

HANOCH SAMBA MARTINS INÁCIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
E DIVERSIDADE CLONAL DE AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii* e
Pseudomonas aeruginosa RECUPERADAS DE HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS
DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.**

UFMG

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PRORAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

HANOCH SAMBA INÁCIO MARTINS

Avaliação fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de hemoculturas em Hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais

BELO HORIZONTE

2012

HANOCH SAMBA MARTINS INÁCIO

Avaliação fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de hemoculturas em Hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Simone Gonçalves dos Santos

Co-orientadores: Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Luiz de Macêdo Farias

Belo Horizonte

2012

COLABORAÇÃO

Professor José Carlos Serufo

Professor Adjunto do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG

Professora Maria Rosa Quaresma Bonfim

Professora do Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA)

APOIO FINANCEIRO

FAPEMIG

CAPES

CNPq

Aos meus pais, Rubem Pedro Inácio e Rosa Ana Nguangua,
aos meus irmãos, Vilma Rubson, Nelson, Amós,
a todos os meus familiares e amigos pela grande torcida,
e que de alguma forma colaboraram
para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus, que me dá vida a cada dia.

Aos meus pais pelo o apoio incondicional. Que eles saibam o quão importante foi ter compreensão e aprovação para as decisões que tomei na vida, pelo apoio, incentivo, dedicação, presença constante na minha educação e formação, me ensinando valores de humildade, respeito e valorização.

Aos meus irmãos (Vilma, Rubson, Amós e Nelson), pelo carinho, companheirismo, compreensão e paciência nesses dois anos de ausência, mesmo distante sei que vocês sempre torceram por mim.

Um agradecimento especial à Professora Maria Aparecida de Resende Stoianoff, Professora Titular do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB/UFMG (período 2007 a 2009) e sub-coordenadora no período de 2010 a 2011, Pela carta de aceitação, o que permitiu a minha inscrição no PEC-PG (Programa estudante Convenio de Pós-graduação) Angola - Brasil e a minha vinda para a UFMG.

Aos meus orientadores, Prof.^a Simone Gonçalves dos Santos, Prof.^a Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e Prof. Luiz de Macêdo Farias, pela disponibilidade para conversar, aconselhar e discutir o trabalho em qualquer momento. Agradeço muito pelas palavras de estímulo.

À professora Maria Rosa Bomfim pela colaboração na parte de biologia molecular, pelas “dicas”, pelos ensinamentos e preocupação.

À Professora Patrícia Silva Cisalpino pela disponibilidade de colaborar conosco na parte de biologia molecular.

A todos os professores do mestrado, com seus valiosos ensinamentos, pela paciência, profissionalismo e preocupação com seus alunos.

À minha querida turma, de 2010, quero expressar minha felicidade por ter tido a oportunidade de conhecer-los, cada qual com características tão específicas, que me fazem entender que é

exatamente essa diversidade que nos faz aprender e crescer. Admiro e agradeço a cada um de vocês.

À Renata, a quem admiro pela espontaneidade, autenticidade, bom humor e carinho com os amigos, graciosidade, sua sensibilidade em ouvir atentamente e prudência ao expressar conselhos e opiniões, pelo apoio, e animação que a levam a organizar todas as festas, pela disponibilidade para dividir conhecimento e material.

Às minhas queridas filhas, Thais e Dores; sem vocês eu não conseguiria cumprir como os objetivos, obrigada pela vossa disponibilidade e amizade.

Um agradecimento todo especial, dedico às minhas MDs, GDP, CFB, TT, (Eury, Liz, Bebella, Mirella e Mamy), que estiveram presentes nos doces e amargos momentos, também grata por terem me dado o privilégio de me tornar vossa amiga, pois admiro vossa discrição, bom senso, que as tornam pessoas tão confiáveis e tão especiais.

A Squad toda de Angola em Belo horizonte, pela amizade.

Ao meu namorado chato (Domingos Landama), pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos amigos do Biorelax, sei que mesmo distantes vocês torceram muito... e muito por mim.

Às irmãs que Deus me enviou (Dras. Adélia, Leny, Antonieta e Euridse), muito obrigado por tudo!

Aos amigos do MOA, pela Amizade e colaboração, pelos momentos de descontração paciência em especial o Sergio e Luzia, sempre presente e disponível quando precisamos... Muito obrigado Sergio pelos ensinamentos e apoio técnico.

Agradeço a todos que confiaram no meu senso de “pesquisadora” e que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro, concedendo a bolsa de estudo.

RESUMO

Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* produtoras de enzimas capazes de hidrolisar antimicrobianos β -lactâmicos têm sido reportadas como importante causa de infecções hospitalares assim como um grande problema terapêutico mundial. Buscou-se avaliar a resistência a antimicrobianos e a produção de enzimas Metallo- β -Lactamases (MBL), Oxacilinas e Cefalosporinas, bem como a diversidade genética das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* recuperadas de hemoculturas em cinco diferentes Hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram avaliadas 40 amostras de *P. aeruginosa* e 64 amostras de *A. baumannii* isoladas de hemoculturas, no período de dezembro de 2008 a junho de 2009. As amostras foram submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos pelos métodos de disco-difusão (DD) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A produção de β -lactamases foi avaliada pelos métodos fenotípicos de disco-aproximação (DA), Etest® MBL e teste de Hodge modificado (TMH). A reação de cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para detecção dos seguintes genes: *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} e *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{AmpC}. A diversidade genética para definir similaridade entre amostras foi avaliada por RAPD e ERIC. Amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* mostraram taxas significativas de resistência a todos os antimicrobianos testados. As amostras de *P. aeruginosa* apresentaram níveis de resistência elevados aos antimicrobianos imipenem (45%), meropenem (45%), ceftazidima (47,5%), cefepime (45%), ciprofloxacina (55%), gentamicina (60%), enquanto que em amostras de *A. baumannii* mostraram altas taxas de resistência ao imipenem (93,8%), meropenem (89,0%), cefepime (96,9%), ceftazidima (98,4%) piperacilina+tazobactam (96,9%), ciprofloxacina (90,6%), aztreonam (87,5%). Doze (30%) amostras de *P. aeruginosa* e (37,5%) de *A. baumannii* apresentaram sinergismo com, pelo menos, uma das combinações de substrato-inibidor e foram consideradas produtoras de MBL pelo método de DA. Doze (30%) amostras de *P. aeruginosa* e (63,75%) de *A. baumannii* foram positivas para a produção de MBL pelo método do Etest. Apenas quatro amostras de *P. aeruginosa* (10%) foram positivas pelo teste de THM e, todas as amostras de *A. baumannii* foram negativas. Trinta e nove amostras de *A. baumannii* (60,9%) foram positivas para a pesquisa fenotípica de enzimas da classe D, pelo DA, enquanto que todas as amostras de *P. aeruginosa* foram negativas. Na pesquisa de cefalosporinase (AmpC), 79,6% amostras de *A. baumannii* e 37,5% de *P. aeruginosa* foram positivas de acordo com o DA. Trinta e cinco (87,5%) amostras de *P. aeruginosa* apresentaram produto de PCR compatível com fragmento dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-1}, 87,5% ao *bla*_{SPM-1}, e 15% ao *bla*_{VIM-1}. A ocorrência simultânea dos genes, *bla*_{SPM-1}/*bla*_{VIM-1}, foi observada em 6 (15%) amostras de *P.*

aeruginosa, não tendo sido identificados os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58}, *bla*_{AmpC} em nenhuma destas amostras. Todas as amostras de *A. baumannii* (64/64) foram positivas a, pelo menos, um dos genes avaliados: 92,1% apresentaram o gene *bla*_{VIM-1}; 79,6% o gene *bla*_{AmpC}; 93,75% o gene *bla*_{OXA23} e 84,3% o gene *bla*_{OXA51}. Os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58} não foram detectados. Pela análise por RAPD, foi possível agrupar 22 (53,6%) amostras de *P. aeruginosa* no perfil A; 31,7% no perfil B e 9,7% no perfil C. A análise por ERIC-PCR mostrou que a maioria das amostras de *P. aeruginosa* diferia entre si. Quanto ao *A. baumannii*, foi observado um predomínio de clones circulantes que diferem entre si. É importante notar que algumas amostras, de diferentes hospitais, apresentaram o mesmo perfil de bandas. Os resultados do presente estudo permitem sugerir que certas populações clonais estejam circulando entre os Hospitais em estudo, disseminadas por diferentes vias, como os profissionais da área de saúde e pacientes transferidos entre os hospitais.

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, multirresistência, diversidade genética, multirresistência, marcadores de resistência.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter baumannii* strains producing antimicrobial enzymes capable of hydrolyzing β -lactams has been reported as an important cause of nosocomial infections as well as a major therapeutic problem worldwide. We sought to evaluate the antimicrobial resistance and the production of Metallo- β -Lactamases (MBL), Oxacilinases and cephalosporinases enzymes as well as to evaluate the genetic diversity of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains recovered from hemoculture in five different hospitals on Belo Horizonte, Minas Gerais. 40 *P. aeruginosa* and 64 *Acinetobacter* spp. strains isolated from December 2008 to June 2009. Disk diffusion (DD) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods were used to study the antimicrobial susceptibility profile. The production of β -lactamases was assessed by the phenotypic disc approximation methods (AD), MBL Etest[®] and modified Hodge test (MHT). The polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect the following genes: *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} e *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{AmpC}. The genetic diversity to define similarity between the samples was assessed by RAPD and ERIC. It was observed in *P. aeruginosa* and *A. baumannii* strains significant resistance rates to all antimicrobials tested. The *P. aeruginosa* strains showed high levels of antimicrobials resistance to imipenem (45%), meropenem (45%), ceftazidime (47.5%), cefepime (45%), ciprofloxacin (55%), and gentamicin (60%), while in *A. baumannii* strains showed high rates of resistance imipenem (93.8%), meropenem (89%), cefepime (96.9%), ceftazidime (98.4%) piperacillin+tazobactam (96.9%), ciprofloxacin (90.6%) and aztreonam (87.5%). Twelve (30%) *P. aeruginosa* and 24 (37.5%) of *A. baumannii* strains showed synergy with at least one substrate and inhibitor combinations and were considered MBL producing, by the DA method. Twelve (30%) samples of *P. aeruginosa* and 60 (63.75%) of *A. baumannii* were positive for MBL production by the Etest method. Only four *P. aeruginosa* (10%) strains were positive by MHT and all *A. baumannii* strains were negative. Thirty-nine of *A. baumannii* (60.9%) strains were positive for the phenotypic class D enzymes by DA, while all *P. aeruginosa* strains were negative. Cephalosporinase (AmpC), was detected in 51 (79.6%) *A. baumannii* and 15 (37.5%) de *P. aeruginosa* according to DA method. Thirty-five (87.5%) *P. aeruginosa* strains showed the PCR compatible products to gene fragment *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-1}, 35 (87.5%) to *bla*_{SPM-1}, and 6 (15%) to *bla*_{VIM-1}. The simultaneous occurrence of *bla*_{SPM-1}/*bla*_{VIM-1} genes was observed in 6 (15%) *P. aeruginosa* strains, the *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58} and *bla*_{AmpC} genes were not identified in any of these strains. All *A. baumannii* (64/64) strains were positive at least of one the studied genes: 59 (92.1%) had the *bla*_{VIM-1} gene; 51 (79.6%) *bla*_{AmpC} gene; 60 (93.75%) the *bla*_{OXA23} gene and 54 (84.3%) the

*bla*_{OXA51} gene. The *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA24} and *bla*_{OXA58} genes were not identified. For RAPD analysis, it was possible to group 22 (53.6%) *P. aeruginosa* samples in the profile A; 13 (31.7%) in the profile B and 4 (9.7%) in the profile C. The ERIC-PCR analysis showed that almost all *P. aeruginosa* strains differed from each other. Considering *A. baumannii*, it was observed a circulating prevalence of certain clones that differ between each other. It is important to note that some samples from different hospitals showed the same band profile. The results of this study may suggest that certain clonal populations are circulating among the hospitals studied, disseminated by different routes, such as health professionals and transferred patients between hospitals.

Password: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, multiresistance, antibiotic resistance markers, genetic diversity.

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | Padrões interpretativos para testes de susceptibilidade a antimicrobianos realizados pelo método de Disco-Difusão para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. | 34 |
| Quadro 2 | Padrões interpretativos para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. | 36 |
| Quadro 3 | Iniciadores e tamanho dos produtos esperados utilizados para a detecção genotípica de β -lactamases. | 43 |
| Quadro 4 | Iniciadores utilizados para a análise por RAPD e ERIC-PCR | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - Confirmação da identificação das amostras oriundas de hemoculturas, dos cinco hospitais de Belo Horizonte pelo sistema automatizado VITEK® 2..... | 48 |
| TABELA 2 - Distribuição setorial das 104 amostras de <i>P.aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. isoladas de hemoculturas de cinco hospitais de Belo Horizonte..... | 49 |
| TABELA 3 - Perfil de resistência das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> isoladas de hemoculturas por Hospitais participantes..... | 53 |
| TABELA 4 - Perfil de resistência das amostras de <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i> isoladas de hemoculturas por Hospitais sectores..... | 54 |
| TABELA 5 - CIM ₅₀ , e CIM ₉₀ de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes isoladas de hemoculturas em cinco hospitais de Belo Horizonte..... | 55 |
| TABELA 6 – Frequência das combinações substrato-inibidor pelo método de disco-aproximação para detecção fenotípica de metalo- β -lactamases nas amostras de <i>P. aeruginosa</i> (n=40)..... | 60 |
| TABELA 7 - Frequência das combinações substrato-inibidor utilizadas pelo método de disco-aproximação para detecção fenotípica de metalo- β -lactamases nas amostras de <i>A. baumannii</i> (n=64)..... | 60 |
| TABELA 8 - Frequência (%) de amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivas na pesquisa de enzimas Cefalosporinase e Oxacilinases por hospitais participantes | 64 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 9 - Frequência da combinação de genes carregados por amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> avaliadas..... | 68 |
| TABELA 10 - Relação fenotípica e genotípica dos métodos aplicados para a pesquisa de enzimas β -lactamases nas amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> | 72 |
| TABELA 11 - Resultado da análise molecular por RAPD dos 40 de amostras de <i>P. aeruginosa</i> produtores de MBL e seus respectivos setores | 76 |
| ANEXO A - Dados referentes aos setores de isolamento e susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de <i>P.aeruginosa</i> recuperadas de hemoculturas, de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte..... | 111 |
| ANEXO Aa - Dados referentes aos setores de isolamento e susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de <i>A. baumannii</i> recuperadas de hemoculturas, de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte..... | 115 |
| ANEXO B - Dados referentes aos testes fenotípicos de Metalo- β -Lactamases (MBL) e β -lactamases de espectro ampliado (ESBL)de amostras de <i>P. aeruginosa</i> isolados de hemocultura em Belo Horizonte..... | 122 |
| ANEXO Ba - Dados referentes aos testes fenotípicos de Metalo- β -Lactamases (MBL) e β -lactamases de expectro ampliado (ESBL)de amostras de <i>A. baumannii</i> isolados de hemocultura em Belo Horizonte..... | 122 |
| ANEXO C - Dados referentes aos testes genotípicos de detecção de β -lactamases das amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte..... | 125 |
| ANEXO Ca - Dados referentes aos testes genotípicos de detecção de β -lactamases das amostras de <i>A. baumannii</i> isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte | 126 |
| ANEXO D - Dados referentes à Concentração inibitória mínima (CIM) e Detecção de M β L fenotípica e genotípica dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> isolados de hemocultura de pacientes internados em hospitais de Belo Horizonte no período de dezembro de 2008 a junho de 2009..... | 128 |
| ANEXO Da - Dados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e detecção de MBL fenotípica e genotípica de amostras de <i>A. baumannii</i> isolados de hemocultura de pacientes internados em | |

| | |
|---|-----|
| Hospitais de Belo Horizonte..... | 130 |
| ANEXO E - Fotos da reação em cadeia da polimerase exemplificando algumas amostras produtoras dos genes <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{AmpC} , <i>bla</i> _{OXA23} , <i>bla</i> _{OXA51} | 133 |
| ANEXO F - Tabela com tamanho dos fragmentos obtidos por RAPD utilizados para a construção do dendograma para amostras de <i>P. aeruginosa</i> (GRAF. 10)..... | 137 |
| ANEXO G - Tabela com tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de <i>P.aeruginosa</i> (GRAF. 11)..... | 138 |
| ANEXO Ga - Tabela com tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de <i>A. baumannii</i> GRAF. 10)..... | 140 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - Distribuição global da β-lactamases KPC..... | 19 |
| FIGURA 2 - Distribuição global dos principais grupos de oxa carbapenemases..... | 21 |
| FIGURA 3 - Disseminação global dos diferentes tipos de Metalo – β – lactamases. | 25 |
| FIGURA 4 - Representação esquemática das distancias entre os discos de antimicrobianos para a pesquisa fenotípica de ESBL..... | 37 |
| FIGURA 5 - Representação esquemática das distâncias entre os discos de substratos e inibidores utilizados no método de disco aproximação para detecção fenotípica de MBL..... | 39 |
| FIGURA 6 - Esquema de realização do teste de Hodge Modificado..... | 41 |
| FIGURA 7 - Teste positivo pelo método de disco-aproximação. Observa-se distorção e ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria testada..... | 63 |
| FIGURA 8 - Etest MBL positivo: relação da CIM de IP/IPI ≥ 8 (<i>P. aeruginosa</i>)..... | 63 |
| FIGURA 9 - Etest MBL positivo: relação da CIM de IP/IPI ≥ 8 (<i>A. baumannii</i>)..... | 64 |
| FIGURA 10 - Etest MBL Negativo: não demonstrou relação da CIM de IP/IPI ≥ 8 | 66 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 11- Amostra produtora de β -lactamases classe C pelo método de aproximação de disco..... | 66 |
| FIGURA 12 - Amostra produtora de β -lactamases classe D pelo método de aproximação de disco.... | 66 |
| FIGURA 13 - Detecção do genes <i>bla</i> _{SPM-1} (271 pb) na amostra 1,4, 5, 6, 7, 8 em isolados de <i>P. aeruginosa</i> | 133 |
| FIGURA 14 - Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (271 pb) na amostra 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 11, 23 em isolados de <i>P. aeruginosa</i> | 133 |
| FIGURA 15 - Detecção do genes <i>bla</i> _{VIM-1} (390 pb) na amostra 8, 10,16, 25, 29, 34 em amostras de <i>P. aeruginosa</i> | 133 |
| FIGURA 16 - Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-1} (390 pb) na amostra 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 em isolados <i>A. baumannii</i> | 134 |
| FIGURA 17 - Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-1} (390 pb) na amostra 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,20, 21, 21, 22, 23, 24 26 em isolados de <i>A. baumannii</i> | 134 |
| FIGURA 18 - Detecção do gene <i>bla</i> _{AmpC} (631 pb) na amostra 1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 31 de isolados de <i>A. baumannii</i> | 134 |
| FIGURA 19 - Detecção do genes <i>bla</i> _{OXA23} , <i>bla</i> _{OXA51} (501 pb e 353 pb) na amostra 1, 2, 3, 4, 8, 6, 7, 12, de isolados de <i>A. baumannii</i> | 135 |
| FIGURA 20 - Detecção do genes <i>bla</i> _{OXA23} , <i>bla</i> _{OXA51} (501 pb e 353 pb) na amostra 9, 10, 11, 16, 17, 20, 22, 23, 24 de isolados de <i>A. baumannii</i> | 135 |
| FIGURA 21 - Detecção do gene <i>bla</i> _{OXA23} (501 pb) na amostra 12, 13, 14, 15, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 32 em isolados de <i>A. baumannii</i> | 135 |
| FIGURA 22 – Gel de RAPD de amostras de <i>P. aeruginosa</i> molecular..... | 137 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| GRÁFICO 1 - Distribuição geral das amostras de <i>P. aeruginosa</i> e de <i>A.baumannii</i> isoladas de hemoculturas..... | 49 |
| GRÁFICO 2 - Perfil de resistência das 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de hemocultura de pacientes dos cinco hospitais em estudo..... | 51 |
| GRÁFICO 3 - Perfil de resistência das 64 amostras de <i>A. baumannii</i> isoladas de hemocultura de pacientes dos cinco hospitais em estudo..... | 52 |
| Gráfico 4 - Distribuição das positivas para MBL pelo método disco-aproximação por hospitais participantes nas amostras de <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i> | 61 |
| GRÁFICO 5 - Distribuição das amostras de <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i> positivas para MBL pelo método do E-test de acordo com os hospitais participantes..... | 63 |
| GRÁFICO 6 - Porcentagem de amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=64) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=40) carreadoras de genes que codificam β -lactamases (MBL, cefalosporinase e oxacilinases)..... | 67 |
| GRÁFICO 7 – Porcentagens de amostras de <i>A. baumannii</i> carreadores de genes que codificam MBL, oxacilinases cefalosporinase..... | 68 |
| GRÁFICO 8 – Perfil de resistência das amostras de <i>P. aeruginosa</i> portadores de genes MBL..... | 73 |
| GRÁFICO 9 – Perfil de resistência das amostras de <i>A.baumannii</i> portadores de genes de β -lactamases..... | 73 |
| GRÁFICO 10 - Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE mostrando as relações entre as amostras de <i>P. aeruginosa</i> | 75 |
| GRAFICO 11 - Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE implementado pelo programa NTSYS mostrando as relações entre as amostras de <i>P.</i> | |

aeruginosa..... 79

GRAFICO 12 - Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE implementado pelo programa NTSYS mostrando as relações entre os isolados de *Acinetobacter baumannii*..... 80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| AMI | Amicacina |
| ADC | Acinetobacter - Derived Cephalosporinases |
| AHSLs | Acil Homoserina Lactonas |
| ARI-1 | <i>Acinetobacter</i> Resistente ao Imipenem |
| ATCC | American type Culture Collection |
| ATM | Aztreonam |
| BHI | Broth Heart Infusion |
| CIM | Concentração inibitória Mínima |
| CTI | Centro de terapia intensiva |
| CTI-PED | Centro de terapia intensiva pediátrica |
| CAZ | Ceftazidima |
| CRO | Ceftriaxona |
| CTX | Cefoxitina. |
| COM | Cefepime |
| CIM ₉₀ | Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 90%, |
| CIM ₅₀ | Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras, |
| CCIHs | Comissões de Controle de Infecção Hospitalar |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| DA | Disco Aproximação |
| DD | Disco difusão |
| DNA | Desoxyribonucleic Acid |
| DIM | Duth imipenemase |
| DO | Densidade Optica |
| ESBL | Beta lactamases de Espectro estendido |
| ERIC | Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus |
| EDTA | Etilenodiaminotetracetic Acid |
| ENF | Enfermarias |
| GEN | Gentamicina |
| GIM-1 | German imipenemase |

| | |
|--------|---|
| HC | Hospital das clínicas |
| IH | Infecções hospitalares |
| JXXIII | Hospital de Pronto Socorro João XXII |
| IMP-1 | Imipenemase |
| KHM | <i>Kiron</i> hospital metalo – β -lactamase |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase |
| MAA | 2- Mecarptoacetic Acid |
| MBL | Metalo- β - Lactamase |
| MER | Meropenem |
| MH | Mueller – Hinton |
| MPA | 2- Mecaptopropionic Acid |
| NDM | Nova deli metalo- β -lactamase |
| OMPs | Proteínas de membrana externa |
| ONCO | Oncologia |
| OB | Hospital Odilon Behrens |
| PBPs | Proteínas ligadoras de penicilinas |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| POL | Polimixina B |
| PPT | Piperacilina /tazobactam |
| PM | Peso Molecular |
| SIM-1 | Seoul imipenemase |
| SPM-1 | São Paulo Metalo- β - lactamase |
| SP | Hospital Semper |
| SC | Santa Casa |
| THM | Teste de Hodge Modificado |
| TAE | Tris, ácido acético, EDTA |
| TSA | Triptona de Soja |
| VIM | Verona imipenemase |
| RAPD | Random Amplification of Polymorphic DNA |
| RPM | Rotações por minutos |
| UTQ | Unidade de terapia de queimados |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Infecção Hospitalar..... | 3 |
| 2.2 Bastonetes Gram negativos não fermentadores..... | 4 |
| 2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| 2.2.1.1. Aspectos taxonômicos e características gerais..... | 5 |
| 2.2.1.2. Fatores de virulência | 7 |
| 2.2.2. O gênero <i>Acinetobacter</i> | 9 |
| 2.2.2.1. Aspectos taxonômicos e características gerais..... | 9 |
| 2.2.2.2. Fatores de virulência..... | 11 |
| 2.2.2.3. Aspectos gerais das infecções de <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i> nas infecções hospitalares..... | 13 |
| 2.4. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp..... | 16 |
| 2.4.1. Alteração de proteínas de membrana externa | 16 |
| 2.4.2. Bombas de efluxo..... | 17 |
| 2.4.3. Alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)..... | 18 |
| 2.4.4. Produção de β -lactamases..... | 18 |
| 2.4.4.1. Classe A..... | 19 |
| 2.4.4.2. Classe D..... | 20 |
| 2.4.4.3. Classe C..... | 22 |
| 2.4.4.4. Classe B..... | 23 |
| 2.5. Detecção laboratorial de β -Lactamases e tipagem de patógenos nosocomiais..... | 27 |
| 2.6. Controle de infecções hospitalares no Brasil..... | 30 |
| 3. OBJETIVOS | 32 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1. Amostras bacterianas..... | 33 |
| 4.2. Instituições Participantes | 33 |
| 4.3. Aspectos éticos da pesquisa..... | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos..... | 34 |
| 4.4.1. Método de disco-difusão..... | 34 |
| 4.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)..... | 35 |
| 4.5. Detecções fenotípicas de enzimas relacionadas à resistência a drogas antimicrobianas..... | 37 |
| 4.5.1. Pesquisa de β -lactamases da classe D (oxacilinases)..... | 37 |
| 4.5.2. Pesquisa de β -lactamases da classe C (cefalosporinases)..... | 38 |
| 4.5.3. Pesquisa de β -lactamases da classe B (metalo- β -lactamases)..... | 39 |
| 4.5.3.1. Disco aproximação (DA)..... | 39 |
| 4.5.3.2. <i>Epsilon</i> meter test (Etest MBL)..... | 40 |
| 4.5.3.3. Teste de Hodge Modificado (THM)..... | 40 |
| 4.6. Detecção genotípica de β -lactamases | 42 |
| 4.6.1. Reação em cadeia de polimerase (PCR) | 42 |
| 4.7. Caracterizações do perfil genético das amostras..... | 45 |
| 4.7.1 Análises por <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)..... | 45 |
| 4.7.2. Análise das sequências intergênicas repetitivas consenso enterobacterianas – ERIC..... | 46 |
| 4.8. Controle de qualidade..... | 47 |
| 4.8.1. Sequenciamento das amostras que serviram de controle para confirmação do gene <i>bla_{SPM-1}</i> | 47 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 49 |
| 5.1. Confirmação da identificação fenotípica das amostras | 49 |
| 5.2 . Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos..... | 52 |
| 5.3. Detecção fenotípica de enzimas relacionadas à resistência em <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 60 |
| 5.3.1. Pesquisa de β -lactamases da classe B (M β L)..... | 61 |
| 5.3.1.1. Método de disco-aproximação (DA)..... | 62 |
| 5.3.1.2. <i>Epsilon</i> meter test (Etest M β L)..... | 63 |
| 5.3.1.3. Teste de Hodge Modificado (THM) | 65 |
| 5.3.2. Pesquisa de β -lactamases da classe D (Oxacilinases/Oxacarbapenemase) e classe C (Cefalosporinase)..... | 66 |
| 5.4. Detecção genotípica de β -lactamases..... | 67 |
| 5.4.1. Reação em cadeia de polimerase (PCR)..... | 67 |
| 5.4.2. <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)..... | 75 |

| | |
|--|----|
| 5.4.3. <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)</i> | 79 |
| 6. CONCLUSÕES | 84 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As infecções hospitalares (IH) representam um problema grave de saúde pública, estando sua ocorrência relacionada a complicações significativas da saúde da população acometida, ocasionando altas taxas de morbidade, mortalidade e letalidade, podendo evoluir para doenças graves de difícil tratamento, além de determinar aumento do tempo e dos custos de internação. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as IH mais frequentes no Brasil são as pneumonias, infecções da corrente sanguínea, da cavidade oral, pele e tecidos moles, sendo as pneumonias e as infecções da corrente sanguínea as mais graves.

Dentre os microrganismos comunitários e nosocomiais relevantes em IH destacam-se os não fermentadoras da glicose, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Estas bactérias apresentam grande versatilidade metabólica e podem ser encontradas em vários ambientes, inclusive nos hospitalares, principalmente no solo e na água ou, ainda, associadas a plantas e animais. Embora dificilmente causem doença no indivíduo hígido, elas representam grandes ameaças para pacientes hospitalizados, particularmente aqueles com doenças de base grave, e estão associadas a taxas elevadas de mortalidade. As opções terapêuticas no tratamento do paciente com essas infecções são, geralmente, escassas, devido à combinação da resistência inerente a muitos fármacos com a capacidade de adquirir resistência a várias outras drogas, apresentadas por estes microrganismos. A produção de β -lactamases, a baixa permeabilidade da membrana externa e a expressão de diferentes bombas de efluxo são mecanismos clássicos de resistência a drogas encontradas nestes grupos microbianos.

Alguns antimicrobianos de amplo espectro, como cefalosporinas de quarta geração (cefepime) e carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), ainda apresentam alto potencial para o tratamento de pacientes com infecções por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. No entanto, a produção de enzimas como as metalo- β -lactamases (MBL), OXA β -lactamases e cefalosporinases com potencial para hidrolisar, inclusive estes antimicrobianos já atingem são alarmantes e alvo de pesquisas.

Atualmente, têm sido descritas nove subclasses de MBL adquiridas, IMP, VIM, SPM, GIM, SIM-1, AIM, NDM, KHM e DIM. As ESBL tipo OXA de *Acinetobacter* spp. são divididas em quatro subgrupos filogenéticos: OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58. Um número crescente de β -lactamases confere resistência a cefalosporinas de espectro ampliado, sendo, geralmente, relacionado com a superprodução do residente do tipo AmpC β -lactamase codificada pelo gene *bla* AmpC.

Em vista da emergência da resistência de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* aos antimicrobianos, inclusive aos de última geração, o que tem limitando as opções terapêuticas levando a complicações e sequelas significativas com altas taxas de morbidade, mortalidade e letalidade, espera-se com este projeto, somar apoio aos programas de controle de infecção hospitalar e ao corpo clínico, contribuindo para o delineamento de novas estratégias de tratamento e do controle de disseminação destas linhagens multirresistentes.