ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

# IMP-5, metalo-ß-lactamase, em estirpes hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa*

/ **A. Brízio, F. Grosso, A. Duarte***
Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Lisboa

/ **G. da Silva**
Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Coimbra

/ **T. Conceição**

*Autor correspondente:
**Aida Duarte**, Laboratório de Microbiologia
Faculdade de Farmácia. Av. Forças Armadas
1649-019 Lisboa
Tel.:351 21 7946440 / Fax: 351 21 7934212
E-mail: aduarte@ff.ul.pt

## / Resumo

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes responsáveis por infecções nosocomiais, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. Dado o aumento do uso dos carbapenemos na antibioterapia, este estudo tem como objectivo a pesquisa de metalo-ß-lactamases em estirpes clínicas de *P. aeruginosa*. A presença de genes de carbapenemases ($bla_{IMP}$ e $bla_{VIM}$) foi pesquisada por reacção de PCR recorrendo a primers específicos. Uma vez que estes genes estão, normalmente, inseridos em integrões de classe 1, procedeu-se à reacção de PCR com primers para as regiões conservadas 5'CS e 3'CS. Em todas as estirpes verificou-se a presença do gene $bla_{IMP-5}$, constituindo parte de uma "gene cassette" em integrões de classe 1. É a primeira vez que a metalo-ß-lactamase IMP-5 é identificada em estirpes de *P. aeruginosa* de três hospitais portugueses. Estes resultados sugerem a facilidade com que o gene $bla_{IMP-5}$, localizado num integrão de classe 1, se dissemina entre diferentes estirpes e entre diferentes espécies como a *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

## / *Abstract*

*Pseudomonas aeruginosa is one of the principal agents responsible for nosocomial infections, especially among imunodepressed patients. Since the vast use of carbapenems in antibiotherapy, the aim of this work was to analyse the presence of metallo-ß-lactamase in P. aeruginosa clinical isolates. The presence of carbapenemases genes ($bla_{IMP}$ and $bla_{VIM}$) was determinate by PCR reaction with specific primers. The genes are, normally, present in class 1 integrons, so it was performed PCR reaction with primers for 5'CS and 3'CS conserved regions. The $bla_{IMP-5}$ gene was present in all strains, being part of a class 1 integron gene cassette. This is the first report of IMP-5 metallo-ß-lactamase found in P. aeruginosa in three Portuguese hospitals. These results suggest the ease of the $bla_{IMP-5}$ gene located on class 1 integrons to spread among different strains and bacterial species like P. aeruginosa and A. baumannii.*

## / Introdução

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes responsáveis por infecções nosocomiais, principalmente em individuos imunodeprimidos. A patogenicidade desta bactéria, poderá não estar directamente relacionada com factores de virulência específicos, mas sim pelo facto de apresentar multiresistência aos agentes antimicrobianos. Os genes responsáveis pela expressão de várias enzimas descritas neste género podem estar em plasmídeos, transposões e/ou integrões, o que facilita a sua disseminação. Além da produção de enzimas que inactivam os antibióticos, podem estar



associados outros mecanismos de resistência, nomeadamente modificação da permeabilidade da membrana celular, alteração do local de acção do antibiótico e um sistema de exportação do antibiótico da célula ou efluxo [1].

Dentro do grupo dos antibióticos β-lactâmicos, os carbapenemos que têm apresentado estabilidade às β-lactamases têm sido utilizados no tratamento de doenças infecciosas, causadas por bactérias multiresistentes. Contudo verifica-se uma crescente resistência a estes antibióticos por parte de bactérias como a *P. aeruginosa*, o que poderá ser explicado pela produção de metalo-β-lactamases (MBL) [2].

A primeira metalo-β-lactamase IMP-1 foi encontrada em *Serratia marcescens* e *P. aeruginosa* no Japão. Variantes da IMP-1 (IMP-2 a IMP-12) têm sido detectadas em vários géneros bacterianos, nomeadamente a IMP-5 que foi identificada num *Acinetobacter baumannii*, isolado nos Hospitais da Universidade de Coimbra, em Portugal [3].

No grupo de genes que codificam para as diversas metalo-β-lactamases, os genes $bla_{IMP}$ e $bla_{VIM}$ parecem ser os mais importantes clinicamente, uma vez que são os que se disseminam mais facilmente entre as principais bactérias patogénicas [3].

Os genes que codificam para as carbapenemases IMP e VIM foram encontrados em integrões de classe 1 [2,3,4].

Os integrões de classe 1 possuem dois segmentos conservados (5'CS e 3'CS) separados por uma região variável que pode incluir genes de resistência a antibióticos ou genes de função desconhecida [5], na forma de "gene cassettes". As "gene cassettes" são unidades móveis que contém um gene, normalmente um gene de resistência a antibióticos, e um sítio de recombinação [3].

O segmento conservado 5' (5'CS) inclui o gene da integrase, *intI*, que permite a integração das "gene cassetes" no sítio de recombinação, *attI*. O segmento conservado 3' (3'CS) contém o gene *qacEΔ1* que determina a resistência ao brometo de etídio e aos compostos de amónio quaternário, o gene *sulI* que confere resistência às sulfonamidas, e ainda uma "open reading frame" (ORF) de função desconhecida [5,6].

A associação dos genes $bla_{IMP}$ em integrões e o aumento do uso dos carbapenemos, como é o caso do imipenemo e meropenemo, contribuem para a disseminação da resistência a estes antibióticos o que vem fomentar a dificuldade do controlo das infecções nosocomiais.

Desta forma, este trabalho tem como objectivo a pesquisa e caracterização de metalo-β-lactamases em *P. aeruginosa* isoladas em três hospitais de Portugal.

## / Materiais e Métodos

### Estirpes bacterianas

Dez estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas de nove secreções brônquicas e de uma urina de doentes dos hospitais de São Bernardo em Setúbal; de Santa Maria e de Dona Estefânia em Lisboa.

Células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen®) foram utilizadas como células receptoras de plasmídeos recombinantes.

**Antibióticos e testes de susceptibilidade**
O teste de susceptibilidade aos antibióticos foi realizado pelo método de difusão dos discos em gelose. Os antibióticos β-lactâmicos usados foram os seguintes: imipenemo, meropenemo, cefotaxima, ceftazidima e aztreonamo. A classificação de resistente, intermédio e sensível foi efectuada de acordo com os critérios definidos pelo *National Committee of Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)[7].
Para os antibióticos cefoxitina e cefuroxima foram considerados os valores fornecidos pelo fabricante dos discos de antibióticos (Bio-Rad)
As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) foram determinadas para os mesmos antibióticos β-lactâmicos pelo método do E-teste (AB-Biodisk).

**Reacção de PCR**
A extracção do DNA total foi realizada segundo o método descrito por Lévesque *et al.*[5]. Para a reacção de PCR utilizaram-se puRe Taq™Ready-To-Go™PCR Beads (Amersham Biosciences). A amplificação do DNA foi realizada num aparelho de termociclo (Biometra). A pesquisa do gene $bla_{IMP}$ foi efectuada utilizando primers específicos, OLG1 e OLG2, segundo a metodologia descrita por Senda *et al.*[4].
A pesquisa de integrões de classe 1 foi realizada utilizando primers específicos, IN5'CS e IN3'CS [4].
Os produtos de amplificação foram separados num gel de agarose a 1%, preparado em tampão TBE e visualizados com luz UV, após coloração com brometo de etídio.

**Clonagem dos fragmentos PCR**
Os produtos de PCR foram clonados em plasmídeos pBK-CMV segundo as instruções do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen®).
Os plasmídeos recombinantes foram introduzidos em células receptoras *E. coli* TOP10 e os transformantes foram seleccionados em meio Luria-Bertani suplementado com X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido), 50 μg/ml de Canamicina e 50 μg/ml de Ampicilina.

**Sequenciação do DNA**
As sequências de DNA foram determinadas nos dois sentidos quer nos produtos de amplificação, quer nos plasmídeos recombinantes pelo método de Sanger *et al.*[8] com o kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e analisadas no sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems).
As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com sequências disponíveis na base de dados utilizando o programa CLUSTAL W (http://www.ebi.ac.uk).

**Electroforese em campo pulsado (PFGE)**
Gel de electroforese em campo pulsado foi realizado segundo a metodologia descrita por Maslow *et al.*[9], num aparelho CHEF DRII (Bio-Rad). O DNA aprisionado nos blocos de agarose foi digerido "overnight" com a enzima de restrição *Spe*I (New England BioLabs Inc.). Os diferentes perfis de PFGE foram analisados segundo os critérios descritos por Tenover *et al.*[10].

## / Resultados

As dez estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram um espectro antibiótico comum, que se caracterizou pela resistência aos carbapenemos (imipenemo e meropenemo), cefalosporinas de segunda geração (cefoxitina e cefuroxima) e de terceira geração (cefotaxima). Relativamente à ceftazidima, aztreonamo e cefepima, verificou-se uma variabilidade das susceptibilidades para as diferentes estirpes.
A determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI's) confirmou os resultados obtidos pelo método dos discos. De acordo com a Tabela I, onde estão expressos os resultados das CMIs representativos das 10 estirpes em estudo, verificou-se para o imipenemo e meropenemo uma CMI ≥ 32 mg/L, para a cefoxitina, cefotaxima e cefuroxima CMI ≥ 256 mg/L. Para a ceftazidima e aztreonamo observaram-se CMI compreendidas entre 1,5 a 64 mg/L.
Em todas as estirpes, a presença de metalo-β-lactamases (MBL) foi confirmada pela inibição da actividade enzimática na presença de EDTA, com as tiras de E-teste MBL.
Uma vez que os genes de metalo-β-lactamases podem ser transportados em plasmídeos, efectuou-se o isolamento de DNA plasmídico pelos métodos descritos por Kado *et al.*[11] e Sambrook *et al.*[12], sendo o resultado negativo em todas as estirpes.
A detecção dos genes $bla_{IMP}$ e $bla_{VIM}$, pela reacção de PCR com primers específicos, apenas foi possível para o gene $bla_{IMP}$, tendo-se obtido um produto de amplificação esperado de 600pb.
Geralmente, os genes que codificam para β-lactamases tipo IMP encontram-se inseridos em integrões de classe 1, o que se verificou em todas as estirpes em estudo. Em nove das dez estirpes observou-se um produto de amplificação de 1200pb, o que é indicativo de um integrão com uma "gene cassette". Na restante estirpe (14Ps) obteve-se um produto de amplificação de cerca de 4000pb, sugerindo a presença de três "gene cassettes". Estes dados foram confirmados após sequenciação dos respectivos produtos de amplificação.
A sequência aminoacídica do gene $bla_{IMP}$, encontrado nas dez estirpes estudadas, apresentou uma homologia de 100% com a sequência da metalo-β-lactamase IMP-5, identificada pela primeira vez num *Acinetobacter baumannii*, em Portugal, e até à data ainda não foi encontrada noutro país. Na estirpe 14Ps associada à IMP-5, foram identificadas duas enzimas adicionais: uma β-lactamase (OXA-2), responsável pela resistência às aminopenicilinas e uma aminoacil-adeniltransferase (aadA2), responsável pela resistência aos aminoglicosidos.
Nos recombinantes *E. coli* 5PsT e *E. coli* 31PsT verificou-se para os carbapenemos uma CMI de 3 mg/L, valor inferior ao apresentado pela estirpes mães (CMI >32 mg/L), o que sugere a presença de outros mecanismos de resistência associados, nomeadamente alteração

**TABELA I** – CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS INIBIDORAS (CMI) DOS ANTIBIÓTICOS ß-LACTÂMICOS EM (mg/L) REPRESENTATIVAS DAS 10 ESTIRPES DE *P. AERUGINOSA*, DOS RECOMBINANTES *E. COLI* TOP10 E DA ESTIRPE DE REFERÊNCIA *E. COLI* TOP10 pBK-CMV

| Antibióticos ß-lactâmicos | CMIs (mg/L) | | |
|---|---|---|---|
| | Estirpes bacterianas | *E. coli* TOP10 recombinantes | *E. coli* TOP10 pBK-CMV |
| Imipenemo | > 32 | 3 | 0,25 |
| Meropenemo | > 32 | 6-12 | 0,023 |
| Cefoxitina | > 256 | > 256 | 8 |
| Cefotaxima | > 256 | 48-> 256 | 0,094 |
| Cefuroxima | > 256 | > 256 | 4 |
| Ceftazidima | 1,5-32 | 12-64 | 0,5 |
| Aztreonamo | 4-24 | 0,032-0,125 | 0,094 |

da permeabilidade ou um sistema de exportação de antibiótico.
Após a análise dos perfis de restrição do DNA cromossomal por PFGE, verificou-se a existência de perfis diferentes entre as dez estirpes de *P. aeruginosa*, sugerindo que as estirpes, encontradas nos três hospitais, não estavam relacionadas epidemiologicamente.

## / Conclusões

Os resultados sugerem que o gene $bla_{IMP-5}$, localizado em integrões de classe 1, se dissemina entre diferentes estirpes do mesmo género e entre espécies diferentes como a *P. aeruginosa* e o *A. baumannii*.
O aparecimento de agentes patogénicos que contém e expressam os genes $bla_{IMP}$ pode estar relacionado com o aumento do uso dos carbapenemos. Assim a introdução do imipenemo na terapêutica poderá ter facilitado a emergência destes genes de resistência por pressão selectiva.
Desta forma, tanto os microbiologistas como os clínicos devem estar alerta para a emergência de genes de carbapenemases associados ou não a integrões, não só em *P. aeruginosa* mas também noutras estirpes. Assim, torna-se imperativo o controlo de infecções causadas por estas estirpes e o uso prudente de antibióticos em meio hospitalar.

## / Agradecimentos

Os autores agradecem à Dr.ª Maria José Salgado do Hospital de Santa Maria, Lisboa; à Dr.ª Rosa Barros do Hospital de Dona Estefânia, Lisboa; e à Dr.ª Teresa Pinto Ribeiro do Hospital de São Bernardo, Setúbal, pela cedência das estirpes bacterianas. Este estudo foi suportado financeiramente pela ADEIM (Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação da Microbiologia).

## / Bibliografia

1. Gibb A P, Tribuddharat C, Moore R A, *et al.* Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new $bla_{IMP}$ allele, $bla_{IMP-7}$. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255-258.

2. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, *et al.* Outbreak ok infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1290-1292.

3. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, *et al.* Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-born metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215:33-39.

4. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, *et al.* PCR detection of metallo-β-lactamase gene ($bla_{IMP}$) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2909-2913.

5. Lévesque C, Piché L, Larose C, *et al.* PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-191.

6. Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995; 141:3015-3027.

7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2000.

8. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 5463-5467.

9. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White T J, 1993: 563-572.

10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.

11. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.

12. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.