

TIPAGEM MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* PARA CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINA

Ihorrana Wencz Afllen (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Maísa Crsitina Barreto Zago, Giselle Fukita Viana, Nathália Martins Morette de Carvalho, Samuel Rezende Del-Ducca, Márcia Maria dos Anjos Szczerepa, Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientador), e-mail: mcbtognim@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia, Microbiologia Médica

Palavras-chave: carbapenêmicos, polimixina, tipagem molecular.

Resumo:

Isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes tem se tornado cada vez mais frequentes em processos infecciosos principalmente em ambientes hospitalares. O presente estudo é parte de uma dissertação de mestrado que avaliou a resistência antimicrobiana e a produção de β -lactamases do tipo OXAs (*bla_{oxa-23}*, *bla_{oxa-24}*, *bla_{oxa-51}*, *bla_{oxa-58}* e *bla_{oxa-143}*) de 176 isolados *A. baumannii* representantes que estavam presentes em unidades de terapia intensiva (UTIs) de três hospitais da região norte do Paraná nos últimos vinte anos. A tipagem molecular dos isolados foi realizada pela técnica de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus – polymerase chain reaction* (ERIC-PCR). Entre 176 isolados obteve-se 92 clusters distintos dentre os quais, 11 (total de 29 representantes) foram detectados em mais de um hospital ou em diferentes períodos. A resistência aos carbapenêmicos e a polimixina nestes 29 isolados foi de 67,2% e 20,7% respectivamente. A pesquisa molecular de β -lactamases do tipo oxacilinase (OXA) revelou que 100% das amostras apresentaram o gene *bla_{oxa-51}* e 82,7% para o gene *bla_{oxa-23}*, enquanto os demais genes pesquisados não foram detectados. De modo geral a tipagem molecular demonstrou alta variabilidade genética. Destacamos neste estudo que um mesmo cluster pode permanecer em uma instituição por longos períodos de tempo e ainda pode estar disseminado entre UTIs de diferentes instituições.

Introdução

Infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* geralmente eram tratadas com sucesso com antimicrobianos de espectro limitado, no entanto, a habilidade em adquirir e desenvolver mecanismos de resistência tem dificultado o tratamento de infecções por este microrganismo, causando sérias complicações clínicas e altas taxas de mortalidade (DOI et al., 2015).

Os carbapenêmicos são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro e alta potência contra bacilos Gram-negativos, utilizados no

tratamento das infecções causadas por *A. baumannii*. Entretanto a rápida emergência global de cepas de *A. baumannii* resistentes a todos os β -lactâmicos tem sido relatadas, chegando a taxas superiores a 70% em hospitais brasileiros (VIANA et al., 2011; ZARRILLI et al., 2009).

Diante da recente emergência de infecções causadas por cepas de *A. baumannii* multirresistentes, o objetivo deste estudo foi avaliar a resistência aos carbapenêmicos e a polimixina em isolados hospitalares dos últimos 20 anos da região norte do Paraná.

Materiais e métodos

Isolados de Acinetobacter baumannii

Foram selecionados 176 isolados de *A. baumannii* coletados de pacientes das UTIs da Região Norte do Paraná nos últimos vinte anos. Estes isolados foram avaliados em uma dissertação de mestrado de Maisa Cristina Barreto Zago e onde após tipagem molecular foram agrupados em 92 clusters distintos. Neste estudo foram avaliados 29 isolados que tinham como características serem provenientes de 11 clusters de maior importância epidemiológica, ou seja, que estavam presentes em mais de um hospital ou que tivessem sido encontrados em um mesmo hospital por um grande período de tempo.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

As técnicas de ágar diluição e microdiluição em caldo foram realizadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os antibióticos: imipenem (Merck Sharp & Dohme, Darmstadt, Germany), meropenem (AstraZeneca, London, United Kingdom) e polimixina B (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) conforme preconizado pelo Clinical Laboratory Institute Standard (CLSI)

Detecção molecular de beta-lactamases

Técnicas de Multiplex PCR foram utilizadas para a detecção dos genes de oxacilinas, utilizando-se os primers de *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143} de acordo com Woodford et al. (2006).

Tipagem Molecular

Para realização da tipagem molecular o DNA bacteriano dos isolados foi extraído pelo método de fervura por 15 minutos seguido da centrifugação, onde 2 μ L do sobrenadante foram utilizados para as reações de *polymerase chain reaction* (PCR). A genotipagem foi realizada pela técnica de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - reação de cadeia da polimerase (ERIC-PCR), e a interpretação dos padrões de banda foram realizadas com auxílio do software Bionumerics® v.6,5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Os isolados foram considerados pertencentes ao mesmo *cluster* quando o coeficiente de similaridade fosse maior ou igual a 0,93 (SILBERT et al., 2004).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima (CIM) para os carbapenêmicos e polimixina B, a pesquisa molecular de β -lactamases do tipo OXAs e o dendograma obtido pelo “*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*” – *Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR) seguem na Figura 1.

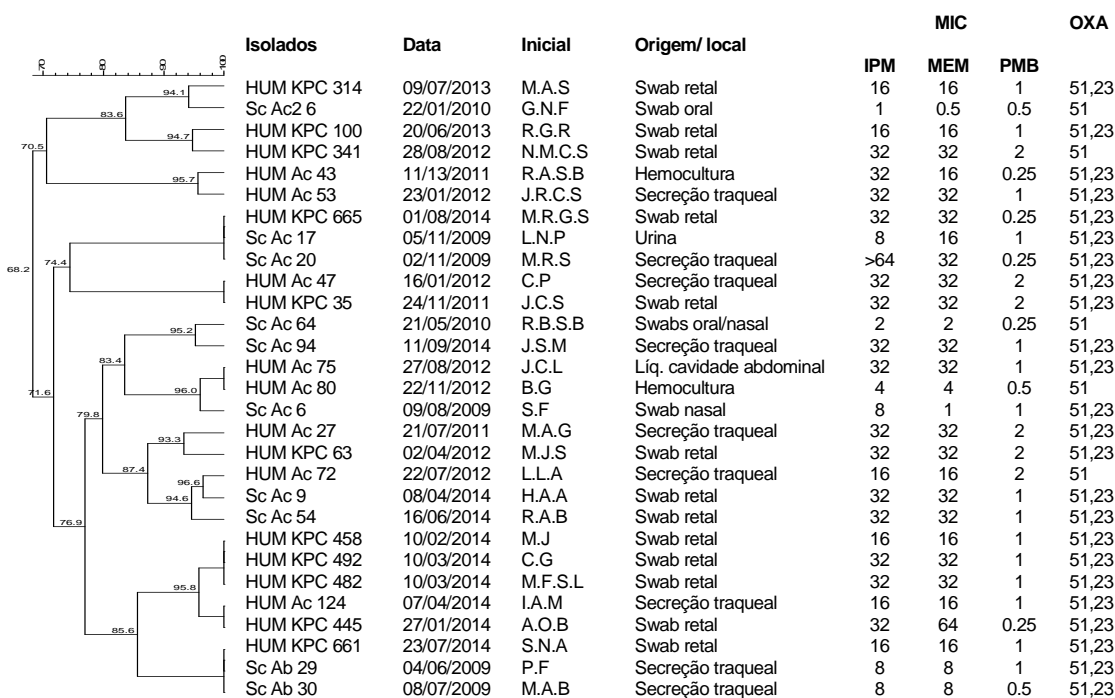


Figura 1. Dendrograma de isolados de *A. baumannii* obtido pelo “*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*” – *Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR). A linha no dendrograma denota o limiar de 93% de homologia para a definição de grupos de similaridade genética. Concentração inibitória mínima – CIM (miligramas/ litro): IPM imipenem, MEM meropenem, PMB polimixina B; OXA oxacilina.

Os valores da CIM dos antibióticos imipenem, meropenem e polimixina B para 29 isolados de *A.baumannii* apresentaram 55,2% dos isolados resistente a imipenem, 79,3% a meropenem e 20,7% a polimixina B, de acordo com a interpretação estabelecida pelo CLSI. Esses resultados demonstram uma rápida evolução na resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos. A pesquisa molecular de β -lactamases do tipo OXAs revelou que 100% das amostras apresentaram o gene *bla*_{OXA-51} e 82,7% apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}, enquanto os demais genes pesquisados não foram detectados. Assim a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* em nossa região é alarmante e está relacionado diretamente com a presença do gene *bla*_{OXA-23}. Viana e colaboradores descreveram um aumento da resistência em nossa região na última década, e esta frequência elevada continua até os dias atuais. A caracterização genotípica realizada em 176 isolados demonstrou alta diversidade clonal e no presente estudo destacamos que 11 *clusters* puderam ser encontrados em mais de um período numa mesma instituição ou em instituições diferentes.

A resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A.baumannii* de modo geral é origem enzimática onde as oxacilinas ganham destaque. Em nosso estudo 82,7% dos isolados carregavam o gene *bla_{oxa-23}* concordando com os dados brasileiros.

Conclusões

Um aumento rápido e progressivo da resistência aos carbapenêmicos foi verificada nas amostras de *A. baumannii* selecionadas ao longo de 20 anos. Os resultados de tipagem molecular revelaram a presença de uma grande variedade genômica, com a presença de 11 *clusters* em mais de um período encontrado em instituições diferentes. O aumento da diversidade clonal verificado nos isolados de *A. baumannii* reforçam a necessidade urgente da implementação de medidas de vigilância principalmente quanto ao uso racional dos antimicrobianos no sentido de se evitar a disseminação destas cepas multirresistentes.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pelo apoio ao desenvolvimento científico.

Referências

DOI Y, MURRAY GL, PELEG, AY. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. Semin Respir Crit Care Med 2015; 36(1):85-98.

SILBERT S, PFALLER MA, HOLLIS RJ, BARTH AL, SADER HS. Evaluation of three molecular typing techniques for non-fermentative Gram-negative bacilli. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25(10):847-51.

VIANA GF, DOS SANTOS SAALFELD SM, GARCIA LB, CARDOSO CL, PELISSON M, TOGNIM MCB. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. Lett Appl Microbiol 2011; 53(3):374-378.

WOODFORD N, FAGAN EJ, ELLINGTON MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J Antimicrob Chemother 2006; 57 (1):154-155.

ZARRILLI R, GIANNOULI M, TOMASONE F, TRIASSI M, TSAKRIS A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries 2009; 3(5):335-341.