

# ***Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos produtor de NDM-1**

## *Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa bringing NDM-1*

Paulo Ricardo Freitag Jorge<sup>1</sup>, João Paulo Pimenta<sup>2</sup>, Cristiane Silveira de Brito<sup>3</sup>, Rosineide Marques Ribas<sup>3</sup><sup>ID</sup>, Paulo Pinto Gontijo Filho<sup>3</sup><sup>ID</sup>, Lizandra Ferreira de Almeida e Borges<sup>3</sup><sup>ID</sup>

### 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- $\beta$ -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- $\beta$ -lactamases. **Resultados:** Das 95 cepas analisadas, todas resistentes aos carbapenêmicos, 20% eram fenotipicamente positivas para metalo- $\beta$ -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; Metalo- $\beta$ -lactamase.

<sup>1</sup> Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Check-Up Medicina Laboratorial, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> 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- $\beta$ -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- $\beta$ -lactamases genes. **Results:** Among the 95 strains analyzed, all were resistant to carbapenems, 20% were phenotypically positive for metallo- $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -Lactamase (MBL)<sup>1</sup>.

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  $\beta$  lactamase), que representam um grupo de enzimas que hidrolisam e inativam os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, detectadas desde o início da década de 1940<sup>1,2</sup>.

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.)<sup>1,3</sup>. Desde então, bactérias produtoras de NDM foram detectadas em vários países<sup>4</sup>.

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 Bahia<sup>4</sup>.

A presença de produtores de NDM em unidades de saúde é um problema médico cada vez mais frequente que compromete a eficácia do tratamento<sup>4</sup>. 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 utilizadas<sup>2</sup>. Este estudo relata a ocorrência de metalo- $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\mu$ L) continha 12,5 $\mu$ L *GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix*, 0,75 $\mu$ L de cada par de primers, 10 $\mu$ L de água ultrapura e 1 $\mu$ L de DNA<sup>5</sup>. As amplificações foram realizadas no *Mastercycler 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<sup>™</sup> 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- $\beta$ -lactamase.

Primer	Sequência de primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento
<i>bla</i> IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	42°C
<i>bla</i> IMP-R	CCAAACCACTACGTTATCT	
<i>bla</i> SIM-F	TACAAGGGATTTCGGCATCG	47°C
<i>bla</i> SIM-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
<i>bla</i> GIM-F	TCGACACACCTTGGTCTGAA	47,5°C
<i>bla</i> GIM-R	AACCTTCCAACCTTGGCCATGC	
<i>bla</i> SPM-1 F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	46,5°C
<i>bla</i> SPM-1 R	ACATTATCCGCTGGAACAGG	
<i>bla</i> NDM-1 F	GCCAAAGTTGGGCGCGGTTG	55°C
<i>bla</i> NDM-1 R	ACCGCCTGGACCGATGACCA	
<i>bla</i> VIM-F	GATGGTGTGTTGGTTCGCATA	47°C
<i>bla</i> VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	

Fonte: Woodford (2010)<sup>5</sup>.

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 $\mu$ 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  $\geq 5$ mm dos halos nos discos que são suplementados com EDTA<sup>6</sup>.

## 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 *bla*SPM-1 e dois para *bla*NDM-1 (Tabela 2), provenientes de 2013, 2015 e 2017, respectivamente, e todos de BSI (Figura 1). Nenhum amplicon foi detectado para os genes *bla*SIM, *bla*VIM, *bla*IMP e *bla*GIM.

Dos isolados, 52,6% foram resistentes aos  $\beta$ -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 *bla*NDM-1 e *bla*SPM-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-avibactam<sup>7</sup>.

A resistência a quase todas as classes de antibióticos já está bem estabelecida, incluindo aos aminoglicosídeos, cefalosporinas, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e, mais recentemente, colistina. Assim, as opções terapêuticas disponíveis para pacientes com infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* portadora do gene *bla*NDM são escassas<sup>1</sup>. No presente estudo, a Polimixina foi o agente antimicrobiano mais eficaz, porém algumas amostras já estão apresentando resistência a ela.

Shahin & Ahmadi (2021)<sup>8</sup> que relataram *bla*NDM-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.

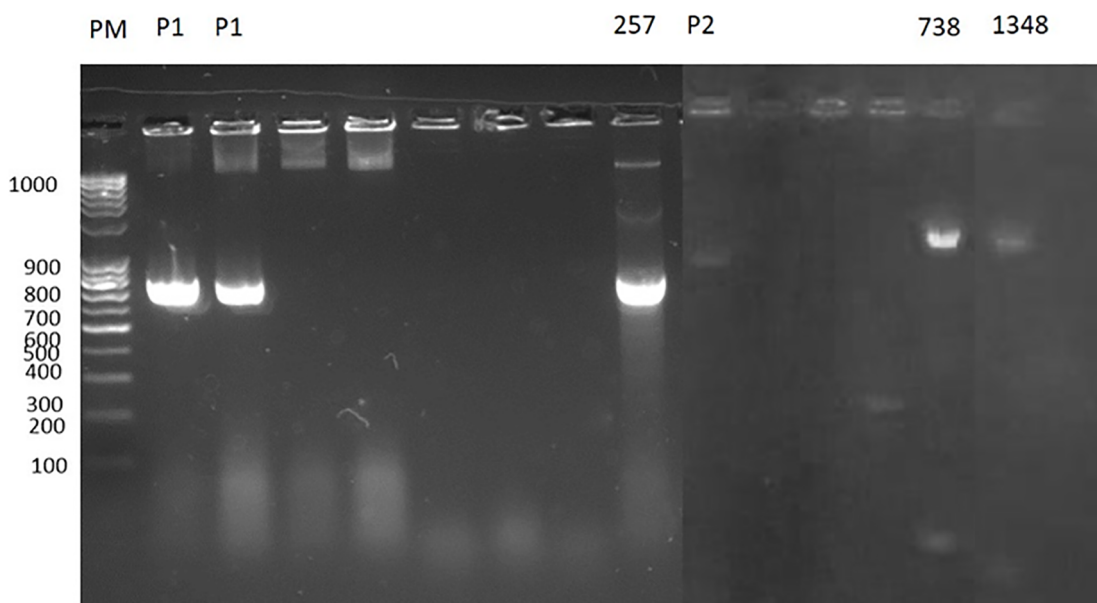
Os dados gerais mostram que a frequência de isolados de *P. aeruginosa* produtores de *bla*NDM-1 foi de 2,1% (2/95). Silva et al. (2019)<sup>4</sup> sugerem a presença desta variante no Brasil, entre 2012 e 2015, e que houve um aumento significativo de bactérias Gram negativas produtoras de NDM, além de muitos outros relatos de *bla*NDM-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 *bla*NDM-1, em Minas Gerais. E Perez et al. (2021)<sup>3</sup> 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 drogas<sup>9</sup>. 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 percebe<sup>7</sup>. O tipo de mecanismo, as oportunidades oferecidas pelas novas tecnologias, a necessidade de novos inibidores, especialmente para MBL, e a contínua importância clínica dos  $\beta$ -lactâmicos significam que esta área continua sendo de uma pesquisa em expansão<sup>10</sup>.

## 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 antibiograms 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  $\beta$ -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.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019 Ago;431(18):3472-500.

