

Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase bla_{SPM-1} em amostras clínicas

Occurrence of multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase bla_{SPM-1} in clinical samples

Tiago Gräf¹, Daiane Bopp Fuentefria¹ e Gertrudes Corção²

RESUMO

Este estudo avaliou a ocorrência de genes para metalo β -lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* do Hospital São Vicente de Paulo, RS. Os genes foram pesquisados por PCR e o perfil de susceptibilidade foi avaliado por disco-difusão. Foram analisadas 46 cepas, sendo que cinco apresentaram o gene bla_{SPM-1} .

Palavras-chaves: Metalo β -lactamases. *Pseudomonas aeruginosa*. Multirresistência. Carbapenemases.

ABSTRACT

This study analyzed the occurrence of metallo- β -lactamase genes in clinical samples of *Pseudomonas aeruginosa* from the Hospital São Vicente de Paulo, RS. The genes were analysed by PCR and the susceptibility profiles were studied by diffusion-disk. Forty six strains were analyzed and five strains were positive for bla_{SPM-1} gene.

Key-words: Metallo β -lactamases. *Pseudomonas aeruginosa*. Multiresistance. Carbapenemases.

A *Pseudomonas aeruginosa*, um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares, pode apresentar mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos. A síntese de metalo- β -lactamases (MBLs) é o mecanismo de maior relevância na atualidade. Cepas produtoras de MBLs emergiram devido ao freqüente uso de carbapenêmicos, quando estes eram os únicos antibióticos eficazes contra outras β -lactamases⁷. As metalo- β -lactamases são capazes de hidrolisar quase todos agentes β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, como aztreonam^{2, 11}. O primeiro relato de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de MBLs ocorreu no Japão em 1991, desde então Europa, Ásia e América passaram também a registrar tais ocorrências⁵. No Brasil, o gene prevalente é o bla_{SPM-1} , isolado originalmente em São Paulo⁶. O objetivo deste estudo foi verificar presença de genes de MBLs em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Os isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos no HSVP no período de janeiro a abril de 2007. Os isolados foram identificados por provas bioquímicas clássicas

pelo Laboratório de Análises Clínicas do HSVP. A identificação foi confirmada pela amplificação do 16S rDNA¹⁰. A susceptibilidade dos isolados foi avaliada pela metodologia de disco-difusão, de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute*³. A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle. Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a pelo menos quatro classes diferentes de antimicrobianos. A triagem fenotípica da produção de MBLs foi realizada pelo teste de aproximação de discos utilizando como substratos imipenem e ceftazidima e, como inibidores, o EDTA e o ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA)¹⁹. Os isolados com triagem positiva para produção de metalo- β -lactamases ou com susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos foram submetidos à reação da polimerase em cadeia (PCR) para pesquisa dos genes bla_{IMP} , bla_{VIM} e bla_{SPM-1} . Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: bla_{IMP} -F(5'AAAGATACTGAAAAGTTA GT3'), bla_{IMP} -R(5'TCYCCAAYTTCACRTTGACT3'), bla_{VIM} -F(5'GTGG CAACGTACGCATCACC3'), bla_{VIM} -R(5'ACGAAGTCTAGACCGCC3'), bla_{SPM-1} -F(5'TCG GATCATGTCGACTTGCC3') e bla_{SPM-1} -R(5'CCTTCG CTTGATCCTCGT3').

1. Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, RS. 2. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, RS.

Apoio financeiro: CAPES-PROF e BIC/PROPESQ - UFRGS

Endereço para correspondência: Dr^a Gertrudes Corção. Dept^o de Microbiologia/ICBS/UFRGS. Rua Sarmento Leite 500, Cidade Baixa, 90050-170 Porto Alegre, RS.

Telefax: 55 51 3308-4111

e-mail: corcao@ufrgs.br

Recebido para publicação em: 29/11/2007

Aceito em: 26/06/2008

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para o gene bla_{SPM-1} isoladas de amostras clínicas do Hospital São Vicente de Paulo.

Isolado	GEN	CIP	AMI	CAZ	PPT	TIC	IPM	MER	CPM	POL	ATM	Origem	Amostra clínica
49	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	CTI	Urina
54	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	CTI	Urina
55	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	CTI	Escarro
78	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	Enf.	Escarro
80	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	CTI	Urina

GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, AMI: amicacina, CAZ: ceftazidima, PPT: piperacilina-tazobactam, TIC: ticarcilina-clavulanato, IMP: imipenem, MER: meropenem, COM: cefepime, POL: polimixina-B, ATM: aztreonam. R: resistente ao antimicrobiano testado, S: sensível ao antimicrobiano testado, I: intermediário ao antimicrobiano testado, CTI: centro de tratamento intensivo, Enf: enfermária.

Foram obtidas 46 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre estas, 17 (37%) apresentaram fenótipo de multirresistência. A triagem fenotípica para a produção de MBLs mostrou 37 cepas com resultados positivos, as quais foram submetidas à reação de PCR para pesquisa dos genes *bla*. Cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram o gene bla_{SPM-1} . Essas cepas positivas representaram 35% e 36% das cepas multirresistentes e das cepas resistentes a carbapenêmicos, respectivamente. Todas as cepas com o gene bla_{SPM-1} mostraram fenótipo de multirresistência, sendo sensíveis apenas à polimixina B e ao aztreonam (Tabela 1). Dos cinco isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com o gene bla_{SPM-1} , quatro foram oriundos do Centro de Tratamento Intensivo (CTI), de amostras de escarro e urina.

O presente estudo demonstrou que 10,8% das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* analisadas apresentaram o gene bla_{SPM-1} . Esta relação é maior se considerarmos a presença de tal gene entre as cepas multirresistentes (35%) ou resistentes aos carbapenêmicos (36%). Mesmo assim pode-se concluir que a ocorrência dessas cepas no HSVP é menor que em outras instituições do estado e do país. Gaspareto cols⁴ estudaram *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de MBLs em hospitais de Porto Alegre durante um período de dois anos e encontraram índices superiores a 70%, entre cepas resistentes a carbapenêmicos. O presente estudo foi realizado num período limitado de quatro meses que, em conjunto com o número de isolados analisados pode ter contribuído para estes resultados.

Sader cols⁸ analisaram isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com bacteremia do Complexo Hospitalar São Paulo (São Paulo, SP, Brasil), e encontraram 19,7% de cepas com os genes para MBLs, o que representou 43,9% dos isolados multirresistentes. Quanto à caracterização dos genes *bla*, demonstraram que 55,6% apresentaram o gene bla_{SPM} , 30,6% o gene bla_{VIM} e 8,3% o gene bla_{IMP} . Gaspareto cols⁴ estudaram a ocorrência dos genes bla_{IMP} , bla_{VIM} , e bla_{SPM-1} em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos em hospitais universitários na cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, durante o período de 1998/1999 e 2003/2004. No Hospital São Lucas (HSL), 84,6% das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentaram genes para MBLs; no Complexo Hospitalar Santa Casa (CHSC), 72,7%; e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 100%. No Complexo Hospitalar Santa Casa, 67% de isolados com o gene

bla_{SPM} e 8,3% de isolados com o gene bla_{IMP} . No Hospital São Lucas, identificaram 82% de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com o gene bla_{SPM} e, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os genes bla_{SPM} e bla_{IMP} foram encontrados em 35,7% e 21,4% dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Em nenhum dos hospitais estudados por Gaspareto cols⁴ foram encontradas cepas positivas para o gene bla_{VIM} . No presente estudo, 10,8% (n=5) dos isolados foram positivos para o gene bla_{SPM-1} . A tendência nacional de maior frequência do gene bla_{SPM-1} foi observada também entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do Hospital São Vicente de Paulo.

Atualmente, é preocupante o aumento do número de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com genes *bla* em unidades de tratamento intensivo (CTIs)⁷. Os fatores de risco de infecções nosocomiais neste ambiente incluem a exposição a práticas altamente invasivas, como ventilação mecânica, cateteres urinários, cateteres intra-arteriais e intravenosos e, também o uso inadequado de antimicrobianos¹². No presente estudo, dos cinco isolados de *Pseudomonas aeruginosa* portadores de genes bla_{SPM-1} , três eram de amostras de urina e um de amostra de escarro de pacientes de CTI e um de amostra de escarro de paciente internados em postos de enfermária (Tabela 1).

O presente estudo forneceu resultados sobre a presença de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e com o gene bla_{SPM-1} em amostras clínicas do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS. Estudos desta natureza ainda não haviam sido realizados neste local e contribuem com dados epidemiológicos para esta região. Entretanto, análises mais aprofundadas deverão revelar a relação de clonalidade entre os isolados do presente estudo e outros isolados da região sul do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Análises Clínicas e à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital São Vicente de Paulo por fornecerem as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. À Dra Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo) e ao Dr Mark A. Toleman (Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, UK) por cederem as cepas utilizadas como controles positivos neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by using Thiol Compounds. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 40-43, 2000.
2. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -Lactamase Gene, *bla_{GIM-1}*, Encoding a New Subclass of Metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 48: 4654-4661, 2004.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2007.
4. Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL. Occurrence of *bla_{SPM-1}* and *bla_{IMP-1}* genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 108-109, 2007.
5. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1584-1590, 1999.
6. Lee K, Lim YS, Young D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4623-4629, 2003.
7. Loureiro MM, Moraes BA, Mendonça VLF, Quadra MRR, Pinheiro GS, Asensi MD. *Pseudomonas aeruginosa*: Study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 387-394, 2002.
8. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25: 57-61, 2004.
9. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clinical Microbiology and Infection* 11: 73-76, 2004.
10. Spilker T, Coenye T, Vandame P, Lipuma JJ. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2074-2079, 2004.
11. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37: 673-679, 1996.