipo KPC são as mais importantes neste grupo, na medida em que as estirpes que as produzem são responsáveis por infecções severas, associadas aos cuidados de saúde[4], e também pela multirresistência que apresentam aos antibióticos polimixina e tigeciclina, opções terapêuticas viáveis no tratamento de infecções hospitalares. Estas carbapenemases foram identificadas nos Estados Unidos da América[3], em 2001, e rapidamente verificou-se uma rápida disseminação de isolados produtores destas enzimas por todo o mundo, tendo sido identificada em Portugal em 2009[5].

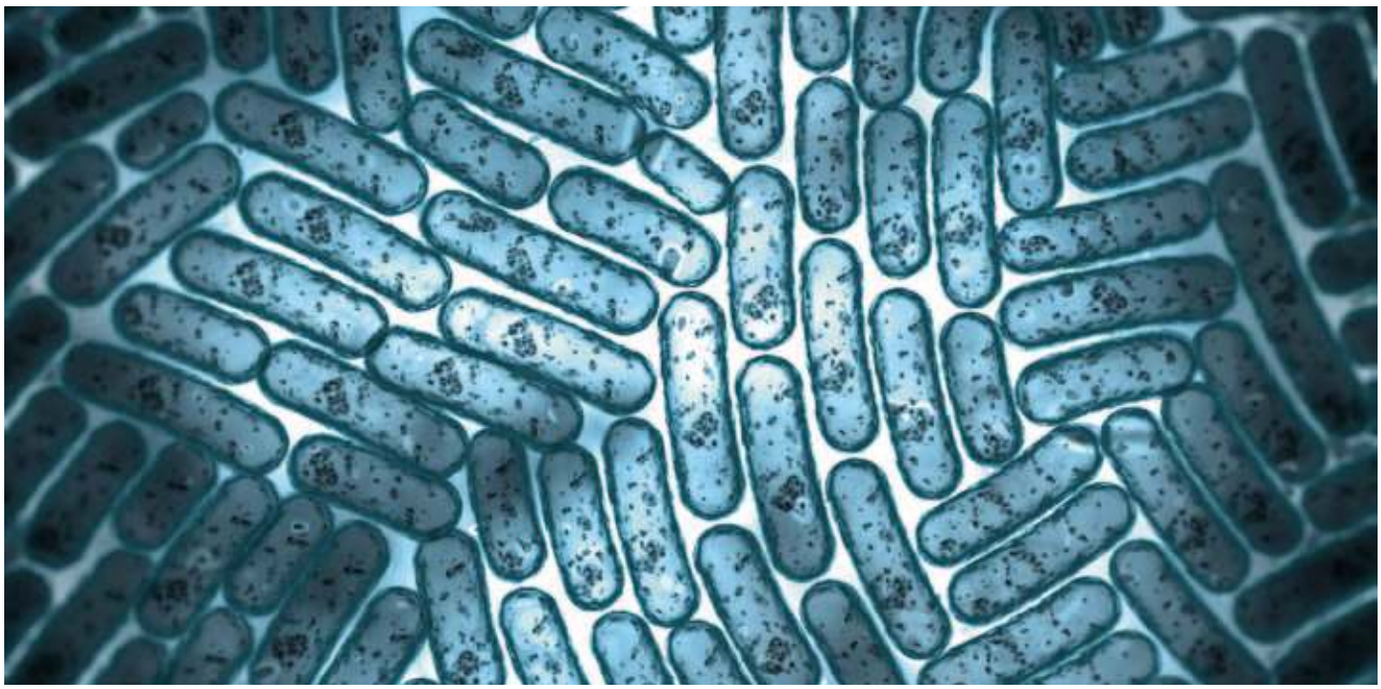
A mobilidade do gene $bla_{KPC}$ está associada a plasmídeos com diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade[6, 7, 8] e ao transposão Tn*4401*, um transposão do tipo Tn*3* com aproximadamente 10 kb[9].

Este estudo teve como objectivo caracterizar o gene $bla_{KPC-3}$, associado a outros genes de resistência e o ambiente genético onde estão inseridos, em bactérias com resistência ou reduzida susceptibilidade aos carbapenemos no Centro Hospitalar de Lisboa Norte.

## / Material e Métodos

***Amostras.*** Neste estudo caracterizou-se quarenta e um (n=41) isolados clínicos, *Klebsiella pneumoniae* (n=29), *Klebsiella oxytoca* (n=7), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *Escherichia coli* (n=2) e *Citrobacter freundii* (n=1), identificados de vários produtos biológicos, entre Novembro de 2009 e Julho de 2011, no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Lisboa Norte e foram seleccionados por apresentarem resistência ou reduzida susceptibilidade aos carbapenemos.

***Susceptibilidade aos antibióticos.*** O estudo da susceptibilidade aos antibióticos foi efectuado segundo o método de difusão Kirby-Bauer, em meio Müeller-Hinton agar (MH) e interpretado de acordo com os critérios do CLSI-*Clinical and Laboratory Standards Institute*[10], para a tigeciclina foram considerados os critérios da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*[11], com os discos de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonamo (30 µg), imipenemo (10 µg), meropenemo (10



µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tigeciclina (15 µg), nitrofurantoína (300 µg) e fosfomicina (200 µg).

*Caracterização molecular.* Para avaliar a relação clonal entre os isolados clínicos dentro da mesma espécie recorreu-se aos métodos de tipificação genómica M13 e BOX *fingerprinting*. Os *primers* e as condições de PCR usados para o M13-PCR *fingerprinting* foram descritos por Grundmann *et al.*, 1997[12]. Para o perfil genético dos isolados obtido por BOX *fingerprinting* utilizou-se as condições de PCR previamente descritas por Anjali Tikoo *et al.*[13].

A técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), baseada na análise de fragmentos internos de genes *housekeeping*, foi aplicada em quatro isolados de *K. pneumoniae*, correspondentes aos perfis de M13 e BOX *fingerprinting* mais representativos. Os *primers* e condições de PCR foram descritos por Diancourt *et al.*, 2005[14]. As sequências nucleotídicas obtidas permitem definir alelos de cada *locus* e, de acordo com a combinação de alelos é possível identificar a sequência tipo (*Sequence Type* – ST), na base de dados do Instituto Pasteur (www.pasteur.fr/mlst).

*Identificação dos factores de resistência.* A presença de carbapenemases, sugeridas pela resistência ou baixa susceptibilidade aos carbapenemos, foi pesquisada através de reacções de PCR utilizando *primers* especificos para os genes $bla_{KPC}$[3], $bla_{IMP}$[15], $bla_{VIM}$[16], $bla_{NDM}$[17], $bla_{OXA}$[18]. Para além dos genes que codificam para carbapenemases, foram pesquisados os genes de resistência $bla_{TEM}$ e $bla_{SHV}$[19], $bla_{CTX-M}$[20], $bla_{DHA}$[21], $bla_{CMY}$[22] e os genes *ompK35* e *ompK36* que codificam as porinas OmpK35 e OmpK36 da membrana externa de *K. pneumoniae*.

*Transferência dos blaKPC-3 e caracterização plasmídica.* A identificação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos foi efectuada pela técnica de *Replicon Typing*, desenvolvida por Carattoli *et al.*, 2005[23]. Esta técnica permitiu identificar as origens de replicação de plasmídeos pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade (IncHI1, IncHI2, IncI1-Iγ, IncX, IncL/M, IncN, IncFIA, IncFIB, IncW, IncY, IncP, IncFIC, IncA/C, IncT, IncFIIAs, IncK, IncB/O, IncF).

Posteriormente, a transferência do gene $bla_{KPC-3}$ à estirpe de referência e receptora E. coli J53 azida resistente (AziR) foi efectuada por conjugação. Os transconjugantes foram seleccionados em Müeller-Hinton agar suplementado com azida de sódio (100 µg/mL) e cefotaxima (1 µg/mL).

*Métodos moleculares.* Todas as reacções de PCR foram efectuadas num volume de 20 µL, usando a DyNAzyme™ II PCR Master MIX (Finnzymes), de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1%, em TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) e corados com GelRed (Biotium).

Os produtos de PCR para sequenciação foram purificados através do kit *JETQUICK Spin Column Technique* (GENOMED), segundo as instruções do fabricante, e ambas as cadeias foram sequenciadas pelo serviço da Macrogen Korea. As sequências nucleotídicas foram analisadas e comparadas com as existentes na base de dados Genbank, recorrendo aos programas informáticos BLASTN e ClustalW, disponíveis *on line*.

## / Resultados

Entre Novembro de 2009 e Junho de 2011 foram identificados 41 isolados multirresistentes, incluindo os carbapenemos. Entre estes isolados encontraram-se as espécies: *Klebsiella pneumoniae* (n=29),

**TABELA I – CARACTERÍSTICAS DOS 41 ISOLADOS CLÍNICOS, PRODUTORES DA CARBAPENEMASE KPC-3, PROVENIENTES DO CENTRO HOSPITALAR DE LISBOA NORTE**

| ID | Nº Doente | Colheita | Isolado | Serviço | Produto |
|---|---|---|---|---|---|
| FF2833 | 1 | 12.11.09 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade Intermédia P8 | Secreção Brônquica |
| FF2909 | 2 | 3.12.09 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica P8 | Urina |
| FF2948 | 3 | 5.02.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade Intermédia P8 | Pus |
| FF2954 | 4 | 11.02.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade Intensiva P8 | Urina |
| FF2958 | | 15.02.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade Intensiva P8 | Sangue |
| FF2959 | | 15.02.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade Intensiva P8 | Sangue |
| FF2955 | 5 | 12.02.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade intermédia P8 | Secreção Brônquica |
| FF2949 | 6 | 09.12.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Cardiotorácica Unidade Intensiva P8 | Urina |
| FF2999 | | 18.02.10 | *K. pneumoniae* | S. O. Cirurgia I P3 | Pus |
| FF3016 | 7 | 5.03.10 | *E. aerogenes* | Cirurgia Cardiotorácica P8 | Pus |
| FF3023 | 8 | 10.03.10 | *E. coli* | Cirurgia I P3 | Pus |
| FF3034 | 9 | 16.03.10 | *K. oxytoca* | S. O. Cirurgia I P3 | Exsudado Purulento |
| FF3042 | | 18.03.10 | *K. oxytoca* | S. O. Cirurgia I P3 | Líquido Peritoneal |
| FF3051 | | 29.03.10 | *K. oxytoca* | Medicina Intensiva | Sangue |
| FF3046 | 10 | 26.03.10 | *K. pneumoniae* | S. O. Cirurgia I P3 | Sangue |
| FF3075 | 11 | 30.04.10 | *K. pneumoniae* | S. O. Cirurgia I P3 | Secreção Brônquica |
| FF3084 | 12 | 18.05.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Sangue |
| FF3108 | 13 | 26.06.10 | *K. pneumoniae* | S. O. Cirurgia Vascular P4 | Urina |
| FF3116 | 14 | 13.07.10 | *K. pneumoniae* | Transferido Centro de Saúde | Secreção Brônquica |
| FF94182 | 15 | 1.08.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Pus |
| FF29078 | 16 | 19.10.10 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Urina |
| FF35345 | 17 | 5.11.10 | *E. aerogenes* | Cirurgia Cardiotorácica P8 | Sangue |
| FF43201 | 18 | 20.11.10 | *K. pneumoniae* | Consulta externa Cirurgia I P3 | Urina |
| FF43727 | 19 | 1.12.10 | *K. pneumoniae* | Consulta externa Cirurgia I P3 | Pus |
| FF95331 | | 20.04.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Pus |
| FF61095 | 20 | 19.01.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia P5 | Urina |
| FF67671 | 21 | 4.02.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Vascular P4 | Pus |
| FF69633 | 22 | 9.02.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Pus |
| FF72562 | 23 | 17.02.11 | *K. pneumoniae* | Neurologia P7 | Urina |
| FF73977 | 24 | 21.02.11 | *K. pneumoniae* | Unidade Cuidados Intensivos Pneumologia | Pus |
| FF76635 | 25 | 28.02.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia Vascular P4 | Pus |
| FF78588 | | 4.03.11 | *E. coli* | Cirurgia Vascular P4 | Pus |
| FF84337 | 26 | 22.03.11 | *K. oxytoca* | Pro Cirurgia I P3 | Pus |
| FF85815 | | 26.03.11 | *K. oxytoca* | Pro Cirurgia I P3 | Pus |
| FF87733 | | 31.03.11 | *K. oxytoca* | Cirurgia I P3 | Líquido ascítico |
| FF10424 | | 6.05.11 | *K. oxytoca* | SO Cirurgia I P3 | Líquido ascítico |
| FF87582 | 27 | 30.03.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Urina |
| FF91488 | 28 | 11.04.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Urina |
| FF98197 | 29 | 29.04.11 | *C. freundii* | Medicina II | Urina |
| FF22073 | 30 | 9.06.11 | *K. pneumoniae* | Cirurgia I P3 | Urina |
| FF31149 | 31 | 9.07.11 | *K. pneumoniae* | Pneumologia | Urina |

SO, Sala de Observações da Urgência; P3, piso 3; P4, piso 4; P5, piso 5; P8, piso 8.

*Klebsiella oxytoca* (n=7), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *Escherichia coli* (n=2) e *Citrobacter freundii* (n=1) isolados de diferentes produtos biológicos: pus (n=13), urina (n=14), sangue (n=6), secreções brônquicas (n=4), exsudado purulento (n=1), líquido peritoneal (n=1) e líquido ascítico (n=2). A maioria dos isolados (n=35, 85,4%) era proveniente de 31 doentes hospitalizados nos serviços de cirurgia, localizados em diferentes pisos (P), do Centro Hospitalar de Lisboa Norte, (Tabela I).

Do estudo da susceptibilidade aos antibióticos, frequentemente utilizados na prática clínica, ß-lactâmicos, aminoglícosidos, quinolonas, verificou-se a maior percentagem (Figura 1) de resistência à ceftazidima 97,6%, amoxicilina/ácido clavulânico 95,1%, cefotaxima 87,8%, e cefoxitina 58,5%. No grupo dos carbapenemos, o imipenemo foi o antibiótico com menor percentagem de resistência 53,7%, enquanto para o meropenemo verificou-se um valor de 87,8%. Para os restantes antibióticos as percentagens de resistência foram para a gentamicina 48,1%, seguida da tigeciclina 41,5% e ciprofloxacina 29,3%. A tigeciclina e a gentamicina foram os antibióticos em que se verificou uma maior percentagem de estirpes com susceptibilidade intermédia de 50% e 24,4%, respectivamente. Todas as estirpes mostraram susceptibilidade à fosfomicina.

Em todos os isolados foi identificada uma ß-lactamase da classe A de Ambler, classificada como carbapenemase do tipo serina, KPC-3 com capacidade hidrolítica para os antimicrobianos: imipenemo, meropenemo, aztreonamo, ceftazidima, cefotaxima, cefepima e cefoxitina. Não foram detectados os genes de outras carbapenemases incluídas no grupo B metalo-b-lactamases ($bla_{NDM}$, $bla_{IMP}$, $bla_{VIM}$) e do grupo D ($bla_{OXA-48}$).

Pelo menos uma ß-lactamase de espectro restrito TEM-1 (88%) e SHV-1 (65%) foi encontrada associada à carbapenemase KPC-3 em todos os isolados. As ß-lactamases de espectro alargado (ESBLs) foram identificadas em 17,1% dos isolados, nomeadamente: a SHV-35 em K.

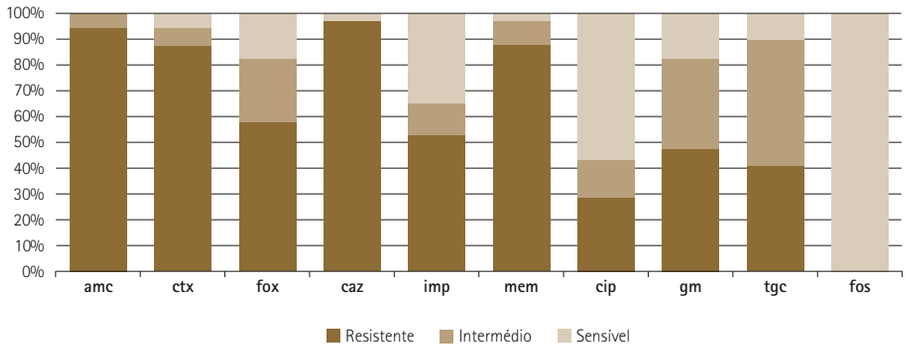



**Figura 1:** Susceptibilidade aos antibióticos dos 41 isolados clínicos, produtores da carbapenemase KPC-3. **amc** – amoxicilina/ácido clavulânico; **ctx** – cefotaxima; **fox** – cefoxitina; **caz** – ceftazidima; **imp** – imipenemo; **mem** – meropenemo; **cip** – ciprofloxacina; **gm** – gentamicina; **tgc** – tigeciclina; **fos** – fosfomicina.

pneumoniae FF2999, a SHV-12 em K. oxytoca FF3051 e a cefotaximase CTX-M-15 em cinco isolados de K. pneumoniae. A cefalosporinase DHA-1, ß-lactamase da classe C, foi detectada em três isolados de K. oxytoca (Figura 2).

A presença da carbapenemase KPC-3 não explica, por si só, o perfil de resistência aos carbapenemos. A resistência ao imipenemo e meropenemo pode estar associada à alteração da permeabilidade da membrana externa[24]. Modificações estruturais das porinas, por mutação ou deleção nos genes *ompK35* e/ou *ompK36* em *Klebsiella* spp contribuem para maior resistência ao meropenemo, ertapenemo, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima e cefepima[25, 26, 27]. Estes genes codificam para as porinas OmpK35 e OmpK36 da membrana externa responsáveis pela entrada dos carbapenemos na célula bacteriana. Nos 14 isolados (34,1%) com menor susceptibilidade ao meropenemo e ao imipenemo não se detectou o gene *ompK35*, assim como para um isolado, os dois genes *ompK35* e *ompK36*. Os restantes isolados não apresentaram alteração na sequência nucleotídica dos genes *ompK35* e *ompK36*, pelo que implicitamente se pode deduzir que a resistência aos carbapenemos nestes isolados se deve a um elevado número de cópias do gene e/ou a uma elevada expressão do gene $bla_{KPC-3}$.

Todos os isolados possuíam plasmídeos inseridos em diferentes grupos de incompatibilidade, dos quais o predominante foi o IncF (85%) (Figura 3). Verificou-se também a existência doutros grupos IncFIA (15%), IncA/C (10%), IncFIC (20%), IncHI1 (20%) e IncHI2 (15%). Por conjugação com a estirpe receptora *E. coli* J53, resistente à azida sódica, verificou-se a transferência de um plasmídeo do grupo IncF. Todos os transconjungantes apresentaram perfis de susceptibilidade semelhantes às estirpes dadoras, com resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima e ceftazidima, enquanto para os carbapenemos e cefoxitina diminuição da susceptibilidade, dado que não estavam sobre a influência das porinas.

Para a caracterização molecular recorreu-se a duas técnicas de tipificação M13 e BOX, o que permitiu confirmar alguns resultados e definir 11 perfis electroforéticos entre os 29 isolados de *K. pneumoniae*. O perfil **A** predominante foi encontrado nas estirpes provenientes de cinco doentes do Serviço de Cirurgia Cardiotorácica (FF2833, FF2909, FF2948, FF2954, FF2958, FF2959 e FF2955) enquanto o perfil **B**, diferente do perfil **A** apenas numa banda, foi identificado na estirpe FF2949 de outro doente deste serviço. As restantes estirpes de *K. pneumoniae* (n=18) apresentaram perfis electroforéticos distintos. Todos os isolados pelo método MLST (Multi Locus Sequence Typing) foram incluídos na mesma sequência tipo ST14.

Nos restantes isolados *K. oxytoca* (n=7), *E. coli* (n=2) e *Enterobacter aerogenes* (n=2) não apresentaram perfis electroforéticos distintos entre os isolados da mesma espécie.

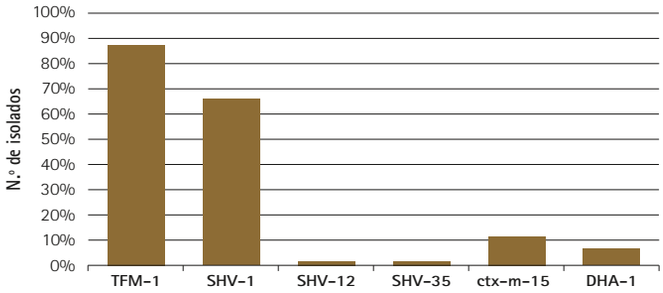



**Figura 2:** ß-lactamases encontradas nos 41 isolados clínicos associadas à carbapenemase KPC-3.

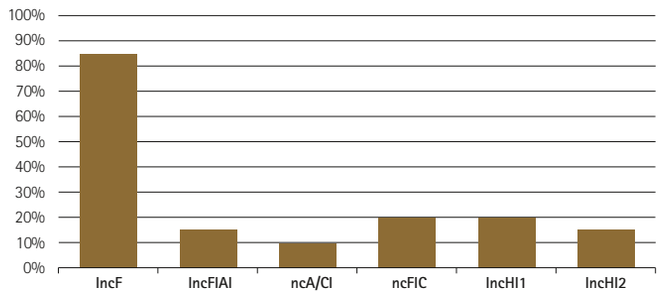



**Figura 3:** Grupos de incompatibilidade dos plasmídeos detectados nos 41 isolados clínicos, produtores da carbapenemase KPC-3.

## / Discussão

A emergência e disseminação global de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos constituim uma ameaça à saúde pública. Estirpes produtoras de carbapenemases do grupo serina KPC-3 são caracterizadas por resistência a todos os ß-lactâmicos, incluindo cefalosporinas, carbapenemos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos [1, 2].

A associação da ß-lactamase SHV-1 e/ou TEM-1 com a carbapenemase KPC-3 é observada em todos os isolados. Estas ß-lactamases de espectro restrito, identificadas em 1965, são encontradas frequentemente em *Enterobacteriaceae* e conferem resistência às penicilinas e às cefalosporinas de 1.ª geração[28]. As ESBLs foram identificadas em 17,1% dos isolados, hidrolizam as cefalosporinas de espectro alargado e quando associadas à carbapenemase KPC-3 conferem um espectro de resistência mais alargado aos antibióticos b-lactâmicos, inclusive aos carbapenemos. A enzima SHV-35, apenas encontrada no Reino Unido (GenBank: AY070258.1), foi identificada no isolado *K. pneumoniae* FF2999 que apresentou um fenótipo de maior resistência à cefepima, cefalosporina de 4.ª geração, quando comparado com o da estirpe FF2949 isolada dois meses antes do mesmo doente e com um perfil genómico igual. Embora estas estirpes tenham o gene $bla_{KPC-3}$ num plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncF, a estirpe FF2999 adquiriu outro plasmídeo do grupo IncFIA onde estava localizado o gene $bla_{SHV-35}$. No isolado FF3051 identificou-se a enzima SHV-12, estando descrita a associação desta ESBL com a carbapenemase KPC-2 em França[29] e que difere da SHV-1 por substituição de três aminoácidos, o que se traduz por um aumento da resistência à ceftazidima e cefotaxima[30]. A associação da carbapenemase KPC-3 com a cefotaximase CTX-M-15 foi observada em cinco isolados (FF29078, FF43201, FF43727, FF91488, FF95331) identificadas com o mesm ST14, mas diferente da estirpe *K. pneumoniae* ST11, encontrada em 2009, nos Países Nórdicos[31].

As ß-lactamases AmpC plasmídicas, também designadas de cefalosporinases, encontram-se disseminadas entre as *Enterobacteriaceae*. A cefalosporinase DHA-1 associada a penicilinase KPC-3 foi identificada em dois isolados de *K. oxytoca*, ambos provenientes do mesmo doente e com elevada resistência para a cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, aztreonamo e carbapenemos. Este fenótipo de resistência deve-se não só às duas enzimas, como também, à ausência da expressão da proteína de transporte da membrana externa a porina OmpK35. Até à data não foi descrita a associação da DHA-1 com a KPC-3, apenas com a variante KPC-2[32].

A localização do gene $bla_{KPC}$ tem sido observada em plasmídeos de diversos tamanhos, que podem apresentar mais de uma cópia do gene, demonstrando alta capacidade de mobilização[33, 34]. Dos diferentes grupos de incompatibilidade de plasmídeos encontrados é ao grupo IncF que o gene $bla_{KPC-3}$ está associado. Este plasmídeo apresenta uma elevada capacidade de transferência tendo sido demonstrado pela taxa de transferência *in vitro* após conjugação com a estirpe de referência *E. coli* J53 azida resistente, como também *in vivo* pela disseminação entre os géneros bacterianos *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Escherichia coli* identificados durante o estudo.

A técnica MLST, utilizada na caracterização de isolados bacterianos, permite a análise de sequências de genes conservados (*housekeeping*), que são comparadas numa base de dados internacional, facilitando a troca de informação e o estudo da disseminação das estirpes à escala global[35]. De acordo com a combinação de alelos, identificou-se apenas uma sequência tipo ST14 para todos os isolados, embora tenham sido detectados diferentes perfis genómicos. Este resultado é consistente com as técnicas utilizadas, o M13 e BOX *fingerprinting* que permitem detectar rearranjos cromossomais causados por elementos móveis, enquanto no MLST a análise baseia-se na homologia de genes conservados, sendo assim mais apropriado para estabelecer filogenias em larga escala. Estirpes com um mesmo ST podem então apresentar diferentes perfis genómicos com outros métodos de tipificação baseados na reacção de PCR[36]. As estirpes de *K. pneumoniae* ST14, com um elevado potencial de disseminação a nível global, têm sido descritas como responsáveis por *outbreaks*, inclusivamente Oteo *et al.* (2009) referem esta estirpe como o "novo MRSA" devido à sua distribuição internacional e aos marcadores de resistência que lhe estão associados, incluindo a metalo-ß-lactamase NDM-1[37]. Efectivamente todas as estirpes de *K. pneumoniae* produtoras da carbapenemase KPC-3 são do grupo ST14, com excepção das duas primeiras estirpes de *K. pneumoniae* ST11

identificadas, pela primeira vez em Portugal, numa unidade pediátrica deste Hospital em 2009[5]. A estirpe ST11 não foi detectada posteriormente tendo sido substituida pela estirpe ST14, pelo que podemos inferir não só a disseminação clonal da *K. pneumoniae* ST14, mas também a disseminação de um plasmídeo contendo o gene $bla_{KPC-3}$ entre diferentes espécies bacterianas.

O controlo de uma infecção associada aos cuidados de saúde e o estudo epidemiológico pressupõem o conhecimento do parentesco biológico e genético entre as bactérias multirresistentes. A necessidade de determinar a relação entre os microrganismos surge, durante o aparecimento de surtos com origem em bactérias da mesma espécie e com o mesmo fenótipo de resistência antimicrobiana, permitindo identificar uma disseminação clonal ou plasmídica e em algumas situações a fonte de infecção. Durante o tempo que decorreu este estudo,no doente D1 do sexo masculino, 72 anos, transferido do Hospital da área de residência para o Serviço de Cirurgia Cardiotorácica do Hospital de Santa Maria, foi isolada da expectoração, a 12 de Novembro de 2009, a estirpe de *K. pneumoniae* FF2833 produtora da KPC-3. Posteriormente, neste serviço, em cinco doentes (D2-D6) foram identificados oito isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos. De acordo com a caracterização molecular todos os isolados apresentaram o mesmo **perfil A**, o que pode confirmar a disseminação clonal de uma estirpe por transmissão cruzada entre doentes. No doente D6, do sexo masculino com 93 anos, a 9 de Fevereiro de 2010, foi identificado um isolado com o perfil **B** diferindo do primeiro com o perfil **A** numa banda electroforética, sugerindo mutações ou inserções ao nível do genoma. Este doente foi posteriormente transferido para o Serviço de Cirurgia I. Desde então, neste Serviço foram detectados isolados de *Klebsiella* spp., com diferentes perfis genómicos, assim como estirpes de *E. coli* produtoras da carbapenemase KPC-3, reforçando neste caso a transmissão por transferência horizontal de plasmídeos entre géneros diferentes.

## / Conclusão

Neste estudo verificou-se a disseminação da carbapenemase KPC-3 por transmissão horizontal entre as diferentes espécies bacterianas *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. aerogenes* e *C. freundii*, associada ao plasmídeo conjugativo do grupo de incompatibilidade IncF.

O gene $bla_{KPC-3}$ foi encontrado maioritariamente em isolados de *K. pneumoniae* ST14. Estas estirpes têm um elevado potencial de disseminação e de virulência, sendo frequentemente responsáveis por surtos hospitalares a nível mundial.

O conhecimento dos mecanismos resistência aos antibióticos e da caracterização molecular das estirpes hospitalares aumenta a capacidade dos microbiologistas e epidemiologistas na monitorização da propagação da resistência aos antibióticos entre unidades de saúde e a comunidade.

## / Bibliografia


1. Bilavsky E, Schwaber MJ, Carmeli Y. "How to stem the tide of carbapenemase-producing enterobacteriaceae?: proactive versus reactive strategies". *Curr Opin Infect Dis.* 2010; 23:327-31.

2. Stuart CJ, Leverstein-Van HMA. "Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae". *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36:205-10.

3. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. "Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*". *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:1151-61.

4. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. "KPC carbapenemases: what is at stake in clinical microbiology?". *Pathol Biol.* 2010; 58:39-45.

5. Machado P, Silva A, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST-11 producing KPC-3 carbaoenemase at a Lisbon hospital". *Clin Microbiol Infect.* 2010; Supl:16.

6. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR, Hujer KM, Perez F, Hutton RA, Fox WR, Hall GS, Jacobs MR, Paterson DL, Rice LB, Jenkins SG, Tenover FC, Bonomo RA. "Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States". *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2680-2.

7. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB, Moland S, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. "Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp". *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:4438-40.

8. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, Newton DW, Patel JB. "Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid". *J Clin Microbiol.* 2008;46: 2066-9.

9. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. "Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene". *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1257-63.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M-100-S20, 2010; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

11. EUCAST Disk Diffusion Test for Routine Antimicrobial Susceptibility Testing. http://www.eucast.org/eucast_disk_diffusion_test/ ( January 2011, date last accessed).

12. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M. "Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp". *J Clin Microbiol.* 1997; 35:3071-7.

13. Tikoo A, Tripathi AK, Verma SC, Agrawal N, Nath G. "Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of *Salmonella* isolates". *Current Science.* 2001; 80, 8:1449-1452

14. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. "Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates". *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4178-82.

15. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. "PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams". *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2909-13.

16. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, "Livermore DM. bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital". *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 ; 46 :1053-8.

17. Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. "NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman". *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:304-6.

18. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. "Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae". *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:15-22.

19. Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. "beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa". *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:1350-4.

20. Conceicao T, Brizio A, Duarte A, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ. "First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal". *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:477-8.

21. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan". *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3121-6.

22. Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. "CMY-2-producing *Salmonella enterica, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000)". *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:383-9.

23. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL,Threlfall EJ. "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing". *J Microbiol Methods.* 2005; 63:219-28.

24. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, Patel JB. "Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*". *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:4201-7.

25. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. "*Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence". *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:1485-93.

26. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. "Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*". *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:3203-6.

27. Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomas JM, Alberti S, Benedi VJ. "Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance". *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3332-5.

28. Bush K. "Bench-to-bedside review:The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections". *Crit Care.* 2010; 14:224.

29. Kassis-Chikhani N, Decre D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, Dussaix E, Arlet G. "Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital". *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1539-40.

30. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. "Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12". *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:943-9.

31. Samuelsen O, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. "Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden". *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63:654-8.

32. Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. "Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA". *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:3967-9.

33. Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Xu Y, Chen M. "Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China". *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:573-7.

34. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. "Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital". *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:1998-2004.

35. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms". *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95:3140-5.

36. Vimont S, Mnif B, Fevre C, Brisse S. "Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates". *J Med Microbiol.* 2008; 57:1308-10.

37. Oteo J, Cuevas O, Lopez-Rodriguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Perez-Vazquez M, Bautista V, Arroyo M, Garcia-Caballero J, Marin-Casanova P, Gonzalez-Sanz R, Fuentes-Gomez V, Ona-Compan S, Garcia-Cobos S, Campos J. "Emergence of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults". *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:524-8.