

# DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DA OCORRÊNCIA DE AMPC BETA-LACTAMASES EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Laura Durão Ferreira<sup>1</sup>; Maria Amélia Vieira Maciel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: laudurao@gmail.com, <sup>2</sup>Professora do Depto de Medicina Tropical – CCS – UFPE. E-mail: amelia57@gmail.com.

**Sumário:** *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo conhecido por adquirir resistência à antimicrobianos. Várias estruturas e enzimas podem ser responsáveis pelo aumento na resistência bacteriana, uma delas sendo o objeto de estudo deste trabalho: a beta-lactamase AmpC. Este trabalho teve como objetivo testar a eficácia de novos testes fenotípicos propostos para detecção da AmpC, com posterior confirmação por meio de testes moleculares. Os 27 isolados utilizados foram obtidos de um hospital universitário de Recife-PE. Primeiramente foram realizados antibiogramas para identificação do perfil de resistência dos isolados obtidos e, depois, os testes fenotípicos foram executados. O teste proposto se mostrou de fácil execução, além de ser capaz de identificar as cepas que possuem a enzima AmpC de origem cromossomal. Os resultados obtidos mostraram que os isolados estudados possuem, em sua grande maioria, a enzima AmpC de origem cromossomal, e nenhum indício de AmpC plasmidial foi observado.

**Palavras-chave:** ampc, *Pseudomonas aeruginosa*, resistência bacteriana.

## INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* está entre os principais organismos gram-negativos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) nos EUA (CDC, 2013), sendo um bacilo gram-negativo não fermentador que tem resistência intrínseca a diversos agentes antimicrobianos, cujos genes envolvidos nessa resistência já foram encontrados em todos os continentes (PICÃO & GALES, 2007). No Brasil, *P.aeruginosa* também é um dos principais agentes causadores de IRAS e diversos estudos apontam para uma disseminação clonal da espécie (SADER *et al.* 1993; GALES *et al.*, 2004). Dados epidemiológicos e microbiológicos sugerem que o uso indiscriminado de antimicrobianos produziu uma grande pressão seletiva, selecionando cepas multirresistentes portadoras de genes de resistência; além disso, organismos gram-negativos são naturalmente menos susceptíveis à ação de antimicrobianos (CDC, 2013). Isso ocorre já que bactérias gram-negativas contêm uma membrana externa que impede a entrada de moléculas grandes ou hidrofóbicas, assim como a capacidade notável de adquirir cada vez mais novos mecanismos de resistência (STRATEVA *et al.*, 2009). Entre esses mecanismos temos as beta-lactamases (ESBL, KPC, MβL e AmpC) encontradas no espaço periplasmático e bombas de efluxo, (LIVERMORE *et al.*, 2012). Bush & Jacoby (2010) afirmam que a hidrólise de antibióticos por ação de beta-lactamases é o mecanismo mais comum de resistência nesse organismo. Além disso os autores afirmam que a presença dessas enzimas deve ser melhor caracterizada para que sejam feitas escolhas terapêuticas adequadas. As enzimas responsáveis por hidrolisar antimicrobianos beta-lactâmicos ( $\beta$ -lactamases) podem ser divididas em diversos grupos, como relatado por Bush & Jacoby (2010). O estudo afirma que beta-lactamases do tipo AmpC se encaixam entre as cefalosporinas do grupo 1 e diferem das ESBLs por normalmente serem resistentes à inibição pelo ácido clavulânico e promoverem a hidrólise das cefamicinas (SINGH *et al.*, 2013). Essa enzima é uma beta-

lactamase codificada constitutivamente por muitas bactérias gram-negativas, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* (BUSH *et al.*, 1995). Ela pode ser regulada por diversos genes, aumentando ou diminuindo sua expressão, e pode ter sua produção induzida por alguns beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases. Causas relacionadas ao aumento na expressão da AmpC incluem mutações em genes (como ampD e ampR), e drogas como ácido clavulânico, cefoxitina e imipenem atuam como fortes indutores da produção de AmpC (JACOBY *et al.*, 2009). O fato de que inibidores de beta-lactamase, comumente usados na clínica possuem efeito estimulante na síntese de AmpC é extremamente preocupante, já que estudos mostram que esse estímulo causado pelo ácido clavulânico é capaz de neutralizar o efeito antimicrobiano de drogas às quais ele é associado, como a ticarcilina (LISTER *et al.*, 1999). A resistência relacionada à produção de AmpC pode estar ainda relacionada à aquisição de plasmídeos contendo genes que codificam essa enzima (TANG *et al.*, 2014), mas são menos comumente encontrados do que genes de ESBLs e não são a principal causa de hiperprodução de AmpC (JACOBY *et al.*, 2009). A identificação laboratorial de enzimas do tipo AmpC - seja ela cromossomal ou plasmidial - se mostra importante à prática médica porque um isolado produtor de enzima AmpC pode se mostrar sensível a certos antimicrobianos no teste *in vitro* mas se comportar como resistente quando se tenta combater a infecção *in vivo*. A determinação da presença dessas enzimas, então, evitaria a implantação de tratamentos ineficazes e do desenvolvimento de resistência induzida à cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (JACOBY *et al.*, 2009). Diante da importância clínica dos isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*, bem como a carência de estudos moleculares que pesquisem os genes relacionados à mecansimos genéticos envolvidos neste processo, o presente trabalho teve por objetivo descrever dados microbiológicos da infecção e identificar mecanismos genéticos de resistência relacionados a produção de enzimas beta-lactamases do tipo AmpC, correlacionando ao padrão de susceptibilidade dos antimicrobianos em isolados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes internados de um hospital universitário de Recife, Pernambuco.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os 27 isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes do Laboratório de Microbiologia de um hospital universitário em Recife - PE foram devidamente identificados e estocados. Estes foram, então, semeados em Ágar Cetrimide para observação das características fenotípicas das colônias e em Ágar Nutriente para manutenção. Foi realizada ainda extração do DNA total, seguida de quantificação através de espectrofotometria. Foi realizado antibiograma pela técnica de difusão de discos em Ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2013). A seleção dos isolados para pesquisa fenotípica foi feita de acordo com o resultado dos isolados frente a um teste de screening proposto por Singh *et al.* (2013). Neste teste, isolados que obtivessem halo de inibição menor ou igual a 18mm quando em presença de discos de cefoxitina 30 µg foram considerados positivos, e posteriormente submetidos a mais dois testes fenotípicos. O primeiro teste tinha como objetivo detectar fenotipicamente a presença ou ausência de ampC induzível de origem cromossomal. Para isso os isolados de *P. aeruginosa* foram semeados em Ágar Mueller-Hinton (escala de MacFarland: 0,5) e discos de cefoxitina 30 µg e ceftazidima 30 µg foram posicionados de modo que um achatamento no halo de ceftazidima indicaria a produção de ampC induzível pelo isolado, enquanto a manutenção do formato circular indicaria a ausência. O segundo teste proposto por Singh *et al.* (2013) indicaria a presença de ampC de origem plasmidial.

## RESULTADOS

A análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados restantes permitiu a identificação de 3 organismos panresistentes e 5 isolados multidroga-resistentes. O screening feito a partir do uso de discos de cefoxitina 30 µg foi positivo para todos os isolados, de modo que grande parte não chegou a formar nenhum halo quando em presença do antimicrobiano. Desse modo, após o screening, todos os isolados foram submetidos a testes fenotípicos (para identificação da presença de beta-lactamases do tipo AmpC, seja ela cromossomal ou plasmidial) e alguns a testes genéticos (PCR). O teste responsável pela identificação de AmpC beta-lactamases de origem cromossomal mostrou positividade para quase todos os 27 isolados, com a exceção de apenas um deles. A positividade pode ser facilmente identificada devido à grande distorção nos halos de ceftazidima (Figura 1). Nenhum isolado mostrou positividade para o teste de detecção de AmpC de origem plasmidial.



Figura 1: Teste de aproximação positivo para P120 (achatoamento do halo) e sem resultado conclusivo para P121, por não haver formação do halo de ceftazidima

## DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como um de seus objetivos a realização de testes fenotípicos e a análise e capacidade de reprodução destas técnicas quando analisando os testes fenotípicos e genéticos em conjunto. Apesar dos testes genéticos não serem finalizados foi possível concluir que o teste fenotípico relativo à detecção de AmpC de origem cromossomal é de simples execução e resultado confiável. As PCRs, já padronizadas, para os genes ampD e ampE serão posteriormente realizadas para confirmação desses dados. Os resultados encontrados no screening diferem dos encontrados por Singh et al. (2013), onde apenas 8 dos 27 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* mostraram positividade para o screening de AmpC, enquanto em nosso estudo todos foram positivos (como dito anteriormente). Para o teste de aproximação de disco os resultados também se mostraram diferentes dos relatados por Singh et al. (2013), onde apenas um dos isolados positivos no teste de screening também mostrou positividade no teste de aproximação de discos. Isso mostra uma diferença no perfil dos isolados quando comparados à estudos estrangeiros.

## CONCLUSÕES

Este estudo conclui que o teste proposto para detecção de AmpC cromossomal é de fácil execução e, caso sua sensibilidade seja confirmada por testes genéticos, pode ser utilizado na rotina de laboratórios clínicos. É um teste importante pois a detecção da enzima AmpC pode levar à abordagens terapêuticas diferentes e mais eficientes, o que representa um lucro ao sistema de saúde e ao paciente. O estudo mostrou também que os perfis genéticos dos isolados estudados difere do já explicitado em outros estudos, o que representa um importante dado epidemiológico que faz com que seja possível tornar a abordagem e estratégias de tratamento mais específicas.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq para a realização desta pesquisa e ao apoio do grupo de pesquisa na interpretação de resultados.

## REFERÊNCIAS

- Bush, K. Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6):1211-1233.
- Bush, K., Jacoby, G. A. 2010. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 969–976.
- CLSI. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne.
- Gales, A. C.; Torres, P. L. 2004. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8(4): 267–271.
- Jacoby, G. A. AmpC beta-lactamases. 2009. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(1):161–182.
- Lister, P.D., Gardner, V.M., and Sanders, C.C. 1999. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:882–889.
- Livermore, D. M. 2012. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean Journal of Internal Medicine* 27:128-142.
- Picão, R. C., Gales, A. C. 2007.  $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: pesadelo ou só imaginação? *Infectologia* 49: 79-84.
- Sader, H. S. et al. 1993. Epidemiologic Typing of Multiply Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from an Outbreak in an Intensive Care Unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 17: 13–18.
- Singh, R. K. M., Pal, N. K., Banerjee, M., Sarkar, S., Saha, P., SenGupta, M. 2013. A simplified method of Three Dimensional technique for the detection of AmpC beta-lactamases. *Archives of Clinical Microbiology* 3: 1-7.
- Strateva, T., Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 58: 1133-1148.
- Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., Hsu, L. Y. 2014. Mechanisms of beta-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 78: 3-13.