

Detecção e determinação de resistência a drogas antimicrobianas de isolados nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa*

Bruna Cardoso Soares¹, Stephanie Wagner Gallo¹, Luciana R. Alcântara², Ana M. Sandri², Carlos Alexandre Sanchez Ferreira¹, Sílvia Dias de Oliveira¹ (orientador)

¹Faculdade de Biociências, PUCRS, Faculdade de Farmácia, PUCRS

²Serviço de Controle de Infecções, Hospital São Lucas, PUCRS

Introdução

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos e aeróbios estritos. A maioria exibe motilidade, utiliza a glicose e outros carboidratos de modo oxidativo e é habitualmente oxidase positiva (Winn Jr. et al., 2008). A espécie *P. aeruginosa* pertence ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, que tem como característica a produção do pigmento pioverdina, o qual possui uma fluorescência branca a azul-esverdeada sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo (King et al., 1954).

P. aeruginosa é uma das principais causas de infecções hospitalares, tendo emergido como um importante patógeno nosocomial em pacientes debilitados e imunocomprometidos, bem como em pacientes com fibrose cística. Este microrganismo produz vários fatores de virulência e apresenta uma grande capacidade de resistir a drogas antimicrobianas conferida, muitas vezes, pela sobreposição de diversos mecanismos de resistência, sejam intrínsecos ou por aquisição horizontal de genes. Um espectro relativamente estreito de agentes antimicrobianos é efetivo contra este microrganismo, incluindo as carboxipenicilinas, as ureidopenicilinas, as cefalosporinas antipseudomonas, os monobactams, os carbapenems, as quinolonas e os aminoglicosídeos. Quase todas as cepas são resistentes às outras penicilinas e cefalosporinas (Gales et al., 2001; Livermore, 2002).

Dentro deste contexto, este projeto tem como objetivo isolar e identificar *P. aeruginosa* a partir de amostras ambientais do Hospital São Lucas da PUCRS, bem como, determinar a resistência a drogas antimicrobianas destes isolados através de métodos fenotípicos e genotípicos.

Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento deste projeto foram realizadas coletas com suabes umedecidos com solução salina a 0,85% de diversos locais da UTI Geral Adulto e de um andar referente à internação pelo SUS do Hospital São Lucas da PUCRS, as quais incluem amostras de cama, ventilador mecânico, monitor cardíaco, termômetro e bomba de infusão de medicamentos, durante o período de abril a julho de 2011.

O material coletado foi transportado em caldo BHI para o Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências da PUCRS e cultivado em agitação a 37°C por 24h. Posteriormente, as amostras foram semeadas em ágar MacConkey e as colônias com morfologia típica de *P. aeruginosa* e com odor característico foram encaminhadas a testes bioquímicos tais como: oxidase e TSI. As amostras bioquimicamente compatíveis com *P. aeruginosa* foram submetidas ao teste de difusão de disco em agar Mueller Hinton para a determinação da resistência às seguintes drogas antimicrobianas: amicacina, aztreonam, cefepima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/clavulanato e tobramicina. Para a detecção de integrons de classe 1, 2 e 3 e metalo- β -lactamase IMP através da PCR, o DNA genômico foi obtido a partir do método descrito por Rademaker & Brujin (1997), que utiliza tiocianato de guanidina para romper as células. O DNA extraído foi utilizado como molde para a PCR utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação de 94°C durante 30 segundos; anelamento com temperatura de 57°C para integrons classe 1, 2 e 3 e 47°C para IMP-1 durante 30 segundos, alongamento a 72°C durante 30 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,6% corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL e visualizado sob radiação ultravioleta.

Resultados e Discussão

Dentre as seis amostras de *P. aeruginosa* encontradas no ambiente hospitalar, somente uma foi isolada a partir de amostra de cama do andar de internação pelo SUS, as demais foram identificadas a partir de cama, monitor do respirador,ambu e puxador do armário da UTI Geral Adulto. Todas as amostras isoladas da UTI mostraram-se resistentes aos seguintes antibióticos: amicacina, cefepima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem e tobramicina. Além disso, foi observada sensibilidade a piperacilina/tazobactam

e ticarcilina/clavulanato em 2% das amostras. Todos os isolados apresentaram-se sensíveis ao aztreonam. Por outro lado, a amostra isolada a partir do andar de internação pelo SUS mostrou-se sensível a todos os antibióticos testados.

A amplificação de um fragmento específico de 491 pb para a detecção de integrons classes 1, 2 e 3 foi observada nas cinco amostras isoladas a partir da UTI, confirmando os resultados de resistência obtidos através do antibiograma. Além disso, detectou-se a presença da metalo- β -lactamase IMP em quatro amostras, sendo estas isoladas da UTI, através da amplificação de um fragmento de 424 pb.

A presença de integrons em cerca de 83% das amostras isoladas do ambiente demonstra a importância de equipamentos e utensílios como reservatórios de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas com um potencial de transferência horizontal para outras bactérias do ambiente hospitalar, podendo constituir risco de infecção para pacientes internados.

Conclusões

Embora o número de amostras de *P. aeruginosa* isoladas até o momento seja reduzido, podemos observar que grande parte das mesmas apresenta resistência à maioria das drogas antimicrobianas testadas, sugerindo que isolados ambientais deste microrganismo podem constituir risco para infecções de difícil tratamento.

Apoio financeiro: BPA/PUCRS

Referências

- Gales A. C., Jones R. N., Turnidge J. et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clin Infect Dis** 32(Suppl 2): 2001; S146-S155.
- King E. O., Ward M. K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J Lab Clin Med** 1954; 44: 301-307.
- Livermore D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis** 2002; 34:634-640.
- Rademaker J.L.W., Bruijn F.J.; Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In DNA markers: protocols, applications, and overviews ed. **Caetano-Anollés, G, Gresshoff, P. M.** 151-171. New York: J. 1997.
- Win Jr. W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. In Diagnóstico microbiológico. Ed. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro. 2008.
- Woods D.E. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Trends Microbiol** 2004; 12: 437-43