



Pesquisa de *Acinetobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Investigation of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* sp and *Pseudomonas aeruginosa* at an emergency hospital in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil

Vani Dos Santos Laranjeira¹, Desiree Padilha Marchetti², Juçara Rodrigues Steyer³, Gertrudes Corção² e Simone Ulrich Picoli¹

RESUMO

Introdução: O aparecimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp produtores de metalo- β -lactamases (MBLs) é um desafio para os hospitais. **Métodos:** Verificou-se a produção de MBL em cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp de um hospital de emergência de Porto Alegre pelo método de aproximação de disco e E-test MBL. Os genes *bla* foram pesquisados pela PCR. **Resultados:** Duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e oito *Acinetobacter* sp demonstraram fenótipo de MBLs. A amplificação do gene *bla*_{SPM-1} confirmou a enzima em *P. aeruginosa*. **Conclusões:** Deve-se ter cautela ao avaliar testes fenotípicos utilizados na detecção rotineira de metalo-enzima.

Palavras-chaves: Bacilos Gram-negativos. Não-fermentadores. Metalo- β -lactamase.

ABSTRACT

Introduction: The appearance of metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. is a challenge for hospitals. **Methods:** The production of MBL in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. From an emergency hospital in Porto Alegre was investigated using the disk approximation test and MBL E-test. The *bla* genes were determined using PCR. **Results:** Two strains of *Pseudomonas aeruginosa* and eight of *Acinetobacter* sp were shown to be MBL phenotypes. Amplification of the *bla*_{SPM-1} gene confirmed the presence of the enzyme in *P. aeruginosa*. **Conclusions:** Caution is needed in evaluating phenotype tests used for routine detection of metallo- β -lactamases.

Key-words: Gram-negative bacilli. Nonfermenting bacteria. Metallo- β -lactamase.

O principal problema em unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras é a emergência de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose (BGNNFG) com sensibilidade antimicrobiana diminuída, tornando-se constante desafio para os profissionais da área da saúde. Nesse contexto, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp vêm adquirindo importância como agentes de infecções hospitalares devido a crescente resistência aos antimicrobianos. Esses microrganismos são

agentes etiológicos de quase todas as infecções adquiridas na UTI, em particular as do trato respiratório¹⁻³. São responsáveis diretos pelas altas taxas de morbi-mortalidade e aumento do tempo de internação, com elevados custos para o hospital⁴.

Em vista do aumento na prevalência global de espécies de *Pseudomonas* resistentes às terapias utilizadas para o tratamento das infecções hospitalares, e os recentes surtos nosocomiais por *Acinetobacter* multirresistente é justificável a realização de estudos locais de prevalência. Além disto, entre todos os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos apresentados por estas bactérias, o conhecimento da produção da enzima MBL (metalo- β -lactamase) tem sido amplamente pesquisado.

Considerando a relevância dos microrganismos capazes de hidrolisar carbapenems, a vigilância e o controle de cepas resistentes tornam-se importantes nos hospitais, principalmente em locais onde a disseminação desses patógenos ainda é elevada, bem como naqueles onde é desconhecida pelo risco da não-identificação, seja por falha laboratorial ou mecanismos de vigilância inadequados¹. Este estudo determinou a ocorrência de metalo- β -lactamase em cepas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp resistentes a cefalosporinas de terceira geração em hospital de emergência do sul do Brasil, através de dois testes fenotípicos e relacionou com a presença de genes *bla*.

Entre os meses de agosto e outubro de 2008, foram obtidas 13 cepas não repetitivas de *P. aeruginosa* (nº = 4) e *Acinetobacter* sp (nº = 9) com sensibilidade reduzida a cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima ou cefotaxima ou ceftriaxona) de um hospital de emergência de Porto Alegre. Provas bioquímicas, amplificação e sequenciamento do 16S rDNA foram realizados para identificação das cepas⁵. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi conduzido segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁶. A determinação fenotípica de MBLs foi realizada pela aproximação de disco com ceftazidima (CAZ) e ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA)⁷ e pelo E-test MBL (AB Biodisk, Dalvågen, Solna, Sweden). Para confirmar a presença de genes de MBL em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp fenotipicamente positivas, foi realizada a amplificação dos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1}⁵. Adicionalmente, foi realizada a amplificação dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51} nas cepas de *Acinetobacter* sp. Em todas as análises, empregou-se a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle negativo e cepas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* portadoras dos genes analisados como controles positivos.

1. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS.

2. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

3. Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre, Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência: Dr^a. Gertrudes Corção. Dept^o de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/ICBS/UFRS. R. Sarmento Leite 500/sala 158, Cidade Baixa, 90050-170 Porto Alegre, RS.

Telefax: 55 51 3308-4111

e-mail: corcao@ufrgs.br

Recebido para publicação em 06/11/2009

Aceito em 09/04/2010

Em relação ao perfil de sensibilidade ao imipenem, sete cepas de *Acinetobacter* sp e duas *P. aeruginosa* apresentaram resistência. Todas as 13 cepas foram resistentes a ceftazidima e três *P. aeruginosa* resistentes, também, ao aztreonam. Dentre as 13 cepas avaliadas, nove *Acinetobacter* sp e duas *P. aeruginosa* tiveram teste fenotípico (E-test MBL) positivo para MBL, mas todas foram negativas no teste CAZ/2-MPA. A maioria das cepas estudadas demonstrou razões de CIM de imipenem e imipenem com EDTA entre 12 a 42 µg/mL e um isolado de *P. aeruginosa* apresentou este valor extremamente elevado (256 µg/mL) (**Tabela 1**).

As duas cepas de *P. aeruginosa* com fenótipo de MBL foram positivas apenas para o gene *bla*_{SPM-1}. Os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{IMP-1} não foram encontrados entre as cepas de *Acinetobacter* sp. Contudo, a pesquisa do gene *bla*_{OXA-23} foi positiva em oito cepas de *Acinetobacter* sp e quatro continham, simultaneamente, o gene *bla*_{OXA-51}. A presença deste gene é uma indicação que estas quatro cepas sejam *A. baumannii* (**Tabela 1**).

Apesar da detecção da resistência pelos laboratórios clínicos de microbiologia ser uma ferramenta valiosa para os serviços de controle de infecção hospitalar, a prática ainda constitui um grande problema, pois a maioria dos isolados resistentes apresenta mais de um mecanismo envolvido e várias recomendações têm sido descritas para melhorar sua pesquisa. No entanto, até o momento, o CLSI não sugere nenhum teste para detecção de amostras produtoras de MBL, contrariando a realidade brasileira, onde diversos estudos apontam a presença dessa enzima em cepas de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp e *Enterobacteriaceae* isoladas em distintos hospitais^{3,8}.

Classicamente, as bactérias produtoras de MBL são sensíveis ao aztreonam, mas os nossos resultados demonstraram que nenhuma cepa de *P. aeruginosa* apresentou este comportamento. Assim, é

provável que exista outro mecanismo de resistência nestas bactérias, provavelmente a produção de uma ESBL. Segundo Arakawa e cols⁷, o substrato mais adequado para pesquisa de metalo-enzima é a ceftazidima (30 µg), pois amostras produtoras de MBLs usualmente demonstram alto nível de resistência a este antimicrobiano (CIM > 64 µg/mL), além de considerável efeito inibitório dos compostos tiólicos (2-MPA). Contudo, no presente estudo nenhuma das cepas pôde ser detectada por esta metodologia.

Estudos de comparação entre testes fenotípicos para a detecção de metalo-β-lactamases foram realizados demonstrando que os mesmos são pouco eficientes para isolados do gênero *Acinetobacter*⁹. Existe grande discordância na literatura quanto à melhor técnica fenotípica para detecção de MBL. Alguns trabalhos mostram que o 2-MPA oferece maior sensibilidade^{7,10} apesar da interpretação ser difícil e subjetiva, enquanto outros apontam que o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) pode ser usado com sucesso¹¹. Walsh e cols¹¹ orientam que a realização de testes específicos para a detecção de MBL não tem impacto significativo na conduta terapêutica, pois a maioria absoluta dos isolados produtores desta enzima já apresenta resistência aos carbapenens quando testados por disco difusão. Possivelmente, tais discrepâncias estejam relacionadas com a espécie bacteriana em estudo e os tipos de metalo-enzimas envolvidos.

Com emprego de EDTA (E-test MBL), a maioria das cepas apresentou fenótipo de MBL, mas somente duas continham o gene *bla*_{SPM-1}. Os resultados falso-positivos ocorreram em todas as nove cepas de *Acinetobacter* sp e em duas *P. aeruginosa*. Este achado pode ser explicado pela ação do EDTA sobre a permeabilidade da parede celular que aceleraria a decomposição do imipenem e diminuiria a expressão de proteínas de membrana¹². Igualmente, a presença de

TABELA 1- Perfil de resistência, produção de MBL e amplificação de genes *bla* de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp isoladas de amostras clínicas do Hospital de Emergência de Porto Alegre, RS.

Cepa	Bactéria	MIC IP/IPI		Fenótipo de MBL	Gene <i>bla</i>
		CAZ/CPM/ IPM/ATM	E- test (µg/mL)		
1	<i>P. aeruginosa</i>	R/R/R/R	256	negativo	<i>bla</i> _{SPM-1}
3	<i>Acinetobacter</i> sp	R/S/S/NT	< 4	negativo	negativo
6	<i>Acinetobacter</i> sp	R/R/R/NT	16	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23'} <i>bla</i> _{OXA-51}
7	<i>P. aeruginosa</i>	R/R/S/R	< 4	negativo	negativo
8	<i>P. aeruginosa</i>	R/S/S/R	< 4	negativo	negativo
10	<i>Acinetobacter</i> sp	R/R/R/NT	16	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23'} <i>bla</i> _{OXA-51}
11	<i>Acinetobacter</i> sp	R/R/R/NT	12	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23'} <i>bla</i> _{OXA-51}
13	<i>Acinetobacter</i> sp	I/R/S/NT	32	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23'} <i>bla</i> _{OXA-51}
14	<i>P. aeruginosa</i>	R/R/R/I	42	negativo	<i>bla</i> _{SPM-1}
15	<i>Acinetobacter</i> sp	I/R/R/NT	32	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23}
16	<i>Acinetobacter</i> sp	I/I/R/NT	24	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23}
17	<i>Acinetobacter</i> sp	R/R/R/NT	24	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23}
18	<i>Acinetobacter</i> sp	I/I/R/NT	16	negativo	<i>bla</i> _{OXA-23}
Controle + <i>P. aeruginosa</i>		R/R/R/S	170	positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}

CAZ: ceftazidima, CPM: cefepime, IPM: imipenem, ATM: aztreonam, R: resistente ao antimicrobiano testado, S: sensível ao antimicrobiano testado, I: intermediário ao antimicrobiano testado, NT: não testado, MIC IP: imipenem, MIC IPI: imipenem + EDTA.

agente quelante, EDTA, pode promover a conversão de enzimas OXA em suas formas monovalentes que são menos ativas sobre os carbapenens¹³. Por isso, recomenda-se cautela na interpretação de E-test MBL.

No presente estudo, a resistência aos carbapenens em *Acinetobacter* sp foi atribuída à presença de genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}. A presença de oxacilinase tipo OXA-23 na maioria das cepas de *Acinetobacter* sp denota a sua relevância tanto por seu potencial de disseminação quanto por seu espectro de ação. Os genes para a enzima tipo OXA-51 ocorrem naturalmente em isolados da espécie *A. baumannii*, não aparecendo em outras espécies deste gênero¹⁴. Por esta razão, muitos estudos têm utilizado o gene *bla*_{OXA-51like} para a identificação desta espécie, que é a mais comum em infecções nosocomiais causadas pelo gênero *Acinetobacter*. A presença deste gene não está necessariamente relacionada com resistência a carbapenens, pois depende da sequência *ISAbal*, o qual quando localizado acima do *bla*_{OXA-51} funciona como promotor da expressão, contribuindo para o aumento dos níveis de resistência a carbapenens¹⁵.

Apesar da detecção fenotípica de MBL nos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp resistentes à ceftazidima, são necessários testes moleculares para confirmar o fenótipo de metaloenzima nas respectivas bactérias. Portanto, deve-se interpretar cautelosamente o resultado fenotípico de MBL obtido com E-test® MBL dado o elevado número de resultados falso-positivos. Por outro lado, o teste de disco aproximação CAZ/2-MPA subestimou a presença da metalo-enzima em *P. aeruginosa*.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUPORTE FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Feevale.

REFERÊNCIAS

- Cipriano R, Vieira VV, Fonseca EL, Rangel K, Freitas FS, Vicente AC. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM-1} clone, spread in hospital in a Brazilian Amazon city. *Microbial Drug Resistance* 2007; 13:142-146.
- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrob. Surveillance Program. *Bras J Infect Dis* 2001; 5: 201-213.
- Torres ACG, Vilarinho DSO, Melo RS, Silva CFL, Cereda RF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital Brazil. *J Infect Dis* 2004; 8:267-271.
- Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Souza JMA, et al. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:388-390.
- Gräf T, Fuentesfria DB, Corção G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:306-308.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2007.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38:40-43.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producer of SPM Metallo- β -Lactamase in distinct Brazilian regions. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:699-702.
- Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:5-11.
- Lee K, Lim YS, Yong 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. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4623-4629.
- Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales AC. Evaluation of a new E test for detecting metallo- β -lactamase in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2755-2759.
- Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2313-2315.
- Danel F, Paetzel M, Strynadka NC. Effect of divalent metal cations on the dimerization of OXA-10 and -14 class D β -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 2001; 40:9412-9420.
- Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho JM, Dijkshoorn I, Reijden T, et al. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in southeast England. *J Hosp Infect* 2006; 58:170-179.
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:123-130.