

Caracterização molecular de genes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*

Lívia Roberta Pimenta Souza

Humberto de Carvalho Aragão Neto

Hospital Universitário Lauro Wanderley

João Pessoa, 16 de agosto, 2024

Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo não fermentador de crescimento rápido amplamente encontrado na fauna e flora de ambientes aquáticos e terrestres, bem como em áreas hospitalares e equipamentos médicos. Em humanos, essa bactéria é comumente isolada em amostras nosocomiais, nas quais é responsável por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) agudas e crônicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos, indivíduos com queimaduras graves ou com fibrose cística. Estudos demonstram que a frequência de óbitos associadas a IRAS por *P. aeruginosa* alcança a faixa de 47%, variando de acordo com o setor hospitalar pesquisado. Sendo assim, em 2017, esse bacilo foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um patógeno oportunista importante, sendo classificado como umas bactérias mais ameaçadoras à vida e inserida na lista de patógenos prioritários na pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (Behzadi, Baráth e Gajdács, 2021; Costa *et al.*, 2022; Thi, Wibowo e Rehm, 2020).

A correlação entre os casos de óbitos e a *P. aeruginosa* está intimamente ligada à capacidade desse microrganismo em desenvolver resistência a diversos antimicrobianos. Dentre os principais mecanismos de resistência, pode-se citar a produção de enzimas beta-lactamases, como cefalosporinases e carbapenemases. (Campana *et al.*, 2017). Sendo assim, foram selecionados 4 principais genes relacionados a esse mecanismo de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*: *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}* e *bla_{VIM}*.

Metodologia

Após a solicitação médica da cultura microbiológica de pacientes internos que apresentaram quadros infecciosos, a equipe de enfermagem realizou a coleta a partir do sítio solicitado e encaminhou para o laboratório de bacteriologia, onde foram prontamente processadas. As amostras foram semeadas em meios específicos de acordo com a sua característica e natureza e a bactéria foi isolada para a confirmação da identificação por testes bioquímicos ou sistema automatizado e realização do antibiograma. A escolha entre esses métodos depende de vários fatores, incluindo precisão, custo, tempo e complexidade do caso. Posteriormente, a identificação da *P. aeruginosa* foi confirmada por espectrometria de massas através da tecnologia de Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF). A avaliação do perfil de sensibilidade ocorreu tanto pelo método de disco de difusão em ágar Mueller-Hinton quanto por meio da utilização do Vitek® 2. A extração do DNA ocorreu por meio do

sistema automatizado Maxwell®. A técnica de Polymerase Chain Reaction foi utilizada para amplificar uma região específica de DNA, sendo as amostras submetidas à investigação quanto à presença de *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}* e *bla_{VIM}*, através dessa técnica. Após amplificação do DNA, a revelação do produto amplificado foi feita com eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualização em luz ultravioleta. As bandas experimentais foram comparadas com bandas controle para constatar a amplificação do gene de interesse.

Resultados

A amostra do estudo foi composta por 48 isolados de *P. aeruginosa*.

Imagem 1. Eletroforese em gel de agarose para o gene *bla_{KPC}*

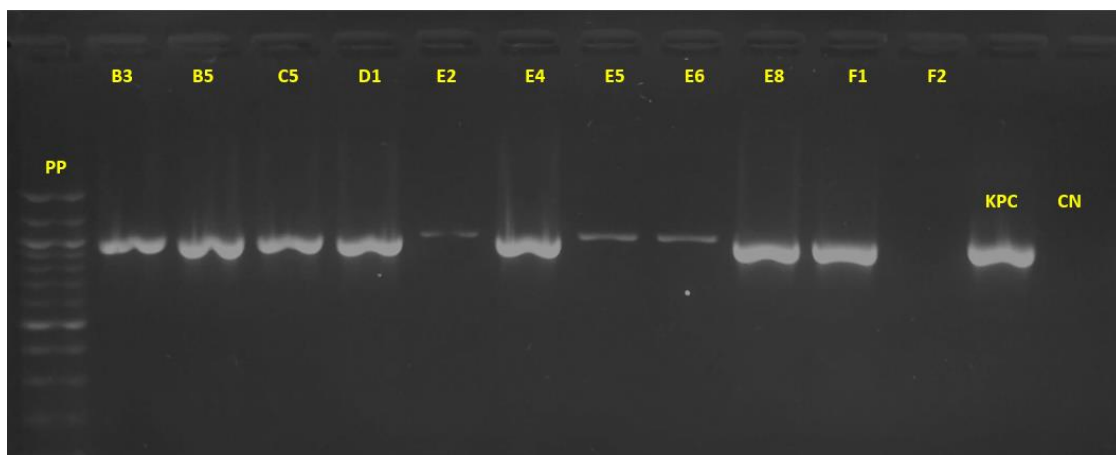
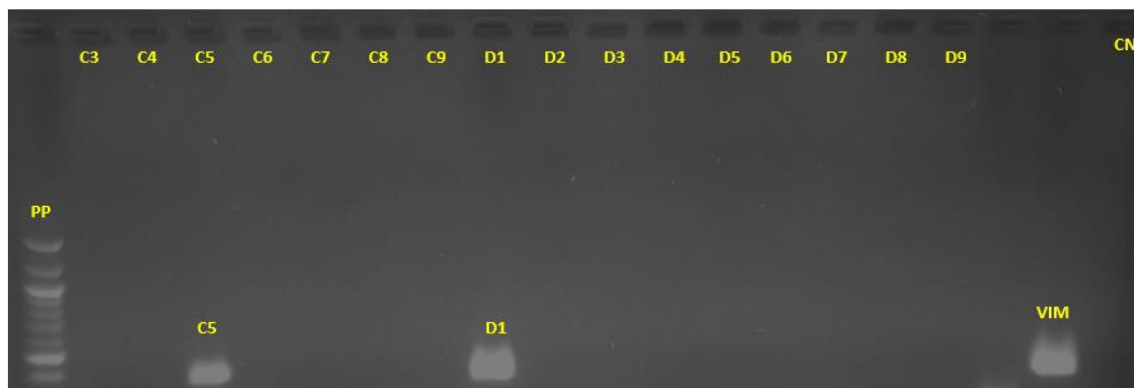


Imagem 2. Eletroforese em gel de agarose para o gene *bla_{VIM}*



Quadro 4. Perfil genotípico e de suscetibilidade dos isolados positivados na PCR convencional

Amostra	Genótipo		Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos											
	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	AMI	MER	CAZ	ATM	LVX	CPM	IPM	PPT	CZA	CZT	CIP	PB
B3	+	-	S	S	R	R	-	R	-	R	-	-	I	-
B5	+	-	R	R	R	R	I	R	R	-	-	-	-	-
C5	+	+	R	R	R	R	-	R	-	R	-	-	R	R
D1	+	+	R	R	R	R	-	R	R	R	-	-	R	R
E4	+	-	R	R	R	R	I	R	R	-	-	-	-	-
E8	+	-	S	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-
F1	+	-	R	R	-	-	-	R	-	R	-	-	R	-

Tabela 5. Suscetibilidade dos isolados aos betalactâmicos testados e a presença do gene *bla_{KPC}*

ATB	Suscetibilidade	<i>bla_{KPC}</i>		Total testado
		Presença	Ausência	
MER	Sensível	1 (2,1%)	19 (39,6%)	48 (100,0%)
	Sensível, aumentando exposição	0 (0,0%)	5 (10,4%)	
	Resistente	6 (12,5%)	17 (35,4%)	
IPM	Sensível	0 (0,0%)	0 (0,0%)	21 (100,0%)
	Sensível, aumentando exposição	0 (0,0%)	8 (38,1%)	
	Resistente	4 (19,0%)	9 (42,9%)	

Discussão

O Quadro 4 resume os achados da PCR convencional e apresenta também o perfil de suscetibilidade de cada isolado em que foram identificados genes, sendo visto ausência de *bla_{SPM}* e *bla_{NDM}* nas amostras coletadas. É possível observar que houve 2 isolados com coexpressão dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}*, sendo possível ver que ambos foram resistentes as todas as classes testadas. Quanto aos outros antimicrobianos, seu mecanismo de resistência pode estar associado a outros fatores intrínsecos a *P. aeruginosa*, como a produção de bombas de efluxo e produção de enzimas modificadoras e permeabilidade da membrana externa (Pacheco et al, 2019).

Na tabela 5, pode-se observar que dos 07 isolados positivos para o gene *bla_{KPC}*, em 6 deles o meropenem se apresentou como resistente. Este fato é condizente com a presença do gene *bla_{KPC}* e sua capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos. Entretanto, 1 dos isolados positivos para presença do gene se manteve sensível ao antibiótico. Encontrar bactérias que sejam positivas para a enzima carbapenemase do tipo KPC e que sejam sensíveis ao meropenem pode ser desafiador devido à natureza usualmente

resistente dessas bactérias. No entanto, pesquisas têm identificado casos raros ou excepcionais em que isso ocorre. Assim, investigaram a sensibilidade ao meropenem em isolados de *Klebsiella pneumoniae* que produzem KPC. Eles identificaram um pequeno subconjunto de isolados que eram sensíveis ao meropenem, apesar de serem produtores de KPC. Os autores sugerem que essa susceptibilidade variável pode ser explicada por uma série de fatores como supressão genética que leva a um silenciamento do gene ou que a expressão do gene seja dependente do número de cópias de plasmídeos (Maciel, 2014; Oliva et al, 2023)

Entretanto, nossos resultados apontam que a presença do gene *bla_{KPC}* não é a principal causa de resistência ao meropenem, pois do total das 23 amostras resistentes, 16 foram negativas para a presença do referido gene. Assim, podemos inferir que outros mecanismos de resistência possam estar presentes como a produção de outras carbapenemases (IMP, OXA e GES) que não foram avaliadas pelo presente estudo. Além disso, podem ocorrer mutações nos genes codificadores das bombas de efluxo, causando a superexpressão desses sistemas, a exemplo do MexAB-OprM, que em outros estudos foi relacionada ao comprometimento da ação do meropenem (Hassuna et al, 2020; Perales, 2023).

Os dados acerca da resistência ao imipenem mostraram que dos 13 isolados resistentes ao antibiótico citado, apenas 4 foram positivos para o gene *bla_{KPC}*. Desse modo, pode-se sugerir que a resistência encontrada nos outros 9 isolados pode ter ocorrido por outros mecanismos como alterações na OprD, uma porina da membrana externa responsável por conferir resistência ao imipenem. Tais modificações podem acontecer pela inativação ou destruição de pelo menos um dos promotores de OprD, a terminação prematura da transcrição dessa proteína e a correção com outros mecanismos de resistência (Kiani et al, 2021).

Conclusão

Portanto, evidencia-se que parte das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas apresentam um mecanismo de resistência não relacionado com os genes estudados como a perda de porina, superexpressão de bombas de efluxo, produção de metilases 16S rRNA e produção de outras beta-lactamases. Dos 48 isolados, houve presença do gene *bla_{KPC}* em apenas 14,6% (n=7) e do gene *bla_{VIM}* em 4,2% (n=2), no entanto, os isolados apresentaram resistência ao meropenem e imipenem em 48% e 62%, respectivamente. Esses achados indicam a necessidade de mais estudos, com critérios de inclusão mais

rigorosos, para identificar os possíveis mecanismos envolvidos na resistência das cepas de *P. aeruginosa*.

Outro ponto que merece destaque é que foi observada a associação de mecanismos de resistência (co-produção KPC e VIM), ressaltando a importância de investir em melhorias no diagnóstico, como a implementação de testes imunocromatográficos para a identificação das carbapenemases presentes nas amostras clínicas dos pacientes internos, o que auxiliaria na escolha dos antibióticos para os pacientes de forma mais individualizada.

Apesar da baixa expressão, os isolados que expressaram o gene *bla_{KPC}* apresentaram resistência aos antimicrobianos testados quase que em sua totalidade, confirmando que a expressão desse gene é um importante mecanismo de resistência. Além disso, a presença do gene *bla_{KPC}* em algumas cepas de *P. aeruginosa* torna o tratamento mais complexo e com maior taxa de falha. Dessa forma, é necessário continuar adotando estratégias de controle rigorosas para evitar a propagação dessas cepas.

Referências

BEHZADI, P.; BARÁTH, Z.; GAJDÁCS, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 42, 4 jan. 2021.

CAMPANA, E. H. et al. Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 57–62, fev. 2017.

COSTA, G. B. D. et al. Aspectos microbiológicos, clínicos e epidemiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por *pseudomonas aeruginosa* em um hospital universitário / Microbiological, clinical and epidemiological aspects of healthcare-associated infections caused by *pseudomonas aeruginosa* in a university hospital. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 27069–27085, 14 abr. 2022.

HASSUNA, N. A. et al. Molecular Epidemiology and Mechanisms of High-Level Resistance to Meropenem and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 285–293, 30 jan. 2020.

KIANI, M. et al. Upstream region of OprD mutations in imipenem-resistant and imipenem-sensitive *Pseudomonas* isolates. **AMB Express**, v. 11, p. 82, 5 jun. 2021.

MACIEL, W. G. **Detecção molecular do gene *bla_{KPC}* em *Klebsiella pneumoniae***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, 2014.

OLIVA, A. et al. Ceftazidime/avibactam-resistant meropenem-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Analysis of cases and evaluation of in vitro activity of fosfomicin-containing combinations. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 33, p. 321–327, jun. 2023.

PACHECO, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Co harboring BlaKPC-2 and BlaVIM-2 Carbapenemase Genes. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 98, 20 jul. 2019.

PERALES, Y. B. L. **Resistências bacterianas emergentes em *Pseudomonas aeruginosas***: uma revisão da literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2023.

PERALES, Y. B. L. **Resistências bacterianas emergentes em *Pseudomonas aeruginosas***: uma revisão da literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2023.