

KARINA EUGÊNIA SCHIMITH BIER

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii*
MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS NO HOSPITAL
DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (HC-UFPR)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de
Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Libera Maria Dalla Costa

CURITIBA

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CENTRAL
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Bier, Karina Eugênia Schimith

Caracterização molecular de amostras de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes isoladas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC – UFPR) / Karina Eugênia Schimith Bier. – Curitiba, 2008.

96f. : il. algumas color., tabs.

Inclui bibliografia

Orientadora: Profª Drª Libera Maria Dalla Costa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas e de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Infecções por Bactérias Gram-Negativas. 3. Infecção hospitalar – Curitiba – 2002-2005. 4. Universidade Federal do Paraná. Hospital de Clínicas. I. Dalla Costa, Libera Maria. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. III. Título.

CDD 616.92

Dedico este trabalho e todo meu amor a meu filho, meu marido e meus familiares.

Agradeço a Deus, que me dá vida a cada dia. Ao meu marido Sandro, por me amar e apoiar acima de tudo. A meu filho Gustavo pelo amor e carinho. Aos meus pais, por terem me dado incentivo aos estudos. Aos amigos Mara Cristina Scheffer, Roberto Ribeiro dos Santos e Andréa Lucena, por me auxiliarem na execução deste trabalho. A orientadora Libera Maria Dalla Costa pelo incentivo e dedicação ao trabalho. Aos funcionários da Seção de Bacteriologia, Biologia Molecular e da Central de Meios e Soluções do HC-UFPR, por terem colaborado na realização deste trabalho.

RESUMO

As infecções nosocomiais constituem uma das maiores causas de mortalidade entre os pacientes hospitalizados, configurando um grave problema de saúde pública. Neste contexto, *Acinetobacter baumannii* destaca-se como um dos principais patógenos oportunistas no ambiente hospitalar, ocupando o 2º lugar entre os principais microrganismos causadores de pneumonias hospitalares, além de outras infecções. O uso extensivo de terapia antimicrobiana nos hospitais tem contribuído para a seleção e aumento no número de isolados de *A. baumannii* resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, inclusive aos carbapenêmicos. As opções terapêuticas em isolados de *A. baumannii* multirresistentes limitam-se a colistina e polimixina B. O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar o perfil genotípico de 227 amostras de *A. baumannii* multirresistentes isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), no período de outubro de 2002 a maio de 2005. Foram avaliados os principais testes de detecção fenotípica de metalo- β -lactamase (M β L), dentre estes, teste de duplo-disco difusão, disco combinado e Etest® M β L. A presença dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1} foi confirmada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A suscetibilidade dos isolados frente à tigeciclina e ampicilina-sulbactam foi determinada pelos métodos de disco difusão e diluição em ágar. O teste de disco combinado utilizando imipenem com EDTA mostrou melhor desempenho, e foi positivo em três das 227 amostras. Uma destas apresentou produto de PCR para gene *bla*_{IMP-1}. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para a tigeciclina foram de 16 μ g/ml, sendo todos os isolados de *A. baumannii* resistentes a este antimicrobiano. Os resultados comparativos entre os métodos de disco difusão e ágar diluição para ampicilina-sulbactam apresentaram discrepâncias que não recomendam o teste de disco difusão. Através da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) as 227 amostras analisadas foram classificadas em oito perfis e 31 subtipos diferentes. Os oito perfis foram nomeados como A a H. Dentre estes A, C, F, G e H correspondem aos isolados resistentes aos carbapenêmicos produtores de β -lactamase OXA-23, enquanto que B, D e E aos isolados sensíveis a imipenem e/ou meropenem. A presença de apenas três clones entre 96% das amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos sugere transmissão cruzada como principal mecanismo de disseminação destes isolados, evidenciando a necessidade de melhorar as estratégias de controle de infecção no hospital.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, resistência aos carbapenêmicos, PFGE, metalo- β -lactamases, oxacilinas.

ABSTRACT

Many times nosocomial infections are the main cause of mortality among hospitalized patients, configuring a serious public health problem. In this context, *Acinetobacter baumannii* is one of the main opportunistic pathogen in hospital environment, ranked second among the main nosocomial pathogens related to pneumonia in intensive care units, besides other infections. The extensive use of antimicrobial chemotherapy within hospitals has contributed to the selection and increase in the number of *A. baumannii* strains resistant to a wide range of antibiotics, including the carbapenems. The treatment options in multidrug-resistant *A. baumannii* strains are limited to colistin (polymyxin E) and polymyxin B. The main objective of the present work was to characterize the genotypic profile of 227 multidrug-resistant *A. baumannii* samples isolated from patients at the Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), between October 2002 and May 2005. The main tests for phenotyping detection of metallo- β -lactamase (M β L) were evaluated, among these, double disk synergy test, combined disk and Etest®M β L. The presence of the genes *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} was confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR). The susceptibility to tigecycline and ampicillin/sulbactam was determined by disk diffusion and agar dilution methods. The combined disk with imipenem and EDTA was the best test for screening the presence of M β L among those investigated in the present study, and it was positive in three of the 227 samples. One of these presented PCR product for gene *bla*_{IMP-1}. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values for tigecycline were 16 μ g/ml, all the strains of isolated being *A. baumannii* resistant to this antimicrobial. The comparative results between the disk diffusion and agar dilution methods for ampicillin/sulbactam presented discrepancies that do not advise the disk diffusion method. The Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) classified the 227 samples in eight profiles and 31 different subtypes. The eight profiles were nominated from A to H. Among these A, C, F, G and H correspond to the carbapenem resistant and OXA-23 β -lactamase producing isolated, whereas B, D and E to the imipenem and/or meropenem sensible isolated. The presence of only three clones among 96% of the carbapenem-resistant *A. baumannii* samples suggests that cross-transmission is the main dissemination mechanism of these isolates, thus highlighting the need to improve infection-control strategies in this hospital.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem resistance, PFGE, metallo- β -lactamases, oxacillinases

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1 - | ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE INTEGRON DE CLASSE 1 | 23 |
| FIGURA 2 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DISTÂNCIAS, SUBSTRATOS E AGENTES QUELANTES TESTADOS PARA A DETECÇÃO FENOTÍPICA DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE M β L..... | 49 |
| FIGURA 3 - | COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm COM A CIM EM μ g/ml DA AMPICILINA-SULBACTAM FRENTE AOS ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> | 56 |
| FIGURA 4 - | EXEMPLO DE TESTES DE TRIAGEM POSITIVOS PARA DETECÇÃO DE M β L EM AMOSTRA DE <i>A. baumannii</i> ISOLADA NO HC-UFPR..... | 57 |
| FIGURA 5 - | EXEMPLO DE TESTE DE DISCO COMBINADO POSITIVO COM IPM/ IPM+EDTA EM AMOSTRA DE <i>A. baumannii</i> ISOLADA NO HC-UFPR ... | 59 |
| FIGURA 6 - | COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO COM O AUMENTO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm PRODUZIDOS PELO DISCO DE IMIPENEM + EDTA EM ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> | 59 |
| FIGURA 7 - | PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>bla</i> _{IMP-1} OBTIDO DO ISOLADO DE <i>A. baumannii</i> M β L POSITIVO | 60 |
| FIGURA 8 - | PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PFGE ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> ISOLADAS NO HC-UFPR..... | 61 |
| FIGURA 9 - | DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA A, C e F ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE <i>A.baumannii</i> | 62 |
| FIGURA 10 - | COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE PFGE UTILIZANDO <i>Ap</i> ₁ DOS ISOLADOS DESTE ESTUDO (4,5,6,7) COM O DESCRITO POR Dalla Costa <i>et al.</i> (2003)..... | 63 |
| FIGURA 11 - | DENDROGRAMA CONFECCIONADO COM BASE NO POLMORFISMO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM PFGE UTILIZANDO A ENZIMA <i>Ap</i> ₁ DE 227 ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 1 - | ANTIBIOTIPOS ENCONTRADOS E DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DO HC-UFPR..... | 43 |
| TABELA 2 - | CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO PARA AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> e CEPAS CONTROLE..... | 45 |
| TABELA 3 - | CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DO TESTE DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> e CEPAS CONTROLE FRENTE À TIGECICLINA | 46 |
| TABELA 4 - | PERFIL DE SUSCETIBILIDADE Á TIGECICLINA PELOS MÉTODOS DE DISCO DIFUSÃO E DILUIÇÃO EM ÁGAR DAS 227 AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> MR ISOLADAS NO HC-UFPR SEGUNDO CRITÉRIOS DE USFDA E JONES, 2007..... | 54 |
| TABELA 5 - | RESULTADOS DOS DIVERSOS MÉTODOS DE DETECÇÃO FENOTÍPICA DE PRESENÇA DE M β L EM 40 AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> ISOLADAS NO HC –UFPR POSITIVAS NO TDDD E 30 NEGATIVAS POR PCR | 58 |
| TABELA 6 - | DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> ESTUDADOS NOS DIFERENTES PERFIS ELETROFERÉTICOS E SUBTIPOS ENCONTRADOS EM PFGE POR Apal..... | 62 |
| TABELA 7 - | ANÁLISE DO DENDROGRAMA OBTIDO SOB COEFICIENTE DE DICE DE 70%DOS 227 ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> MR ESTUDADOS..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii – *Acinetobacter baumannii*

ASM – *American Society for Microbiology* – Sociedade Americana de Microbiologia

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion* – Caldo de infusão de cérebro e coração

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DC – Disco combinado

DD – Disco difusão

dNTP – Desoxinucleosídeos trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ESBL – β -lactamase de espectro estendido

HC-UFPR – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

IPM – Imipenem

IMP – Imipenemase

Kb – Kilobases

LBA – Lavado bronco-alveolar

M β L – Metalo- β -lactamase

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MR – Multirresistente

MER – Meropenem

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MPA – Ácido 2-mercaptopropiônico

MYSTIC – *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*

NNISS – *National Nosocomial Infection Surveillance System* – Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

pb – Pares de base

PBP – Proteína ligadora de penicilina

| | |
|----------------|--|
| PCR | – <i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase |
| PFGE | – <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de campo pulsado |
| rpm | – Rotações por minuto |
| SE | – Salina EDTA |
| SPM | – São Paulo metalo-β-lactamase |
| Taq polimerase | – <i>Thermus aquaticus</i> polimerase |
| TBE | – Tris-Borato-EDTA |
| TE | – Tris EDTA |
| TSA | – Ágar tríptico de soja |
| TSB | – Caldo Trypticase-Soja |
| TSDD | – Teste de sinergismo de duplo-disco |
| UFC | – Unidade Formadora de Colônia |
| UI | – Unidade Internacional |
| U.S. FDA | – U.S. <i>Food and Drug Administration</i> |
| UV | – Ultravioleta |
| UTI | – Unidade de Terapia Intensiva |
| VAP | – Pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica |
| VIM | – Verona imipenemase |
| μ | – Micro |
| μg | – Micrograma |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL..... | 14 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 O MICRORGANISMO..... | 15 |
| 2.2 EPIDEMIOLOGIA..... | 17 |
| 2.3 PATOGENICIDADE..... | 20 |
| 2.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS..... | 22 |
| 2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA..... | 25 |
| 2.5.1 Beta-lactamase Classe A..... | 26 |
| 2.5.2 Beta-lactamase Classe B..... | 26 |
| 2.5.3 Beta-lactamase Classe C | 29 |
| 2.5.4 Beta-lactamase Classe D | 30 |
| 2.5.5 Outros mecanismos | 33 |
| 2.6 TRATAMENTO | 34 |
| 2.7 TIPAGEM MOLECULAR | 38 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS..... | 41 |
| 3.1.1 Caracterização preliminar das amostras de <i>A. baumannii</i> | 42 |
| 3.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – TIGECICLINA E AMPICILINA-SULBACTAM | 44 |
| 3.2.1 Disco difusão | 44 |
| 3.2.1.1 Agentes antimicrobianos..... | 44 |
| 3.2.1.2 Inóculo | 44 |
| 3.2.1.3 Inoculação no ágar | 44 |
| 3.2.1.4 Leitura dos halos | 44 |
| 3.2.2 Diluição em ágar..... | 45 |
| 3.2.2.1 Agente antimicrobiano..... | 45 |
| 3.2.2.2 Diluição do antimicrobiano em Placas de Ágar Mueller-Hinton..... | 46 |
| 3.2.2.3 Preparo do Inoculo Bacteriano | 47 |
| 3.2.2.4 Diluição em Ágar..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2.5 Determinação dos Pontos de Corte nos Testes de Diluição em Ágar | 47 |
| 3.3 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE..... | 48 |
| 3.3.1 Teste de Duplo-disco Difusão (TDDD) | 49 |
| 3.3.2 Teste do Disco Combinado (DC) | 50 |
| 3.3.3 Etest® M β L | 50 |
| 3.4 DETECÇÃO GENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE..... | 50 |
| 3.5 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)..... | 52 |
| 3.5.1 Preparo dos blocos com DNA | 52 |
| 3.5.2 Clivagem do DNA com Enzima de Restrição | 53 |
| 3.5.3. Eletroforese | 53 |
| 4 RESULTADOS | 55 |
| 4.1 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS | 55 |
| 4.2 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE | 57 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO GENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE | 60 |
| 4.4 RESULTADOS DA ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO.... | 61 |
| 5 DISCUSSÃO | 66 |
| 5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 66 |
| 5.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – TIGECICLINA E AMPICILINA-SULBACTAM | 67 |
| 5.3 DETECÇÃO DE METALO- β -LACTAMASE | 69 |
| 5.4 CARACTERIAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> MR.. | 73 |
| 6 CONCLUSÃO | 77 |
| REFERÊNCIAS | 78 |
| ANEXOS | 87 |