

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE A CARBAPENÊMICOS ISOLADAS DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE DOURADOS-MS.**Gerlaine D. Silva<sup>1\*</sup>, Leticia S. Barbosa<sup>2</sup>, Gleyce H. de A. de Souza<sup>2</sup>, Júlio H. F. de Sá Queiroz<sup>2</sup>, Simone Simionatto<sup>3</sup>

1. Estudante da Faculdade de Ciências da Saúde da UFGD
2. Pós-graduando(a) da Faculdade de Ciências da Saúde da UFGD
3. Docente da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD/Orientadora

**Resumo**

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria associada às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) resistente a antibióticos. O objetivo do estudo foi realizar a caracterização molecular dos isolados de *P. aeruginosa* de um hospital de Dourados/MS.

A identificação fenotípica e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas resistentes a carbapenêmicos foi realizada pelo sistema Phoenix™. As cepas foram submetidas à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para avaliar a presença de genes de resistência.

Todos os isolados analisados foram resistentes a imipenem e meropenem. A maioria das cepas foi obtida de aspirado traqueal (36,1%) e urocultura (36,1%); sendo que a maioria dos pacientes estavam internados na Unidade de Terapia Intensiva (36,1%) e no Posto de Saúde (36,1%). Na análise por PCR, foram identificados os genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* em 6 cepas (16,66%) e o gene *bla<sub>BES</sub>* em 4 cepas (11,11%). Portanto, há múltiplos mecanismos de resistência bacteriana nesse hospital.

**Autorização legal:** Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFGD (nº 877.292/2014).

**Palavras-chave:** IRAS; resistência antimicrobiana; PCR.

**Apoio financeiro:** CNPq, FUNDECT, UFGD.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFGD.

**Introdução**

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial devido a uso inapropriado de antibióticos, mal estado do ambiente hospitalar e uso rotineiro de procedimentos invasivos (1). Infecções Hospitalares (IH) ou Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são grave problema de saúde pública, pois são eventos adversos associados à assistência à saúde com alta morbidade e mortalidade, repercutindo diretamente na segurança do paciente (2).

O ambiente hospitalar é favorável à propagação de bactérias multirresistentes (3). Tais microrganismos possuem diversos mecanismos de resistência aos antibióticos, sendo os mais comuns: alteração na permeabilidade da membrana, produção de enzimas que hidrolisam os antibióticos e bombas de efluxo (1).

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo considerado um patógeno oportunista, que causa infecções no trato urinário e no sistema respiratório, bem como pneumonia associada a ventilação mecânica e agravamento dos quadros de fibrose cística (4; 5). Além disso, é uma das principais causas de infecções nosocomiais, sobretudo em Unidades de Terapia Intensiva (UTI).

A presença de resistência aos carbapenêmicos nestes patógenos vem aumentando em escala mundial, especialmente no Brasil (6). A detecção de múltiplos determinantes da resistência antimicrobiana nestes microrganismos é comum (7). A produção de metalo-β-lactamases (MβL) por cepas de *P. aeruginosa* foi identificada como um dos mais importantes mecanismos relacionados à resistência à antibióticos beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos (8). Vários tipos de MβL foram identificados entre as cepas de *P. aeruginosa*, sendo os tipos IMP, VIM, SPM-1 e GIM-1 os mais relevantes clinicamente (9). A MβL de São Paulo (SPM-1) foi descrita em 2001 em São Paulo. Desde então, *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 foi descrita em diferentes regiões do Brasil (10; 11). A rápida identificação da resistência a múltiplos fármacos é importante na prevenção da disseminação dos microrganismos resistentes nos hospitais e permite estabelecer terapêutica adequada contra tais patógenos (11). Portanto, o objetivo do estudo foi realizar a caracterização molecular dos mecanismos de resistência de *P. aeruginosa* isolada de pacientes internados em um hospital público do município de Dourados/MS.

**Metodologia**

As cepas bacterianas de *P. aeruginosa* foram coletadas de amostras clínicas de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS, no período de janeiro a dezembro de 2017. Os dados laboratoriais quanto à identificação da espécie bacteriana, coleta das amostras, ala de isolamento e amostras clínicas foram coletados a partir dos registros do laboratório de análises clínicas do hospital. Os dados clínicos dos pacientes hospitalizados durante o período do estudo foram revisados e registrados: características demográficas, histórico médico e comorbidades, internação prévia em outra instituição de saúde, ala e tempo de internação, realização de procedimentos invasivos, uso de dispositivos e exposição a antibióticos.

A identificação das espécies bacterianas e o perfil de sensibilidade antimicrobiana foi realizada com o sistema microbiológico automatizado Phoenix™ (BD Diagnostic, Systems, Sparks, MD). A avaliação do perfil de susceptibilidade a antibióticos foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, seguindo as padronizações e critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (6). As CIMs de antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) foram testadas em diferentes faixas de concentração, de 128 a 0,125 µg/mL. As cepas foram

inoculadas em microplacas de 96 poços e incubadas à 36 °C por 24 horas. Após este período, a CIM foi registrada como sendo a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo avaliado.

As cepas de *P. aeruginosa* resistentes foram submetidas à extração de DNA por lise térmica, conforme Cuzon et al. (7).

A presença de genes codificadores de MBL (*bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>MCR-1</sub> e *oprD*) foi avaliada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando primers específicos (11; 12). As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 15 µL, contendo 2 unidades da DNA Taq polimerase (Sigma-Aldrich, USA), 50 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP's (Ludwig, Brasil), 1 X tampão da reação (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 10-50 ng de DNA de cada patógeno. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento por 40 segundos na temperatura específica para cada primer, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed 100X (Uniscience, São Paulo, Brasil).

### Resultados e Discussão

Os isolados de *P. aeruginosa* com perfil de resistência aos carbapenêmicos foram coletados e analisados com relação a suas características, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características epidemiológicas dos pacientes onde foram isoladas as bactérias resistentes aos carbapenêmicos

Características epidemiológicas	<i>P. aeruginosa</i> (n=36) (%)
Sexo	
Masculino	19 (52,8)
Feminino	17 (47,2)
Média de idade	52 (17-86)
Isolado clínico	
Aspirado traqueal	13 (36,1)
Urocultura	13 (36,1)
Secreção retal	4 (11,1)
Hemocultura	2 (5,5)
Cateter	2 (5,5)
Secreção nasal	1 (2,8)
Cultura de secreção	1 (2,8)
Ala hospitalar	
Unidade de Terapia Intensiva	13 (36,1)
Posto de Saúde	13 (36,1)
Pronto Atendimento	9 (25)
Centro Obstétrico	1 (2,8)

No período do estudo, 36 cepas de *P. aeruginosa* foram isoladas. Na confirmação da susceptibilidade aos carbapenêmicos, todos os isolados apresentaram resistência à meropenem e a imipenem. Os testes moleculares nos permitiram identificar a presença de genes de resistência a carbapenêmicos em algumas das bactérias avaliadas (Tabela 2). No entanto, não foram identificados genes de resistência a carbapenêmicos em todas as cepas, indicando que possivelmente tenham outros mecanismos de resistência, os quais merecem futuros estudos.

**Tabela 2.** Características fenotípicas e moleculares dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos avaliadas neste estudo

Nº paciente	Data de isolamento	CIM Imipenem µg/ml	CIM Meropenem µg/ml	β-lactamase genes
1	13/03/2017	16 (R)	32 (R)	<i>bla<sub>SPM</sub></i>
2	14/03/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>
3	22/03/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>SPM</sub></i>
4	10/04/2017	128 (R)	128 (R)	-
5	07/03/2017	128 (R)	128 (R)	-
6	18/04/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>KPC-2</sub>/bla<sub>SPM</sub></i>
7	06/04/2017	128 (R)	128 (R)	-
8	29/03/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>KPC-2</sub>/bla<sub>SPM</sub></i>
9	16/06/2017	16 (R)	32 (R)	-
10	15/06/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>KPC-2</sub>/bla<sub>SPM</sub></i>
11	05/06/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>KPC-2</sub>/bla<sub>BES</sub></i>
12	03/06/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>BES</sub></i>
13	15/05/2017	64 (R)	128 (R)	-
14	19/05/2017	16 (R)	128 (R)	-
15	10/05/2017	16 (R)	128 (R)	-
16	02/05/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>BES</sub></i>
17	31/05/2017	128 (R)	128 (R)	-
18	02/08/2017	128 (R)	128 (R)	-
19	24/07/2017	32 (R)	128 (R)	-
20	16/08/2017	16 (R)	32 (R)	-
21	29/08/2017	128 (R)	128 (R)	-
22	28/08/2017	128 (R)	128 (R)	-
23	31/07/2017	32 (R)	128 (R)	-
24	04/08/2017	32 (R)	128 (R)	-
25	07/07/2017	64 (R)	32 (R)	-
26	30/06/2017	128 (R)	128 (R)	-
27	10/07/2017	128 (R)	128 (R)	<i>bla<sub>KPC-2</sub>/bla<sub>BES</sub></i>
28	22/11/2017	128 (R)	128 (R)	-
29	31/10/2017	32 (R)	32 (R)	-
30	16/10/2017	16 (R)	16 (R)	-
31	01/08/2017	128 (R)	128 (R)	-
32	11/12/2017	128 (R)	128 (R)	-
33	26/12/2017	32 (R)	16 (R)	<i>bla<sub>SPM</sub></i>
34	09/01/2017	128 (R)	128 (R)	-

35	15/01/2017	32 (R)	64 (R)	-
36	13/03/2017	128 (R)	128 (R)	-

R: resistente; - : não foi detectado gene de resistência

A partir dos dados obtidos, constata-se que as principais fontes de isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes foram das amostras de aspirado traqueal e de urocultura, o que corrobora a tendência deste patógeno de causar infecções dos tratos respiratório e urinário (4; 5). As principais alas hospitalares em que foram encontrados os isolados clínicos foram a UTI e o Posto de Saúde, locais com elevado trânsito de pacientes e funcionários do hospital, o que facilita a disseminação das cepas resistentes pelo ambiente hospitalar. Todas as amostras analisadas apresentaram resistência a imipenem e a meropenem nos testes fenotípicos realizados. Na técnica molecular de PCR, 11 cepas (30,5%) apresentaram pelo menos um gene responsável pela produção de  $\beta$ -lactamases, evidenciando assim seu mecanismo de resistência.

### Conclusões

Esses resultados indicam que as cepas de *P. aeruginosa* analisadas apresentam outros mecanismos de resistência bacteriana, uma vez que somente algumas cepas apresentaram genes de resistência a beta-lactâmicos. Desta forma, a avaliação da presença de outros mecanismos – como bombas de efluxo e presença de porinas – se faz necessária, na tentativa de elucidar os mecanismos de resistência presentes nessas cepas.

### Referências bibliográficas

- PICOLI, SU. Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. Revista Brasileira de Análises Clínicas, vol.40, n. 4, p.273, 2008.
- Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2016-2020). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. p.8,2016.
- NOGUEIRA, PSF; et al. Perfil da Infecção hospitalar em um hospital universitário. Revista de enfermagem UERJ, Rio de Janeiro, vol.17, n.1, p.96, 2009.
- QUITTNER, AL; et al. Determination of the minimal clinically important difference scores for the cystic fibrosis questionnaire-revised respiratory symptom scale in two populations of patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. Chest journal, vol.135, n.6, p.1611, 2009.
- TAI, AS; et al. Molecular surveillance for carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Australian patients with cystic fibrosis. Royal College of pathologists of Australasia, vol. 47, n.2, p.156, 2015.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, P. A: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
- FIGUEIREDO, EAP; et al. *Pseudomonas Aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, vol. 19, n.4, p.422, 2007.
- CUZON, G; et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces  $\beta$ -lactamase blaKPC-2 gene. Emerging Infectious Diseases, vol. 16, n. 9, p.8, 2010.
- MENDES, RE; et al. Metallo- $\beta$ -lactamases. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. v.42. n.2. p.104, abril, 2006.
- DASH, M; et al. Frequency, risk factors, and antibiogram of *Acinetobacter* species isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital in Odisha, India. Avicenna Journal of Medicine, vol. 3, n. 4, p. 97-102, 2013.
- FEHLBERG, LC; et al. Detection of PER-2-producing *Enterobacter cloacae* in a Brazilian liver transplantation unit. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol.58, n. 3, p.1831-1832, 2014.
- POIREL, L; et al. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiology, vol. 2, n. 5, p.501-512, 2007.