



## Disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemase KPC-3

Vera Manageiro, Eugénia Ferreira, Deolinda Louro,  
Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP),  
Manuela Caniça

manuela.canica@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções  
Associadas aos Cuidados de Saúde, Departamento de Doenças Infecciosas. INSA.

### Introdução

A emergência e rápida disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases constitui um problema crescente, com consequências importantes no tratamento e controle de infeção, nomeadamente em Portugal. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos de resistência envolvidos na suscetibilidade diminuída aos carbapenemos em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*.

### Material e métodos

Foram estudados 61 isolados de *Enterobacteriaceae* (26 *Klebsiella* spp., 15 *Escherichia coli*, 9 *Enterobacter* spp, 6 *Morganella morganii*, 4 *Proteus mirabilis* e 1 *Serratia marcescens*), enviados ao Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) provenientes de hospitais portugueses, no âmbito do programa *Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal* (ARSIP), de vigilância laboratorial da suscetibilidade aos antibióticos.

A maioria das amostras foi isolada a partir da urina de doentes ( $\geq$  65 anos) do sexo masculino, em 4 regiões distintas de Portugal.

A caracterização da suscetibilidade aos antibióticos foi efetuada pelo método de difusão em disco, e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo as normas da SFM/2012 (<http://www.sfm-microbiologie.org/>) e do EUCAST/2012 ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)), respetivamente.

Os isolados que apresentavam suscetibilidade diminuída ao imipenemo, meropenemo e/ou ertapenemo, e sinergia destes carbapenemos com o ácido borónico (e/ou ácido clavulânico), foram considerados putativos produtores de carbapenemases de classe A.

As técnicas de PCR e sequenciação foram utilizadas para detetar e identificar os genes que codificam  $\beta$ -lactamases, assim como para o estudo do respetivo ambiente genético.

A transferência dos genes *bla*<sub>KPC-3</sub> para um sistema isogénico, foi efetuado por conjugação e eletroporação, a identificação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos por *PCR-Based Replicon Typing* e o estudo da diversidade genética dos isolados de *K. pneumoniae* por *Multilocus Sequence Typing*, ([www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html](http://www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html)).

### Resultados e discussão

Dos 61 isolados estudados, 20 foram considerados putativos produtores de carbapenemases de Classe A. No entanto, confirmou-se esta produção em 6 isolados (5 *Klebsiella pneumoniae* e 1 *Enterobacter cloacae*), os quais apresentavam um fenótipo de multirresistência (resistência a pelo menos três classes de antibióticos estruturalmente não relacionadas) e suscetibilidade apenas à colistina (**Tabela 1**).

A caracterização genotípica confirmou o fenótipo, pois identificou a sequência correspondente ao gene que codifica a carbapenemase KPC-3, em co-expressão com  $\beta$ -lactamases parentais (TEM-1, SHV-1, SHV-14, SHV-146, OXA-30), conferem resistência aos inibidores (SHV-26) e de espectro alargado (CTX-M-15) (**Tabela 1**).

A montante do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> foi identificado o transposão Tn4401 (variante d) com uma deleção de 68 nucleótidos, na zona do promotor (**Figura 1**); esta variante, até à data, foi apenas descrita nos Estados Unidos da América e no Canadá, associada a uma elevada resistência aos carbapenemos.

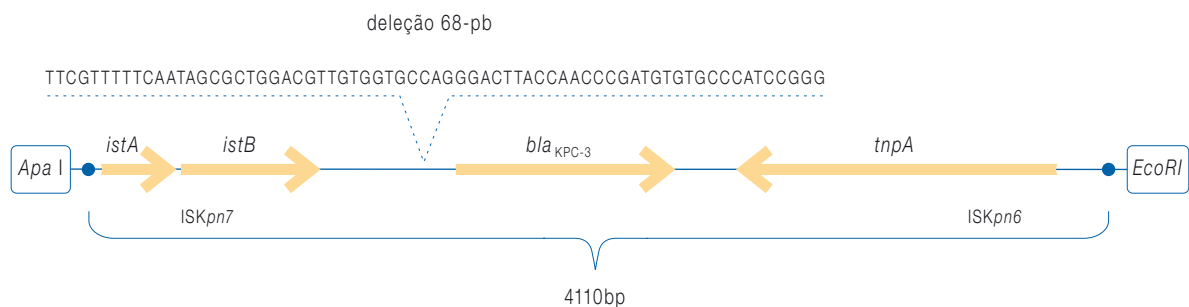
Foram identificados plasmídeos inseridos em diferentes grupos de incompatibilidade, dos quais apenas o IncFrepB foi transferido horizontalmente com o gene *bla*<sub>KPC-3</sub> (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características dos isolados produtores de KPC-3.

Isolado	Hospital	Suscetibilidade <sup>a</sup>	MLST <sup>b</sup>	PBRT <sup>c</sup>	β-lactamases identificadas
<i>K. pneumoniae</i> INSRA10302	C	B, C, A, S, T	ST14	NT	KPC-3 + TEM-1 + SHV-1 + SHV-1
<i>E. cloacae</i> INSRA11054	A	B, C, A, S, T, Q	-	NT	KPC-3
<i>K. pneumoniae</i> INSRA12031	A	B, C, A, S, T, Q, F	ST34	IncFrepB, IncFIIIs	KPC-3 + TEM-1 + SHV-26
<i>K. pneumoniae</i> INSRA12267	D	B, C, A, S, T, Q	ST960	IncFrepB, IncFIIIs	KPC-3 + TEM-1 + SHV-164 <sup>d</sup>
<i>E. coli</i> DH5α-KPC-3 (p12267) <sup>e</sup>	-	B, C, A, S	-	IncFrepB	KPC-3 + TEM-1
<i>K. pneumoniae</i> INSRA13165	B	B, C, A, S, T, Q	ST416	IncFrepB, IncFIIIs	KPC-3 + TEM-1 + SHV-14 + OXA-30 + CTX-M-15
<i>K. pneumoniae</i> INSRA14159	A	B, C, A, S, Q	ST59	IncFrepB, IncP	KPC-3 + TEM-1
<i>E. coli</i> K12 C600-KPC-3 (p14159) <sup>f</sup>	-	B, C, A, S	-	IncFrepB	KPC-3 + TEM-1

<sup>a</sup> Perfil de suscetibilidade diminuída aos seguintes antibióticos: B (amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ticarcilina, piperacilina, piperacilina/tazobactame, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefixima, cefpodoxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, e/ou aztreonam); C (imipenemo, meropenemo e/ou ertapenemo); A (canamicina, gentamicina e/ou ampicacina); S (co-trimoxazol), T (tigeciclina); Q (ácido nalidixico, norfloxacina, pefloxacina e/ou ciprofloxacina); F (fosfomicina); <sup>b</sup> MLST, *Multilocus Sequence Typing*; <sup>c</sup> PBRT, *PCR-Based Replicon Typing*; <sup>d</sup> β-lactamase parental, aqui descrita pela primeira vez (*accession number* HE981194); <sup>e</sup> Transformante do isolado clínico *K. pneumoniae* INSRA12267; <sup>f</sup> Transconjugante do isolado clínico *K. pneumoniae* INSRA14159; NT, não tipável.

Figura 1: Representação do transposão Tn4401 (variante d) contendo o gene *bla*<sub>KPC-3</sub>.



Verificou-se ainda que os isolados de *K. pneumoniae* pertenciam a diferentes sequências tipo (Tabela 1), como o ST14, que tem também sido descrito associado a isolados de *K. pneumoniae* produtores da metalo-β-lactamase NDM, o ST146, associado a um clone epidémico produtor da cefalosporinase DHA-1, e o ST960, identificado pela primeira vez neste estudo.

Em conclusão, o presente estudo sugere a disseminação do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> entre isolados com elevada diversidade genética, embora fosse encontrado localizado num elemento genético móvel idêntico, o Tn4401d, e este fosse veiculado por um único tipo de plasmídeo (IncFrepB).