

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ- UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE
ANIMAL

Deise Laura Queiroz de Oliveira

**DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM HOSPITAL VETERINÁRIO ESCOLA**

Umuarama-PR

Fevereiro/2018

Deise Laura Queiroz de Oliveira

**DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM HOSPITAL VETERINÁRIO ESCOLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal (PPS), nível Mestrado da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, como exigência para obtenção do grau de Mestre em Produção Sustentável e Saúde Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

Linha de Pesquisa: Microbiologia Animal

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria José Baptista Barbosa

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Sheila Rezler Wosiacki

Umuarama – PR

Fevereiro/2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE
ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

DEISE LAURA QUEIROZ DE OLIVEIRA

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Área de Concentração Saúde Animal, Campus Avançado de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria José Baptista Barbosa

Presidente/ Orientador: Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas

Membro: Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso

Membro: Universidade Estadual de Maringá – UEM

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Deus nosso Senhor por ter me concedido força e coragem para transpor todas as barreiras que foram impostas durante minha jornada até o presente momento.

Com todo amor possível agradeço imensamente a minha mamãe Donísia Queiroz, pelo seu amor e dedicação inabaláveis, que impulsiona e vivencia todos os meus sonhos sem mensurar esforços, me encorajando e apoiando ha todo momento. E dizer a senhora que sem você eu nada sou.

Agradeço imensamente as minhas professoras queridas Maria José Baptista Barbosa e Sheila Rezler Wosiacki por toda a dedicação, empenho, companheirismo, compreensão, e toda a disposição em me ensinar e estimular meu aprendizado. Pela amizade, carinho e afeto que recebi de forma tão distinta, possuo imensa admiração por vocês e seguirei meus caminhos com eterna gratidão as senhoras.

Com imenso carinho, agradeço a todos os meus amigos pela força e estímulo, que me fizeram acreditar que esse dia chegaria. Em especial a Laysla Marelli, Tiago Rossi e Camila André Fiorato por todo apoio e incentivo a mim destinados.

Dedico com muito amor este parágrafo ao meu sobrinho e amigo Mateus Queiroz que é como um filho, e durante todo o período deste projeto estive ao meu lado, me ajudando, apoiando e cuidando de mim.

Agradeço também as colegas e amigas de laboratório, Raquel, Vanessa, Arethusa, Giovana e Ana que tanto contribuíram com o meu desenvolvimento e pelo incentivo durante toda a pesquisa. A todo o corpo docente do PPS, pela dedicação e contribuição a minha formação. Aos funcionários e amigos que fiz na instituição de ensino UEM, destacando Miria e Cristiane que tanto me ajudaram. Enfim, agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram com o meu êxito e auxiliaram para que eu alcançasse meus objetivos.

Encerro, me voltando as minhas professoras e lhes dizendo que:

— As senhoras não contribuíram apenas para o meu crescimento profissional, mas principalmente para o meu desenvolvimento pessoal, sendo inspiração para minha evolução como ser humano!

Muito Obrigada!

Detecção fenotípica de bactérias multirresistentes de importância em saúde pública em Hospital Veterinário Escola

RESUMO

Dentre os grupos de microrganismos relacionados à infecções resistentes e de importância em saúde pública, destacam-se o *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE), o *Staphylococcus* spp. resistente à Meticilina (MRS) e cepas de bactérias Gram-negativas resistentes a Carbapenêmicos (CR). O objetivo deste projeto foi detectar fenotipicamente a presença de bactérias multirresistentes de importância em saúde pública em 15 ambientes do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizado no Campus Regional de Umuarama (CAU). As amostras ambientais foram coletadas em março de 2017 de diferentes superfícies por *swab*, e posteriormente realizadas provas de triagem para isolamento, identificação bacteriana e detecção fenotípica de estirpes multirresistentes. Foram detectadas as cepas bacterianas estudadas em 73,33% (11/15) dos ambientes. No total, foram obtidos 23 isolados dos ambientes avaliados, sendo que *Enterococcus* spp. foram encontrados em 46,66% dos ambientes, não foram encontradas amostras de VRE, MRS em 53,33%, e CR encontradas em 33,33% dos ambientes. Foram identificados fenotipicamente 4 grupos fenotípicos de *Enterococcus* spp., sendo o mais prevalente e também com maior resistência encontrado em três ambientes com índice de multirresistência (MAR) de 0,87. Todas as cepas foram consideradas produtoras de biofilme, sensíveis à vancomicina e a alta resistência à gentamicina foi encontrada em 85,71% das cepas. Foram identificados um *Staphylococcus hyicus* (MRSH), um *Staphylococcus pseudointermedius*, e 6 *Staphylococcus intermedius* (o *S. pseudointermedius* e os *S. intermedius* foram analisados em conjunto como *Meticillin Resistant Staphylococcus intermedius group* - MRSIG). Dos MRSIG foram identificados fenotipicamente 4 grupos fenotípicos. O índice MAR dos *Staphylococcus* spp. variou entre 0,58, e 0,84, todas as cepas de MRSIG foram consideradas produtoras de biofilme. Foram encontradas 7 bactérias Gram-negativas produtoras de metalo-beta-lactamase, sendo 5 identificadas como *Acinetobacter baumannii* classificadas fenotipicamente em três grupos fenotípicos. Os índices de resistência variaram de 0,62 a 0,94. Também foram identificadas uma *Burkholderia pseudomallei*, uma *Burkholderia cepacia* e uma *Pseudomonas fluorescens*. Todas as metalo-beta-lactamases identificadas foram consideradas não produtoras de biofilme. A cepa de *Burkholderia pseudomallei* foi caracterizada como mutante deficiente de porina ou produtora de OXA-48, esta cepa foi resistente a todos os antimicrobianos testados e foi considerada produtora de biofilme.

Palavras chaves: antimicrobianos, resistência, microrganismos, infecções.

Phenotypic detection of multiresistant bacteria of importance in public health in Veterinary Hospital School

ABSTRACT

Among the groups of microorganisms related to resistant infections and of importance in public health, stands out Vancomycin Resistant *Enterococcus* spp. (VRE), Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. (MRS) and Carbapenem Resistant Gram-negative (CR). The objective of this project was to detect phenotypically the presence of multiresistant bacteria of importance in public health in 15 environments of the University Veterinary Hospital (HVU) of the State University of Maringá (UEM), located in the Regional Campus of Umuarama (CAU). The environmental samples were collected in March 2017 from different surfaces by swab, and later tests were carried out for isolation, bacterial identification and phenotypic detection of multiresistant strains. The bacterial strains studied were detected in 73.33% (11/15) of environments. In total, 23 isolates from the evaluated environments were obtained, and *Enterococcus* spp. were found in 46.66 % of environments, no VRE were found. MRS were detected in 53.33%, and CR were found in 33.33% of the environments. Four phenotypic groups of *Enterococcus* spp. were identified, being the most prevalent and also with the greatest resistance found in three environments with a multiresistance index (MAR) of 0.87. All strains were considered to be biofilm producers, sensitive to vancomycin and the high resistance to gentamicin was found in 85.71% of the strains. There were identified a *Staphylococcus hyicus* (MRSH), a *Staphylococcus pseudointermedius*, and 6 *Staphylococcus intermedius* (*S. pseudointermedius* and *S. intermedius* were analyzed together as *Meticillin Resistant Staphylococcus intermedius* group - MRSIG). Of the MRSIG, 4 phenotypic groups were identified. The MAR index of *Staphylococcus* spp. ranged from 0.84 to 0.58, all MRSIG strains were considered biofilm producers. There were found 7 Gram-negative bacteria producing metallo-beta-lactamase, 5 identified as *Acinetobacter baumannii* classified phenotypically in three groups. Resistance rates ranged from 0.94 to 0.62. *Burkholderia cepacia* (MAR = 0.75) and a *Pseudomonas fluorescens* were also identified. All identified metallo-beta-lactamases were considered to be non-biofilm producers. A *Burkholderia pseudomallei* strain was characterized as a porcine deficient mutant or OXA-48 producer, this strain was resistant to all antimicrobials tested and was considered a biofilm producer.

Key words: antimicrobials, resistance, microorganisms, infections

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Identificação fenotípica de *Acinetobacter baumannii* isolados de ambientes hospitalares veterinários pelo Sistema Bactray. Painel A: Bactray I; Painel B: Bactray II 68
- Fig. 2. Identificação fenotípica de *Burkholderia* isoladas de ambientes hospitalares veterinários pelo Sistema Bactray III 68
- Fig. 3. Detecção fenotípica da produção de biofilme pelo ágar vermelho congo. Colônias pretas consideradas positivas e colônias vermelhas negativas 69
- Fig. 4. Antibiograma do *Acinetobacter baumannii* isolado de um ambiente hospitalar veterinário com resistência a todos os antimicrobianos testados 69
- Fig. 5. Teste de Hodges modificado da cepa de *Acinetobacter baumannii* isolada de um ambiente hospitalar veterinário 70
- Fig. 6. Antibiograma do *Burkholderia pseudomallei* isolado de um ambiente hospitalar veterinário com resistência a todos os antimicrobianos testados 70
- Fig. 7. Teste de Hodges modificado da cepa de *Burkholderia pseudomallei* isolada de um ambiente hospitalar veterinário 71
- Fig. 8. E-test para meropenem da cepa de *Burkholderia pseudomallei* isolada de um ambiente hospitalar veterinário 71

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráf. 1. Dendograma dos *Enterococcus* spp. isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola. Observa-se em vermelho o grupo 1 com três observações, o grupo 2 com duas observações (rosa) e o grupo 3 e 4, cada uma com uma observação (azul) 46
- Gráf. 2. Dendograma dos *Staphylococcus intermedius* group isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola. Observa-se em rosa o grupo 1 com três observações, o grupo 2 com uma observação (azul superior), o grupo 3 em vermelho com 2 observações e o grupo 4 (azul inferior) com uma observação 47
- Gráf. 3. Dendograma dos *Acinetobacter baumannii* isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola. Observa-se em verde o grupo 1 com três observações, o grupo 2 com uma observação (azul escuro superior) e o grupo 3 em azul claro inferior com 1 observação 48
- Gráf. 4. Representação gráfica dos halos de inibição de crescimento e linha de tendência representativa por classe/grupo gerada da análise de cluster por aglomeração hierárquica dos *Enterococcus* spp. isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola 60
- Gráf. 5. Representação gráfica dos halos de inibição de crescimento e linha de tendência representativa por classe/grupo gerada da análise de cluster por aglomeração hierárquica dos *Staphylococcus intermedius* group isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola 63
- Gráf. 6. Representação gráfica dos halos de inibição de crescimento e linha de tendência representativa por classe/grupo gerada da análise de cluster por aglomeração hierárquica dos *Acinetobacter baumannii* isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola 66

LISTA DE TABELAS

Tab. 1. Detecção de bactérias de importância em saúde pública em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	45
Tab. 2. Perfil de resistência antimicrobiana dos <i>Enterococcus</i> spp. isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	58
Tab. 3. Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento do antibiograma dos <i>Enterococcus</i> spp. isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	58
Tab. 4. Resultados por classe da análise de cluster por aglomerado hierárquico dos <i>Enterococcus</i> spp. isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	59
Tab. 5. Perfil de resistência antimicrobiana dos <i>Staphylococcus</i> spp. Resistentes à Meticilina (MRS) isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	61
Tab. 6. Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento do antibiograma dos MRS isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	61
Tab. 7. Resultados por classe da análise de cluster por aglomerado hierárquico dos <i>Staphylococcus intermedius</i> group isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	62
Tab. 8. Perfil de resistência antimicrobiana das bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemase isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	64
Tab. 9. Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento do antibiograma das bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemase isoladas em um Hospital Veterinário Escola	65
Tab. 10. Resultados por classe da análise de cluster por aglomerado hierárquico dos <i>Acinetobacter baumannii</i> isolados em diferentes locais de um Hospital Veterinário Escola	65
Tab. 11. Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento do antibiograma das bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemase isoladas em um Hospital Veterinário Escola	67
Tab. 12. Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento do teste para detecção de ESBL das bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemase isoladas em um Hospital Veterinário Escola	67

LISTA DE ABREVIATURAS

PABA	Ácido paraminobenzoico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CR	Bactéria Gram-Negativa Resistente à Carbapenêmicos
MR	Bactérias multirresistentes
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
CAU	Campus Regional de Umuarama
CDC	<i>Center of Disease Control (Centro de Controle de Doenças)</i>
CESP	<i>Citrobacter spp., Enterobacter spp., Serratia spp. e Proteus spp</i>
NaCl	Cloreto de sódio PA
VRE	<i>Enterococcus spp.</i> resistente à vancomicina
EDTA	Ethylenediaminetetracetic Acid
HVU	Hospital Veterinário Universitário
IMI	Imipenem-hydrolyzing β -lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LMA	Laboratório de Microbiologia Animal
MR	Micro-organismos multirresistentes
LA-MRSA	MRSA associado a animais de consumo
CA-MRSA	MRSA comunitários
HA-MRSA	MRSA hospitalares
MAR	Múltipla resistência antimicrobiana
NMC	Not metalloenzyme carbapenemase
NCIH	Núcleo de Controle de Infecção Hospitalar
PVL	<i>Panton Valentine Leucocidine</i>
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec
CoNS	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Resistente à Meticilina
MRS	<i>Staphylococcus spp.</i> resistente à Meticilina
TSB	Tryptone Soya Broth
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UNIFAI	Universidades Adamantinenses Integradas
WHO	<i>World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)</i>

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTE DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA	13
1.1.1 Microrganismos multirresistentes	13
1.1.2 <i>Enterococcus spp.</i> resistente à vancomicina (VRE)	16
1.1.3 <i>Staphylococcus</i> meticilina resistente (MRS)	18
1.1.4 Bactérias Gram negativas multirresistentes	21
1.1.5 ESBL e AmpC	22
1.1.6 Resistência aos Carbapenêmicos	23
1.1.7 Produção de Biofilme	25
1.1.8 Considerações finais	26
1.2. REFERÊNCIAS	26
2 OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	39
Detecção fenotípica de bactérias multirresistentes de importância em saúde pública em Hospital Veterinário Escola	40
ABSTRACT	40
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
Material biológico	43
Detecção de <i>Enterococcus spp.</i>	43
Detecção de <i>Staphylococcus spp.</i> Resistente à Meticilina (MRS)	43
Detecção de bactérias Gram-negativas resistentes à carbapenêmicos	44
Detecção fenotípica de resistência antibacteriana	44
Detecção da produção de biofilme	45
Análise de dados	45
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	51
AGRADECIMENTOS	51
REFERÊNCIAS	51
4 CONCLUSÕES	54
5 APÊNDICES	57
APÊNDICE A – ANÁLISES DOS <i>Enterococcus spp.</i>	58
APÊNDICE B – ANÁLISES DOS <i>Staphylococcus spp.</i>	61
APÊNDICE C – ANÁLISES DAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES À CARBAPENÊMICOS	64
APÊNDICE D – FOTODOCUMENTAÇÃO	68
6 ANEXO	72
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA	73