

Pseudomonas aeruginosa resistente aos carbapenêmicos produtor de NDM-1

Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa bringing NDM-1

Paulo Ricardo Freitag Jorge¹, João Paulo Pimenta², Cristiane Silveira de Brito³, Rosineide Marques Ribas³^{ID}, Paulo Pinto Gontijo Filho³^{ID}, Lizandra Ferreira de Almeida e Borges³^{ID}

RESUMO

Introdução: A produção de NDM-1 é cada vez mais comum nesta nova geração de bactérias multirresistentes. **Objetivo e Métodos:** Este estudo avalia a ocorrência de metalo- β -lactamase, especialmente NDM em *Pseudomonas aeruginosa* no estado de Minas Gerais, Brasil, por meio de um teste do disco combinado para triagem de isolados e Reação em Cadeia de Polimerase para pesquisar os genes para metalo- β -lactamases. **Resultados:** Das 95 cepas analisadas, todas resistentes aos carbapenêmicos, 20% eram fenotipicamente positivas para metalo- β -lactamases, e 1% positivas para o gene *bla*SPM e 2,1% para *bla*NDM. **Conclusões:** No Brasil, as carbapenemases SPM sempre foram predominantes entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa*, mas não a NDM. Este estudo destaca a necessidade de revisão de protocolos clínicos, a fim de conter a disseminação desse novo perfil.

Palavras-chave: Carbapenemase; Mecanismo de resistência; Metallo- β -lactamase.

¹ Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

² Check-Up Medicina Laboratorial, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Editor Associado Responsável:

Dr. Alexandre Moura
Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte
Belo Horizonte/MG, Brasil.

Autor Correspondente:

Lizandra Ferreira de Almeida e Borges
E-mail: lfaborges@yahoo.com.br

Fontes apoiadoras:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Minas Gerais, Brasil.

Comitê de Ética:

Número do Parecer 463.877/2013 – CAAE: 16186213.8.0000.5152

Registro de Ensaio Clínico (Caso se aplique):

Não se aplica.

Conflito de Interesse:

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

ABSTRACT

Introduction: NDM-1-producing is increasingly common in new generation of multidrug-resistant bacteria. **Objective and Methods:** This study reports the occurrence of metallo- β -lactamase, especially NDM in *Pseudomonas aeruginosa* in the state of Minas Gerais, Brazil. A disc combination test used to screen isolates and Polymerase Chain Reaction was used to search for metallo- β -lactamases genes. **Results:** Among the 95 strains analyzed, all were resistant to carbapenems, 20% were phenotypically positive for metallo- β -lactamases, and 1% were positive for *bla*SPM gene and 2.1% for *bla*NDM. **Conclusions:** In Brazil, SPM carbapenemases always was predominant among *P. aeruginosa* clinical isolates, but not NDM. This study highlights the need to review clinical protocols, in order to contain the dissemination of this profile.

Keywords: Carbapenemase; Resistance mechanism; Metallo- β -lactamase.

Recebido em: 29 Julho 2022

Aprovado em: 08 Fevereiro 2023

Data de Publicação: 31 Agosto 2023.

DOI: 10.5935/2238-3182.2022e33107

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um importante patógeno oportunista, responsável por diversas infecções no ambiente hospitalar, sendo os carbapenêmicos os antimicrobianos mais comumente utilizados e de última escolha em tratamento de infecções por *P. aeruginosa* multirresistente (MDR); no entanto, cepas resistentes a essas drogas foram relatadas em todo o mundo nas últimas décadas e produzindo Metallo- β -Lactamase (MBL)¹.

A resistência adquirida aos carbapenêmicos em bastonetes Gram negativos está frequentemente associada à produção de carbapenemases (MBL e outras carbapenemases, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC ou oxacilina e AmpC β lactamase), que representam um grupo de enzimas que hidrolisam e inativam os antimicrobianos β -lactâmicos, detectadas desde o início da década de 1940^{1,2}.

New Delhi MBL (NDM) foi descrita em 2008, em Nova Delhi, na Índia, em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* e, desde então, suas variantes têm sido relatadas mundialmente, sendo a *bla*NDM-1 a mais prevalente, presente em grande parte em Enterobacterales, mas também em não fermentadores (*Acinetobacter* e *Pseudomonas* spp.)^{1,3}. Desde então, bactérias produtoras de NDM foram detectadas em vários países⁴.

No Brasil, a NDM-1 foi identificada pela primeira vez em *Providencia rettgeri*, em 2013, e depois descrita esporadicamente em diferentes estados do país, como Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Distrito Federal, São Paulo e Bahia⁴.

A presença de produtores de NDM em unidades de saúde é um problema médico cada vez mais frequente que compromete a eficácia do tratamento⁴. Usar testes simples e confiáveis é importante e a detecção de resistência a

carbapenêmicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o padrão-ouro, mas várias técnicas fenotípicas ainda são utilizadas². Este estudo relata a ocorrência de metalo- β -lactamase, especialmente NDM em *Pseudomonas aeruginosa* no estado de Minas Gerais, Brasil.

MÉTODOS

Entre maio de 2013 e agosto de 2017, um total de 95 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos do Hospital e Maternidade Municipal de Uberlândia, no estado de Minas Gerais, Brasil, foram recuperados e incluídos neste estudo. Isolados de diferentes espécimes clínicos foram identificados por Maldi-Tof, pelo laboratório do hospital, em seguida mantidos à -20°C até o desenvolvimento deste estudo.

Os genes que codificam as β -lactamases foram investigados por PCR usando primers para os genes *bla*VIM, *bla*IMP, *bla*SPM, *bla*GIM, *bla*SIM e *bla*NDM (Tabela 1).

O volume da reação (25 μ L) continha 12,5 μ L *GoTaq Green Master Mix*, 0,75 μ L de cada par de primers, 10 μ L de água ultrapura e 1 μ L de DNA⁵. As amplificações foram realizadas no *Mastecycler Personal* (Eppendorf), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de ciclos de 30 segundos a 95°C, temperatura de anelamento conforme Tabela 1, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, 90V, corado com *Diamond™ Nucleid Acid Dye* por 30 minutos, revelado em transiluminador. Todos os ensaios usaram amostras produtoras dos genes de interesse, como controle.

A suscetibilidade dos isolados ao imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, cefepime, ceftazidima,

Tabela 1. Primers específicos para genes que codificam Metallo- β -lactamase.

Primer	Sequência de primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento
<i>blaIMP</i> -F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	42°C
<i>blaIMP</i> -R	CCAAACCACTACGTTATCT	
<i>blaSIM</i> -F	TACAAGGGATTTCGGCATCG	47°C
<i>blaSIM</i> -R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
<i>blaGIM</i> -F	TCGACACACCTTGGTCTGAA	47,5°C
<i>blaGIM</i> -R	AACTTCCAACCTTGGCCATGC	
<i>blaSPM</i> -1 F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	46,5°C
<i>blaSPM</i> -1 R	ACATTATCCGCTGGAACAGG	
<i>blaNDM</i> -1 F	GCCAAAGTTGGGCGCGGTTG	55°C
<i>blaNDM</i> -1 R	ACCGCCTGGACCGATGACCA	
<i>blaVIM</i> -F	GATGGTGTGTTGGTTCGCATA	47°C
<i>blaVIM</i> -R	CGAATGCGCAGCACCAG	

Fonte: Woodford (2010)⁵.

ciprofloxacina, aztreonam, gentamicina, ampicilina e polimixina foi avaliada pelo método de difusão em disco, seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de acordo com o ano de isolamento (2015 a 2017), e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, utilizada para controle do método.

A produção fenotípica de carbapenemase foi detectada usando o teste de disco combinado de meropenem com 10 μ L de EDTA (0,1 M). A interpretação do teste foi baseada na comparação entre as zonas de inibição dos discos de meropenem, com e sem inibidor, a produção de MBL ficou evidente por um aumento ≥ 5 mm dos halos nos discos que são suplementados com EDTA⁶.

RESULTADOS

Dos 95 isolados, 9,5% (n=9) foram coletados em 2013, 13,7% (n=13) em 2014, seguidos por 14,7% (n=14) em 2015, 15,7% (n=15) em 2016 e 46,3% (n=44) em 2017. Os isolados foram coletados de hemocultura e ponta de cateter (n=28), secreção traqueal (57) e urina (n=10) (Tabela 2).

Apenas 19 isolados foram identificados como produtores de carbapenemase pelo teste de combinação de discos. A análise por PCR dos genes MBL foi realizada para todos os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, com um isolado positivo para *blaSPM*-1 e dois para *blaNDM*-1 (Tabela 2), provenientes de 2013, 2015 e 2017, respectivamente, e todos de BSI (Figura 1). Nenhum amplicon foi detectado para os genes *blaSIM*, *blaVIM*, *blaIMP* e *blaGIM*.

Dos isolados, 52,6% foram resistentes aos β -lactâmicos testados, além dos carbapenêmicos. 71,6% foram resistentes aos aminoglicosídeos, 62% resistentes à piperacilina-tazobactam e 3,2% à polimixina.

Todos os isolados positivos para *blaNDM*-1 e *blaSPM*-1 foram definidos como pan-resistentes, suscetíveis apenas à polimixina B.

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os mecanismos de resistência mais significativos em isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, que é um importante patógeno de infecções graves em todo o mundo. Esse mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é importante porque altera significativamente a eficácia dos agentes pseudomonicidas comumente usados, incluindo cefalosporinas, piperacilina-tazobactam, ceftolozana-tazobactam, imipenem-relebactam e ceftazidima-avibactam⁷.

A resistência a quase todas as classes de antibióticos já está bem estabelecida, incluindo aos aminoglicosídeos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, β -lactâmicos e, mais recentemente, colistina. Assim, as opções terapêuticas disponíveis para pacientes com infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* portadora do gene *blaNDM* são escassas¹. No presente estudo, a Polimixina foi o agente antimicrobiano mais eficaz, porém algumas amostras já estão apresentando resistência a ela.

Shahin & Ahmadi (2021)⁸ que relataram *blaNDM*-1 no Irã, atribuindo esse fenômeno em isolados Gram negativos e à prescrição inadequada e excessiva de carbapenêmicos nos hospitais, o que eleva a pressão seletiva da resistência.

Os dados gerais mostram que a frequência de isolados de *P. aeruginosa* produtores de *blaNDM*-1 foi de 2,1% (2/95). Silva et al. (2019)⁴ sugerem a presença desta variante no Brasil, entre 2012 e 2015, e que houve um aumento significativo de bactérias Gram negativas produtoras de NDM, além de muitos outros relatos de *blaNDM*-1 em diferentes países da Europa e Ásia, o que demonstra sua disseminação.

Assim, descrevemos o primeiro isolado de *P. aeruginosa* produzindo carbapenemases do tipo *blaNDM*-1, em Minas Gerais. E Perez et al. (2021)³ enfatizam o potencial de disseminação de uma *P.*

Tabela 2. Características das amostras, incluindo os pacientes infectados por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público brasileiro.

	<i>P. aeruginosa</i> N=95 (%)	<i>P. aeruginosa</i> <i>bla</i> SPM-1 N=1	<i>P. aeruginosa</i> <i>bla</i> NDM-1 N=2
Idade (média) ± DP	63,6 ± 18,6		
0-20 anos	2 (2,1)		
21-40 anos	8 (8,4)		
41-60 anos	24 (25,3)		46
61-80 anos	48 (50,5)		70
≥81 anos	13 (13,7)	82	
Feminino	36 (37,9)	F	F (ambos)
UTI	55 (57,9)	sim	não (ambos)
ICS	28 (29,5)	sim	sim (ambos)
PNM	57 (60,0)		
2013	9 (9,5)	sim	
2014	13 (13,7)		
2015	14 (14,7)		sim
2016	15 (15,7)		
2017	44 (46,3)		sim
MBL	19 (20,0)	não	somente uma

Legenda: IC = Intervalo de confiança; DP = Desvio padrão; UTI = Unidade de terapia intensiva; ICS = Infecção da corrente sanguínea; PNM = Pneumonia; MBL: Teste fenotípico metalo-β-lactamase. Fonte: Banco de dados da pesquisa.

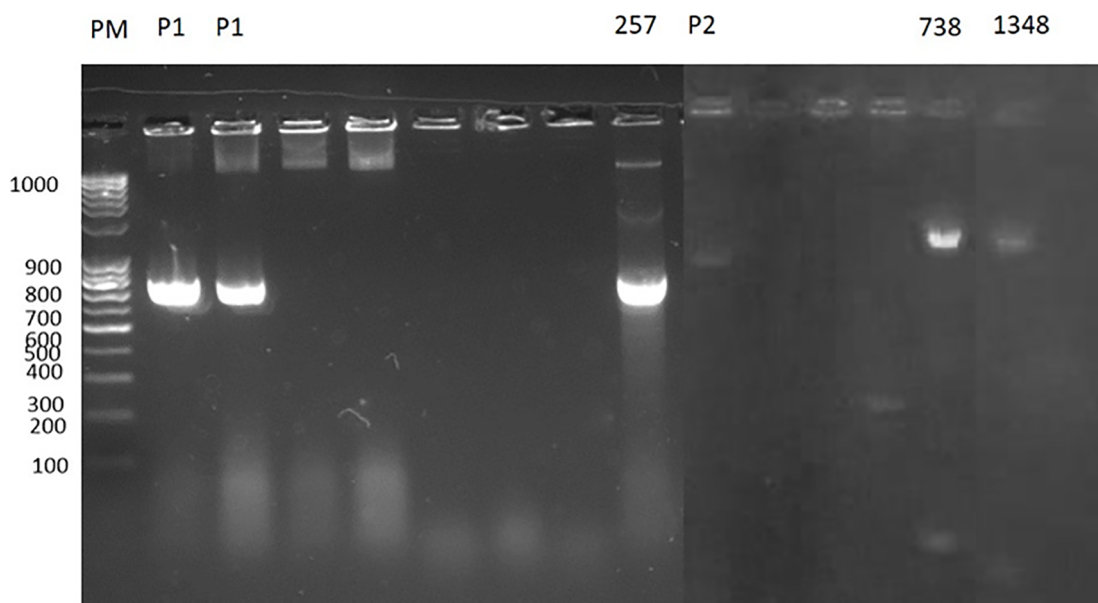


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose para os genes *bla*SPM-1 e *bla*NDM-1. Legenda: PM = Marcador de peso molecular 100 pb; P1 = Controle positivo de *P. aeruginosa* *bla*SPM-1; P2 = Controle positivo de *P. aeruginosa* *bla*NDM-1; 257 = Amostra de *P. aeruginosa* positiva para *bla*SPM-1; 738 e 1348 = Amostra de *P. aeruginosa* positiva para *bla*NDM-1. Fonte: Banco de dados da pesquisa.

aeruginosa produtora de NDM-1 entre pacientes críticos no sul do Brasil, o que possivelmente poderia substituir outra enzima MBL (principalmente SPM-1) ou outro mecanismo de resistência como condutor a resistência aos carbapenêmicos.

Neste estudo, alguns mecanismos de resistência foram investigados, mas outros podem estar presentes, como a inativação da proteína de membrana externa OprD, superexpressão de ampC codificada no cromossomo e superprodução de bombas de efluxo para múltiplas drogas⁹. A resistência aos carbapenêmicos é influenciada por vários fatores, nem todos avaliados em nosso estudo; no entanto, os resultados mostraram que os mecanismos envolvendo a produção de MBLs foram observados com mais frequência e também desempenham um papel importante na emergência do fenótipo de alto nível de resistência a carbapenêmicos entre os isolados de *P. aeruginosa*.

A falta de testes específicos para a produção de carbapenemases sugere que a prevalência de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos pode ser muito maior do que se percebe⁷. O tipo de mecanismo, as oportunidades oferecidas pelas novas tecnologias, a necessidade de novos inibidores, especialmente para MBL, e a contínua importância clínica dos β -lactâmicos significam que esta área continua sendo de uma pesquisa em expansão¹⁰.

CONCLUSÃO

É difícil prever a situação futura da resistência antimicrobiana, principalmente nos países em desenvolvimento, e esses dados apenas reforçam a importância de uma vigilância epidemiológica contínua. A combinação de métodos fenotípicos e genotípicos pode resultar em resultados melhores. No entanto, esses testes muitas vezes não são realizados em muitos laboratórios clínicos. O que resultou em achados tardios da *P. aeruginosa* produtora de blaNDM-1, como neste estudo, e o sequenciamento do gene pode ainda revelar novos achados.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

As contribuições dos autores estão estruturadas de acordo com a taxonomia (CRediT) descrita abaixo: Conceptualização, Investigação, Metodologia & Edição: Paulo Ricardo Freitag Jorge, João Paulo Pimenta; Supervisão & Escrita: Cristiane Silveira de Brito; Validação, Aquisição de Financiamento, Análise Formal & Escrita: Rosineide Marques Ribas, Paulo Pinto Gontijo Filho, Lizandra Ferreira de Almeida e Borges.

COPYRIGHT

Copyright© 2021 Freitag et al. Este é um artigo em acesso aberto distribuído nos termos da Licença *Creative Commons* Atribuição 4.0 Licença Internacional que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.

REFERÊNCIAS

1. Santos JVO, Costa Júnior SD, Medeiros SMFR, Cavalcanti IDL, Souza JB, Coriolano DL, et al. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. *Curr Microbiol.* 2022 Abr;79(6):175.
2. Chaudhary M, Payasi A. False susceptibility of antibiotoics to carbapenemase producers and means to overcome. *J Pharm Biol Sci.* 2014;9:155-61.
3. Perez LRR, Carniel E, Narvaez GA. Emergence of NDM-producing *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients and impact on antimicrobial therapy during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2021 Jun;1-3.
4. Silva IR, Aires CAM, Conceição-Neto OC, Santos ICO, Pereira NF, Senna JPM, et al. Distribution of clinical NDM-1-producing gram-negative bacteria in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2019 Abr;25(3):394-9.
5. Woodford N. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR. *Methods Mol Biol.* 2010;642:181-92.
6. Mehdi N, Aslam N, Saeed M, Khalid AW, Riaz S, Izhar M. Metallo β -Lactamase Detection Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Test. *J Clin Microbiol.* 2008 Jun;46(6):2028-37.
7. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* - an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dez;11(1):811-4.
8. Shahin M, Ahmadi A. Molecular characterization of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitalized patients in Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021 Nov;20(1):76. Erratum in: *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021 Dez;20(1):82.
9. Rostami S, Farajzadeh Sheikh A, Shoja S, Farahani A, Tabatabaiefar MA, Jolodar A, et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Chin Med Assoc.* 2018 Fev;81(2):127-32.
10. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019 Ago;431(18):3472-500.

