

ALTERNATIVA TERAPÉUTICA NO TRATAMENTO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES (KPC)

BEATRIZ BOHNS PRUSKI¹; LETÍCIA ROLOFF STALLBAUM¹; SUÉLEN CAVALHEIRO AMARAL¹; HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO¹; STELLA BUCHHORN DE FREITAS¹; DAIANE DRAWANZ HARTWIG¹

¹*Universidade Federal de Pelotas – Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos* biapruski@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é crescente entre os agentes infecciosos e destaca-se no âmbito da saúde pública, especialmente pela rápida disseminação de bactérias multirresistentes causadoras de infecções comuns (WHO, 2015). As bactérias podem conter genes que codificam enzimas com propriedades de clivar ou promover alterações estruturais nos antimicrobianos. Estas enzimas promovem a hidrólise dos medicamentos, impedindo sua ligação ao sítio receptor e, por consequência, inibem sua ação (FIO *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, a busca por alternativas terapêuticas voltadas para o controle dos agentes multirresistentes é uma realidade e ganha força mundialmente. A descoberta de novos agentes antimicrobianos para tratar infecções que envolvem micro-organismos resistentes é almejada, no entanto, também é uma tarefa desafiadora (RÍOS, 2005).

As plantas medicinais estão sendo cada vez mais utilizadas para o tratamento de doenças, a fim de diminuir as desvantagens trazidas pelo uso dos antimicrobianos convencionais, que muitas vezes afetam o paciente negativamente, como por exemplo, devido a sua toxicidade (COSTA *et al.*, 2009). Produtos de origem natural como os óleos essenciais têm sido avaliados quanto à sua ação antimicrobiana, dentre eles *Ocimum basilicum* L. (manjericão), que é uma planta medicinal e aromática, originária da Índia (DUARTE, 2006). Também denominada de alfavaca, alfavaca-cheirosa, basílico ou manjericão comum, é a espécie da família Lamiaceae intensamente cultivada no Brasil. O óleo essencial de manjericão possui atividade antimicrobiana, antifúngica, repelentes de insetos, atividades anticonvulsivantes, hipnóticas e antioxidantes. Uma vez que produtos naturais são em sua maioria de fácil acesso à população, vislumbra-se a possibilidade de futura aplicação clínica, sendo a sua utilização embasada pela literatura científica.

Nesse sentido, os objetivos do presente estudo foram caracterizar o perfil de resistência de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* obtidos de um hospital de ensino da cidade de Pelotas/RS, Brasil, bem como, avaliar a capacidade antibacteriana do óleo essencial (OE) de manjericão, como alternativa terapêutica no controle de bactérias multirresistentes.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*: isolados de *K. pneumoniae* foram obtidos em um hospital da rede pública da cidade de Pelotas/RS (Tabela 1) e estocados em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI-DIFCO), acrescido de 20% (v/v) de glicerol, sob temperatura de -70°C. A confirmação destes

isolados foi feita através do sistema automatizado VITEK e também através da técnica de PCR identificando a presença do gene espécie-específico *dnaA* (DE CAMPOS et al., 2016). Para realização da PCR, foram utilizados os primers *dnaA-For* 5'-TGCCAAGCGACTGCGCTCAA-3' e *dnaA-Rev* 5'-AGCTCTTGGCCAGCGCCAT-3'.

2.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos: o teste de disco-difusão em ágar (KIRBY & BAUER, 1966) fornece resultados qualitativos. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar Muller-Hinton (MH), a partir de um disco impregnado com antimicrobiano. O teste foi realizado dispensando os discos de papel-filtro, impregnados com antimicrobianos em concentrações fixas, sobre a placa de ágar, após a semeadura do inoculo bacteriano com aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas à 37°C, antes dos resultados serem determinados. Os antimicrobianos utilizados foram: Ampicilina (AMP); Amoxicilina + Clavulanato (AMC); Amicacina (AMK); Cefalotina (CET); Ciprofloxacin (CIP); Ceftriaxone (CRO); Cefepime (FEP); Cefoxitin (FOX); Gentamicina (GEN); Imipenem (IMP); Levofloxacin (LVX); Meropenem (MEM); Ampicilina + Sulbactam (SAM). Após a medição dos halos de inibição, foi feita sua interpretação, utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI específicos para a bactéria testada.

2.3 Teste de Hodge para detecção fenotípica de isolados produtores da enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC): a detecção da enzima KPC nos isolados hospitalares foi realizada através do teste de Hodge modificado (ANVISA, 2008). Para tal, foi necessário o preparo de um inóculo da cepa *E. coli* ATCC 25922, correspondente a 0,5 na escala de McFarland através do método de suspensão direta da colônia. Posteriormente, houve a diluição do inóculo na proporção de 1:10 e o mesmo foi semeado em uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Em cada placa, um disco de meropenen 10 µg foi adicionado na região central da mesma e, com o auxílio de uma alça de platina, estrias com os isolados a serem testados foram feitas do centro do disco em direção à periferia da placa. Em cada placa, realizou-se análise de 3 isolados com a presença de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (negativa para síntese de KPC) utilizada como controle negativo para o teste.

2.4 MIC e CBM do óleo essencial de *O. basilicum*: foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) em microplacas, utilizando as seguintes concentrações de OE: 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,19%, seguindo as normas instituídas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012, com modificações). Em seguida foi feita a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), que é definida como a menor concentração do OE capaz de causar ação bactericida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do sistema automatizado VITEK e da técnica de PCR, foi possível identificar 44 isolados pertencentes à espécie *K. pneumoniae* dentre os 48 isolados testados. Embora o método de PCR seja muitas vezes difícil de controlar durante operações rotineiras de laboratório, segundo LEE, et al. (2015), é um método bastante vantajoso por ser rápido, podendo detectar os resultados dentro de um dia. Já os métodos de cultivo bacteriano tradicionais, exigem pelo menos três dias para a realização. Além disso, a sensibilidade da técnica de PCR é maior do que as

colorações como o Gram, por exemplo, as quais são confiáveis apenas quando a concentração bacteriana é $>10^5$ UFC/mL.

No antibiograma foram detectados os resultados apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados apresentados na disco difusão dos 48 isolados. (R) = Resistente; (I) = Intermediário; (S) = Sensível

Antibacterianos	R	I	S
Ampicilina (AMP)	98%	0%	2%
Amoxicilina + Clavulanato (AMC)	66,6%	14,6%	18,8%
Amicacina (AMK)	41,6%	16,7%	41,7%
Cefalotina (CET)	95,8%	0%	4,2%
Ciprofloxacin (CIP)	77,1%	10,4%	12,5%
Ceftriaxone (CRO)	91,8%	2%	6,2%
Cefepime (FEP)	72,9%	12,5%	14,6%
Cefoxitin (FOX)	77,1%	0%	22,9%
Gentamicina (GEN)	58,3%	6,3%	35,4%
Imipenem (IMP)	49,9%	6,3%	43,8%
Levofloxacin (LVX)	77%	4,2%	18,8%
Meropenem (MEM)	54,1%	6,3%	39,6%
Ampicilina + Sulbactam (SAM)	81,2%	6,3%	12,5%

No teste de Hodge, considerou-se o isolado como positivo para a produção da enzima KPC quando houve distorção do halo de difusão do antibacteriano. Esse fenômeno é verificado pois a cepa *E. coli* ATCC 25922 é sensível ao meropenem e esse crescimento só foi possível porque a amostra teste produziu uma enzima capaz de degradar esse carbapenêmico. Dos 48 isolados testados, 17 foram identificados fenotípicamente como carbapenemase positivos.

Foi possível observar que no teste de MIC, 14,6% dos isolados revelaram a ação antibacteriana do OE até a concentração de 0,39%, enquanto 54,2% dos isolados apresentaram esta mesma ação até a concentração de 0,78%, e 16,6% apresentaram ação até a concentração de 1,56%, restando 12,5% dos isolados com ação até 3,13% de concentração do OE. Analisou-se na CBM que 76,7% dos isolados apresentaram ação bactericida nas mesmas concentrações da MIC. Os valores de CIM e CBM verificados no presente estudo demonstram que o produto natural avaliado apresenta propriedades biológicas ativas frente a inibição de isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Conforme discutido por Menezes *et al.* (2009), produtos naturais apresentam atividade antimicrobiana adequada quando sua concentração inibitória é inferior a 100 mg/mL. No presente estudo, a MIC e CBM do óleo essencial *O. basilicum* apresentou valores muito baixos, o que indica sua elevada atividade antimicrobiana.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo encontramos cerca de 50% dos isolados bacterianos resistentes à carbapenêmicos, com 17% produtores da enzima carbapenemase. Concluímos também que, o *O. basilicum* se apresentou bacteriostático para todos os isolados testados, com efeito bactericida para a grande maioria deles (76,7%). Diante desses resultados, pode-se projetar a utilização desse OE como alternativa no tratamento de infecções bacterianas resistentes à terapêutica convencional, de forma isolada ou combinada a outros medicamentos. Com isso, nossas pesquisas

seguem no intuito de desenvolver um novo produto, de origem natural, menos tóxico e mais eficaz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** American Journal of Clinical Pathology, v.45, n.4, p. 493-496, 1966.

COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Efeito inibitório do óleo essencial de manjericão sobre o crescimento in vitro de *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.3, n.3, p.35-38, 2009.

DE CAMPOS et al., 2016. (2016). Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Current Microbiology**, 72(5), 617–627.

DUARTE, M.C.T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil.** Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 01 de maio de 2012.

FIO, F.S.D.; MATTOS FILHO, T.R.; GROOPPO, F.C. Resistência bacteriana. **Revista Brasileira de Medicina**, v.57, n.10, 2000.

KONEMAN, E. W. et al., **Diagnóstico microbiológico - Texto e atlas colorido.** 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 216p.

LEE, C.T.; HSIAO, K.M.; CHEN, J.C.; SU, C.C. Multiplex polymerase chain reaction assay developed to diagnose adult bacterial meningitis in Taiwan. **Apmis**, v.123, p.945-950, 2015.

MENEZES, T.O.A.; ALVES A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.E.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Ver Odontol UNESP**, v.38, p.184-191, 2009.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A6, 2007.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**. v.100, p.80-4, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation.** Geneva: WHO, 2015. 36p.