



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8º ENEPE UFGD • 5º EPEX UEMS

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Acinetobacter* spp. ISOLADAS DE PACIENTES ADMITIDOS EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE DOURADOS/MS

Wirlaine Glauce Maciel¹; Nayara Halimy Maran², Nathalie Gaebler Vasconcelos³, Kesia Esther da Silva⁴, Simone Simionatto⁵

¹Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde/UFGD; ²Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental/UFGD; ³Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde/UFGD; ⁴Mestre em Ciências da Saúde/UFGD; ⁵Orientadora, Professora Adjunta da FCBA/UFGD. E-mail: wirmaciel@hotmail.com

RESUMO

Acinetobacter spp. estão relacionados a importantes casos de infecções hospitalares, além de serem responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em ambientes nosocomiais. Com o surgimento de vários surtos de infecção causados por cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp., estes passaram a compor um importante mecanismo de resistência no contexto de infecção hospitalar mundial e a sua pesquisa um fator relevante a fim de restringir sua disseminação. Tendo em vista a importância do levantamento da ocorrência de cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp. para a clínica médica, bem como a falta de dados no estado do Mato Grosso do Sul, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência de cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS. As amostras bacterianas foram coletadas entre o período de setembro de 2013 a julho de 2014, somando um total de 153 cepas de *Acinetobacter* spp., das quais 150 foram identificadas como *Acinetobacter baumannii*, uma como *Acinetobacter baumannii* complex, uma como *Acinetobacter lwoffii*, uma como *Acinetobacter haemolyticus*. A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton. Os antimicrobianos utilizados foram o imipenem e meropenem. A avaliação da presença do gene *bla*_{KPC-2} e *bla*_{IMP-1} foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram identificados os perfis de resistência de 153 cepas de *Acinetobacter*

spp. Destas, 79% foram consideradas resistentes para o imipenem e 73, 20% resistentes ao meropenem. De todas as cepas estudadas, apenas 4 apresentaram um resultado positivo para o gene *bla_{KPC-2}*, no entanto, não foram encontrados resultados positivos para o gene *bla_{IMP-1}*, indicando que mais estudos precisam ser realizados para identificar os fatores genéticos envolvidos na multirresistência antimicrobiana destas cepas.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, resistência bacteriana, carbapenemases.

INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares constituem um problema de saúde pública, sendo reconhecidas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade, estabelecendo prolongados tempos de internação para os pacientes e altos custos para o sistema de saúde (BUSH, 2010; de OLIVEIRA, MARUYAMA, 2008). Bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* spp. estão relacionadas a importantes casos de infecções hospitalares, (PRASHANTH, BRADINATH, 2006; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008), como pneumonias, septicemias, meningites, infecções urinárias, infecções de sítios cirúrgicos, do trato respiratório, dentre outras, acometendo principalmente pacientes que foram submetidos a procedimentos invasivos e imunocomprometidos (GIAMARELLOU, ANTONIADOU, KANELLAKOPOULOU; 2008), especialmente pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) (MONTERRUBIO, GONZÁLEZ et al., 2009).

O gênero *Acinetobacter* spp. compreende 31 espécies diferentes, sendo *Acinetobacter baumannii*, a espécie mais importante clinicamente (PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008). *Acinetobacter* spp é considerado um patógeno oportunista e o tratamento das infecções ocasionadas por esta bactéria tem se tornado um fator preocupante, em função do surgimento de cepas multirresistentes, o que torna as opções terapêuticas restritas (ABDALHAMID, HASSAN et al., 2014), uma vez que diferentes mecanismos estão envolvidos com a resistência a diversas classes de antibióticos. Entre os mecanismos de resistência, destaca-se a reduzida permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alteração nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de beta-lactamases (PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008; GIAMARELLOU, ANTONIADOU, KANELLAKOPOULOU; 2008), das quais, enzimas carbapenemases, oxacilinases (OXA) e metalo-β-lactamases (MBL) são uma grande preocupação devido à sua rápida capacidade de

disseminação, sendo as oxacilinases as enzimas de maior frequência em cepas de *Acinetobacter* spp. (ABDALHAMID, HASSAN et al., 2014).

No estado do Mato Grosso do Sul não existem relatos sobre o monitoramento de cepas de *Acinetobacter* spp. multirresistentes. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar o perfil de resistência de cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local e período do estudo:

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS), localizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de abril a agosto de 2014.

2. Coleta de dados:

Dados como datas da cultura, datas de nascimento, sexo, idade, local de internação, amostra clínica e espécie das cepas isoladas foram coletados de registros laboratoriais da microbiologia clínica do hospital em estudo.

3. Coleta e isolamento das amostras bacterianas:

As cepas de *Acinetobacter* spp. foram isoladas de amostras clínicas de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS que apresentavam quadros clínicos de infecção e/ou colonização por cepas de *Acinetobacter* spp. multirresistentes. Para o estudo foram coletadas cepas de *Acinetobacter* spp. resistentes a uma ou várias cefalosporinas de terceira geração, as quais apresentaram redução no diâmetro dos halos de inibição frente aos antibióticos carbapenêmicos no antibiograma. Cepas apresentando este perfil foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS/UFGD), onde foram realizados os demais testes.

4. Concentração Inibitória Mínima (MIC):

A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, seguindo as padronizações estabelecidas pelo CLSI (2014). Os

antimicrobianos utilizados foram o imipenem e meropenem, ambos pertencentes a classe dos carbapenêmicos. As MICs dos respectivos antimicrobianos foram testadas em diferentes faixas de concentração. As cepas foram inoculadas em microplacas de 96 poços e submetidas às condições de 36°C por 24 horas. Após este período, a MIC foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do micro-organismo.

5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

As cepas de *Acinetobacter* spp. foram semeadas em MacConkey ágar e submetidas à extração de DNA e posterior avaliação genotípica. As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 50 µL, contendo 2 U de DNA Taq polimerase, 50 pmol de cada primer, 200 µM de cada DNTP, 1 × tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂ e 10-50 ng de DNA. Foi investigada a presença dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{IMP-1}. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (MyCycler- Bio-Rad), conforme descrito por Chan e colaboradores (2014), contendo algumas modificações. Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience).

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{IMP-1}.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
<i>bla</i> _{KPC-2} Forward	5'TCTGGACCGCTGGGAGCTGG 3'
<i>bla</i> _{KPC-2} Reverse	5'TGCCCGTTGACGCCCAATCC 3'
<i>bla</i> _{IMP-1} Forward	5'TCTACATGACCGCGTCTGTC 3'
<i>bla</i> _{IMP-1} Reverse	5'GAACAACCAGTTTTGCCTTACC 3'

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo propôs avaliar o perfil de resistência de cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS. No período de setembro de 2013 a julho de 2014 foram isoladas um total de 153 cepas de *Acinetobacter* spp. coletadas de 114 pacientes. Destas cepas, 150 foram identificadas como *Acinetobacter baumannii* (98%), uma como *Acinetobacter baumannii complex* (0,65%), uma como

Acinetobacter lwoffii (0,65%) e uma como *Acinetobacter haemolyticus* (0,65%). Outros estudos também evidenciam a presença destas espécies em ambientes hospitalares, sendo que cepas de *Acinetobacter baumannii* são relatadas com maior frequência, conforme estudos de Peleg et al., 2008, Enoch et al., 2008, bem como estudos relatam o aparecimento de cepas resistentes de *Acinetobacter lwoffii* (KIM, JEON et al., 2014) e *Acinetobacter haemolyticus* (FUNAHASHI, TANABE et al., 2013).

Na análise dos dados coletados dos registros laboratoriais foi possível observar que dos 114 pacientes, 51 (44,23%) eram do sexo feminino, enquanto que 63 (55,27%) eram do sexo masculino. Em relação ao local de internação, observou-se que dos 114 pacientes, 4 (3,50%) estavam na UTI Pediátrica, 10 (8,77%) no posto de atendimento 3, o qual atende pacientes que não possuem quadros clínicos críticos, 24 (21,05%) pacientes se encontravam na UTI B, 25 (21,92%) internados na UTI Neonatal, 26 (22,80%) estavam presentes na Unidade Intermediária e 29 (24,43%) estavam na UTI A, conforme mostra a figura 1. Estes dados corroboram com outros estudos que avaliaram que infecções hospitalares ocasionadas por cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp. acometem principalmente pacientes internados em UTIs (MONTERRUBIO-VILAR et al., 2014; AGODI, VOULGARI et al., 2014; VILLALÓN, VALDEZATE et al., 2011; CARVALHO, CARVALHO-ASSEF et al., 2011) o que se dá pelo quadro clínico de imunossupressão que estes pacientes apresentam.

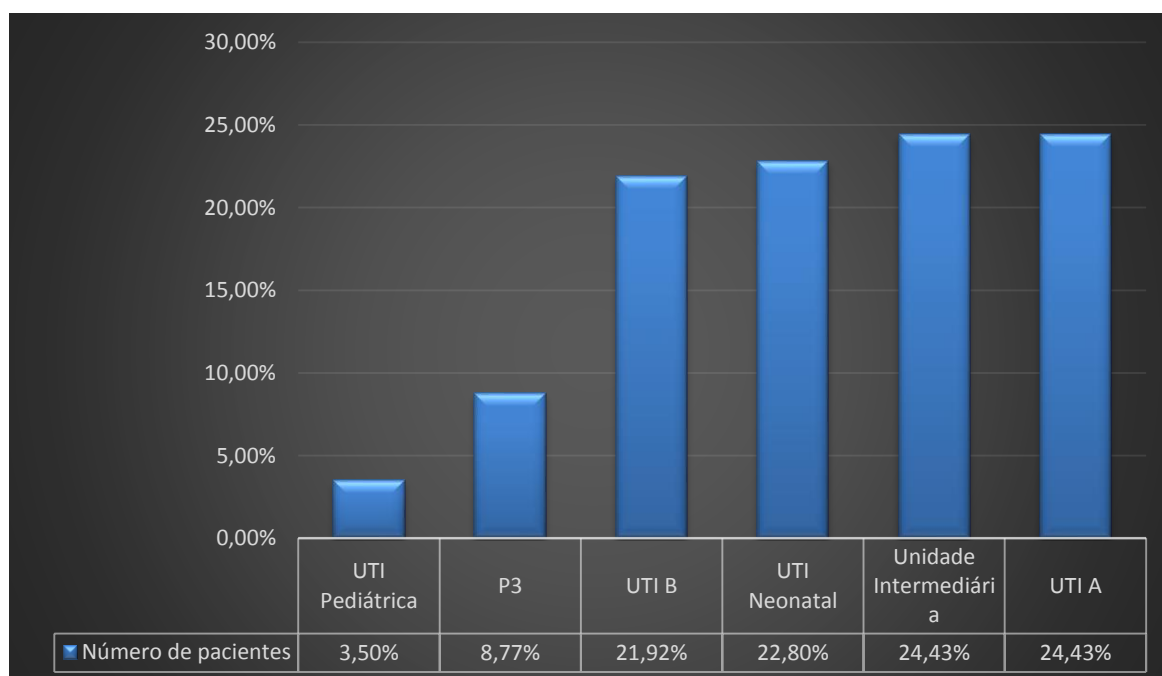


Figura 1. Número de pacientes por alas de internação.

Ao analisar a faixa etária dos 114 pacientes, foi observado que a idade dos pacientes de onde foram isoladas as cepas de *Acinetobacter* spp variou consideravelmente, sendo que o maior índice de casos foi registrado em recém nascidos, somando 51 (44,73%) dos casos, seguido de idosos (Tabela 2). Estes dados diferem dos descritos por Figueiredo, Vianna et al., (2013), que descrevem que os pacientes com mais de 65 anos apresentaram maior frequência de infecções por *Acinetobacter* spp.

Tabela 2. Faixa etária dos pacientes que apresentaram amostras de *Acinetobacter* spp.

Faixa etária (anos)	Número de pacientes (%)
Recém nascidos	51 (44,73%)
Até 1 ano	4 (3,50%)
10 a 20 anos	1 (0,87%)
21 a 30 anos	3 (2,63%)
31 a 40 anos	4 (3,50%)
41 a 50 anos	9 (7,89%)
51 a 60 anos	6 (5,26%)
61 a 70 anos	10 (8,77%)
71 a 80 anos	17(14,91%)
81 a 90 anos	7 (6,14%)
91 a 100 anos	2 (1,75%)
Total	114

Quando analisadas as amostras clínicas de onde foram isoladas as cepas de *Acinetobacter* spp., foi possível verificar que das 153 amostras coletadas, 1 (0,65%) foi isolada de líquido ascítico, 1 (0,65%) de escara, 6 (3,92%) de urocultura, 9 (5,88%) provindas de hemocultura, 13 (8,49%) de ponta de cateter, 26 (16,99%) de swab nasal, 38 (24,83%) de secreção traqueal e 59 (38,56%) de swab retal. É possível verificar que a amostra clínica com o maior número de cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas foram as amostras de swab retal, seguida das amostras de secreção traqueal e swab nasal, conforme observado na figura 2. Estes resultados diferem dos apresentados por (Garcia, César et al., (2013), onde relatam maior número de amostras de *Acinetobacter* spp isoladas de urocultura.

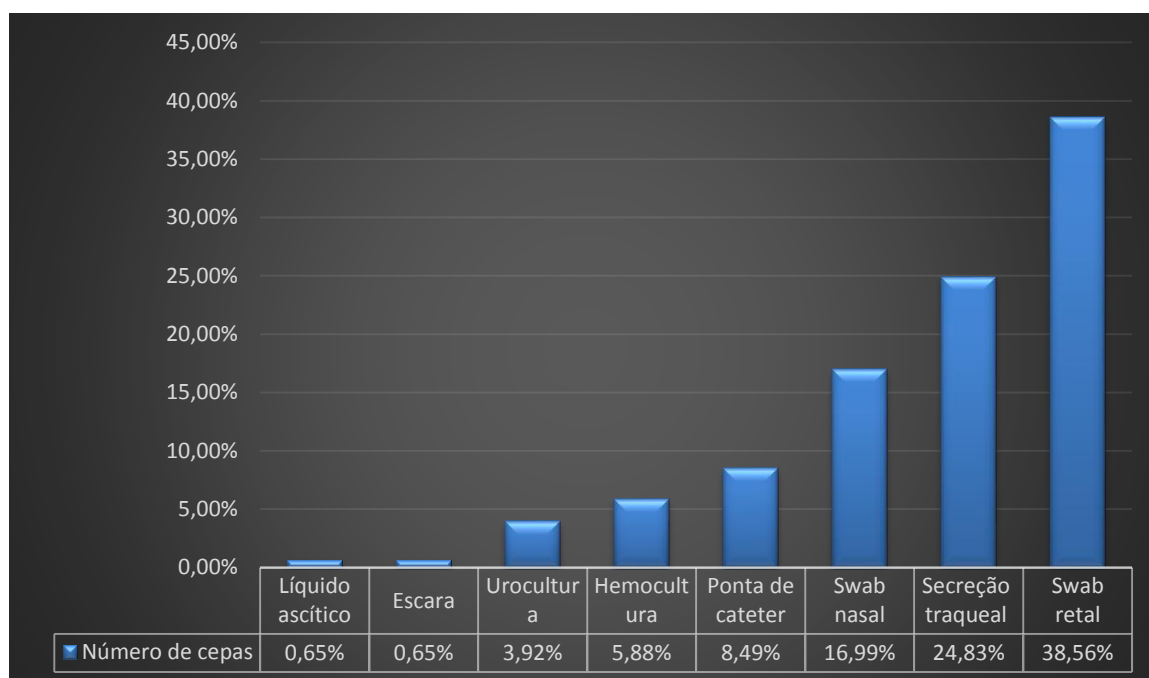


Figura 2. Amostras clínicas onde foram isoladas cepas de *Acinetobacter* spp.

Na determinação do perfil de susceptibilidade frente aos antibióticos carbapenêmicos foram consideradas resistentes as cepas de *Acinetobacter* spp. que apresentaram uma MIC ≥ 8 para imipenem e meropenem. A determinação da MIC, frente aos antibióticos carbapenêmicos seguiu as padronizações estabelecidas pelo CLSI (2014), conforme a tabela 3.

Tabela 3. Critérios interpretativos para MIC, segundo o CLSI (2014).

Agentes Antimicrobianos	Interpretação do MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Imipenem	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem	≤ 2	4	≥ 8

Foi identificado o perfil de resistência de 153 cepas de *Acinetobacter* spp., conforme verificado na tabela 4.

Tabela 4. Resultado do MIC das cepas de *Acinetobacter* spp. frente aos antimicrobianos imipenem e meropenem, seguindo as preconizações estabelecidas pelo CLSI, 2014.

IMIPENEM		MEROPENEM	
Range ($\mu\text{g/mL}$)	Número de cepas	Range ($\mu\text{g/mL}$)	Número de cepas

16	73 (47,51%)	8	112 (73,20%)
8	48 (31,37%)	4	25 (16,33%)
4	11 (7,18%)	2	3 (1,96%)
2	8 (5,22%)	1	3 (1,96%)
1	1 (0,65%)	0,5	3 (1,96%)
0,5	4 (2,61%)	0,25	2 (1,30%)
0,25	4 (2,61%)	0,12	1 (0,65%)
0,12	2 (1,30%)	0,06	3 (1,96%)
0,06	2 (1,30%)	0,03	1 (0,65%)
Total	153	Total	153

Os resultados obtidos na MIC, é possível identificar que 121 (79%) cepas foram resistentes ao imipenem, 11 (7,18%) apresentaram resultado intermediário e 21 (13,72%) foram sensíveis ao imipenem. Ao avaliar o meropenem, foi observado que 112 cepas (73,20%) foram resistentes, 25 (16,33%) apresentaram resultado intermediário e 16 (10,45%) foram sensíveis ao meropenem. Resultados de resistência para os antibióticos imipenem e meropenem, já foram descritos conforme estudos de Figueiredo, Santos et al., (2011) e Garcia, César et al., (2013).

A investigação dos genes de resistência *bla_{KPC-2}* e *bla_{IMP-1}* foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Das 153 cepas estudadas, apenas 4 cepas de *Acinetobacter baumannii* apresentaram resultado positivo, comprovando que carregam o gene *bla_{KPC-2}*, conforme a figura 3. No entanto, o gene *bla_{IMP-1}* não foi identificado. No estudo de Abdalhamid, Hassan et al., (2014) também não foi encontrado o gene *bla_{IMP-1}*. Assim como no estudo de Arezzo, Principe et al., (2010) em que não foram evidenciados os genes *bla_{KPC-2}* e *bla_{IMP-1}*. Outros genes de resistência estão sendo investigados a fim de determinar os fatores genéticos envolvidos na indução da resistência bacteriana.

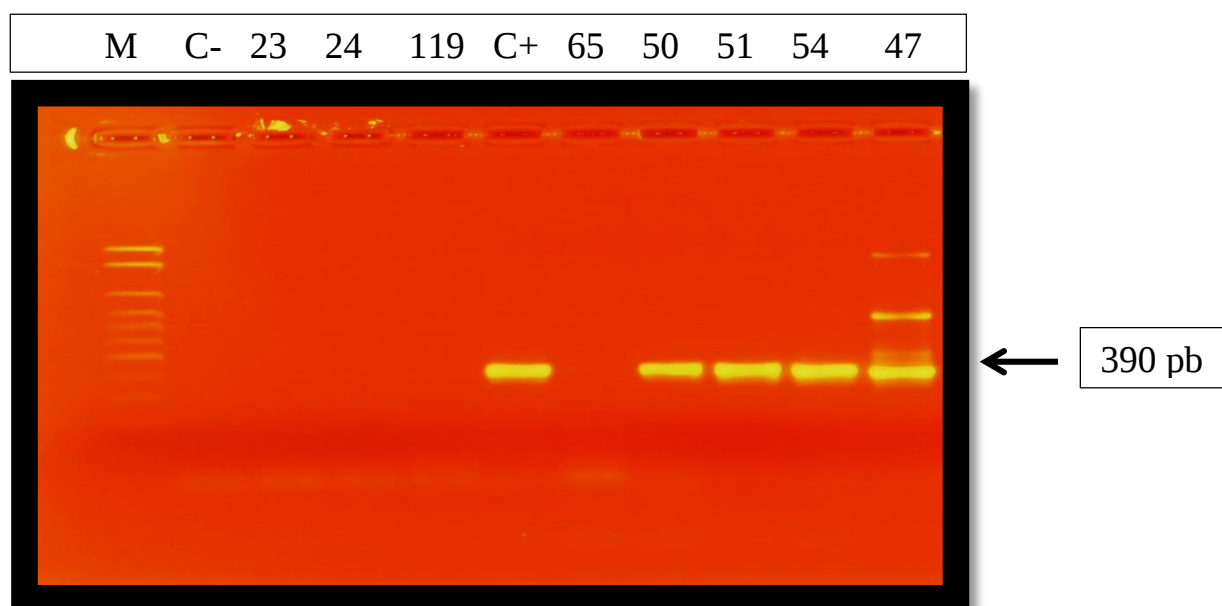


Figura 3. Gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do gene *bla*_{KPC-2} amplificado por PCR de cepas de *Acinetobacter* spp. Coluna M: marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Sigma); Colunas C-: Controle negativo da reação; amostras 23, 24, 119 e 65: cepas com resultado negativo para a PCR; C+: Controle positivo da reação; amostras 50, 51, 54 e 47: cepas com resultado positivo para a PCR. A seta indica o produto amplificado de 390 pares de base referente ao gene *bla*_{KPC-2}.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir da realização deste estudo permitem concluir que existe um número elevado de cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp. neste hospital público de Dourados. Além disso, foi identificado diferença na resistência das cepas estudadas frente aos antibióticos testados. Os resultados obtidos com os genes de resistência testados evidenciam que a avaliação genotípica destas cepas merece futuros estudos para investigação da presença de outros genes de resistência. Este é o primeiro trabalho realizado em um hospital público de Dourados/MS visando investigar cepas de *Acinetobacter* spp. multirresistentes e os resultados obtidos nesta pesquisa servirão de base para estudos futuros de epidemiologia molecular, buscando identificar os fatores de riscos associados à presença destas bactérias, contribuindo para traçar ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por micro-organismos multirresistentes de interesse clínico.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa concedida. Ao CNPq e à FUNDECT pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ABDALHAMID, B.; HASSAN, H.; ITBAILEH, A.; SHORMAN, M. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. **New Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 65-73, 2014.

AGODI, A.; VOULGARI, E.; BARCHITTA, M.; QUATTROCCHI, A.; BELLOCCHI, P.; POULOU, A. et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. **J Hosp Infect.**, 2014.

AREZZO, S.; PRINCIPE, L.; CAPONE, A. et al. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 54–61, 2011.

BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Curr Opin Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 558-64, 2010.

CARVALHO, K. R.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; SANTOS, L. G.; PEREIRA, M. J.; ASENSI, M. D. Occurrence of *bla*_{OXA-23} gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.106, n. 4, p. 2011; 505-506, 2011.

CHAN, M. C.; CHIU, S. K.; HSUEH, P. R.; WANG, N. C.; WANG, C. C.; FANG, C. T. Risk factors for healthcare-associated extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a case-control study. **PLOS One**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2014.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2014.

de OLIVEIRA, R.; MARUYAMA, S. A. T. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Rev Eletr Enf.**, v. 10, n. 3, p. 775-83, 2008.

ENOCH, D. A.; SUMMERS, C.; BROWN, N. M.; MOORE, L.; GILLHAM, M. I.; BURNSTEIN, R. M. et al. Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. **J Hosp Infect.**, v. 70, n. 2, p. 109-18, 2008.

FIGUEIREDO, D. Q.; SANTOS, K. R. N.; PEREIRA, E. M. et al. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 106, n. 3, p. 368-370, 2011.

FIGUEIREDO, D. A.; VIANNA, R. P. T.; NASCIMENTO, J. A. Epidemiologia da Infecção Hospitalar em uma Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Público Municipal de João Pessoa-PB. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17, n. 3, p. 233-240, 2013.

FUNAHASHI, T.; TANABE, T.; MAKI, J.; MIYAMOTO, K.; TSUJIBO, H.; YAMAMOTO, S. Identification and characterization of a cluster of genes involved in biosynthesis and transport of acinetoferin, a siderophore produced by *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906T. **Microbiology**, v.15, n. 4, p. 678-690, 2013.

GARCIA, L. M.; SOUZA, G. A. A. D.; MOTA, E. C. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Rev Epidemiol Control Infect.**, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 2, p. 106-19, 2008.

KAMOLVIT, W.; HIGGINS, P. G.; PATERSON, D. L.; SEIFERT, H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter spp.* **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n. 4, p. 959-963, 2014.

KIM, M. G.; JEON, J. W.; RYU, I. H.; LEE, J. J.; KIM, J. S.; CHOI, J. W. et al. Mycotic abdominal aortic aneurysm caused by bacteroides thetaiotaomicron and *Acinetobacter lwoffii*: the first case in Korea. **Infect Chemother.**, v.46, n. 1, p. 54-58, 2014.

MONTERRUBIO-VILLAR, J.; GONZÁLEZ-VELASCO, C.; VALDEZATE-RAMOS, S.; CÓRDOBA-LÓPEZ, A.; VILLALÓN-PANZANO, P.; SAÉZ-NIETO, J. A. Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 28, n. 10, p. 1281-4, 2009.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev.**, v. 21, n. 3, p. 538-82, 2008.

PRASHANTH, K.; BADRINATH, S. Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. **Indian J Med Microbiol.** 2006;24(1):39-44.

VILLALÓN, P.; VALDEZATE, S.; MEDINA-PASCUAL, M. J.; RUBIO, V.; VINDEL, A.; SAEZ-NIETO, J. A. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 875-882, 2011.