

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/09/2012.



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara/SP
Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia**



Cássio Antonio Lanfredi dos Santos

**Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias
Recuperadas de Implante Ortopédico de Conjunto Placa-
Parafuso e Parafuso de Aço Inoxidável Austenítico após
Remoção Cirúrgica**

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite
Co-orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Araraquara/SP

2011



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara/SP
Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia**



Cássio Antonio Lanfredi dos Santos

**Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias
Recuperadas de Implante Ortopédico de Conjunto Placa-
Parafuso e Parafuso de Aço Inoxidável Austenítico após
Remoção Cirúrgica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (Área de Conhecimento em Microbiologia), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite
Co-orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Araraquara/SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S237c Santos, Cássio Antonio Lanfredi dos
Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias recuperadas de implante ortopédico de conjunto placa-parafuso e parafuso de aço inoxidável austenítico após remoção cirúrgica / Cássio Antonio Lanfredi dos Santos. – Araraquara, 2011
218 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite
Co-orientador: Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

1. Implantes de osteossíntese. 2. Biofilme. 3. Sonicação. 4. Infecção. 5. Biomateriais. 6. Resistência aos antimicrobianos. I. Leite, Clarice Queico Fujimura, orient. II. Pizzolitto, Elisabeth Loshchagin, co-orient. III. Título.

CAPES: 40300005

Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias Recuperadas de Implante Ortopédico de Conjunto Placa-Parafuso e Parafuso de Aço Inoxidável Austenítico após Remoção Cirúrgica

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP
Co-Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mauro José Costa Salles

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo
Membro Titular

Prof. Dr. Adilson César Abreu Bernardi

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Membro Titular

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica do NAC/FCFAR/UNESP do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista (UNESP), com auxílio de bolsa (CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e auxílio financeiro do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (PADC/FCFAR – UNESP).

Dedicatória

À Deus

Pela vida, saúde e dias de glória. Razão de tudo o que somos e fazemos!

Aos Meus Pais, Luís Alberto dos Santos e Fátima Lanfredi dos Santos

Que não mediram esforços para que chegasse até esta etapa de minha vida. Sou grato pelo apoio incondicional, estímulo, compreensão e imenso amor. Razão maior de minha existência e exemplo de amor e vida. Obrigado por tudo! Vocês são muito importantes na minha vida! Amo eternamente vocês!

Agradecimento Especial

À Prof. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto,

Minha orientadora, com um perfil de profissionalismo e caráter, a qual respeito, desde o início em que tive o prazer de conviver e estar sob seus ensinamentos em todo o período de pesquisa acadêmica.

Sou grato, pelos conhecimentos adquiridos e necessários para minha vida profissional, conduzindo-me na arte da Bacteriologia em todos os seus aspectos, transmitindo seus sábios conhecimentos e valiosas vivências, sempre com muita dedicação e que carinhosamente solidificou com os seus conselhos e saberes a este trabalho.

É um mérito e satisfação compartilhá-las as experiências no dia-a-dia. A senhora é um exemplo de Profissional e Microbiologista!

Muito Obrigado por tudo!

Agradecimentos

À Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara/SP, pelo apoio e contribuição como orientadora para desenvolvimento do projeto de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Adílson César Abreu Bernardi, pela amizade, colaboração profissional, incentivo e, fundamentalmente, pelos ensinamentos primordiais em Microbiologia.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”. Cora Coralina

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto, meus agradecimentos pelos ensinamentos transmitidos durante todo este período. É uma honra tê-lo conhecido, pois, é um exemplo de Homem, um exemplo de Profissional!

Ao Engenheiro Tomaz Puga Leivas, chefe da Comissão de Projetos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo - IOT-HCFMUSP, pelo apoio, colaboração das amostras clínicas e ensinamentos compartilhados para realização do projeto de Mestrado.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, do Laboratório de Micologia-FCFAR, UNESP - Araraquara/SP, pelo apoio e solicitação do microscópio de fluorescência para análises das amostras.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, do Laboratório de Bacteriologia - Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pela disponibilização e contribuição no estudo de análise molecular das bactérias.

À Mariana Vendramini, minha namorada e companheira. Sou grato pela compreensão das minhas constantes ausências, pelas palavras de incentivo aos estudos, e principalmente pela confiança depositada, carinho e amor. Amo muito você!

Ao meu grande amigo e irmão, Flávio Ferraz de Campos Júnior. Muito obrigado por ser meu AMIGO, companheiro de pesquisas e viagens. Saiba que nossos momentos e ensinamentos compartilhados, ficarão pra toda história. A nossa velha frase sempre prevalecerá: “Estamos juntos sempre!”

Aos amigos Pós-Graduandos: Bruna de Arruda Leite, Adilson Oliveira, Valéria Cataneli Pereira, entre muitos outros, agradeço pelos estudos compartilhados, auxílios prestados e incentivos a pesquisa.

Aos funcionários e ex-funcionário, do Laboratório de Análises Clínicas - Setor de Microbiologia Clínica - CRD/NAC/FCFAR: Aline Raquel Voltan, Gabriela de Souza Bettio e Benedita Reis de Abreu, pela amizade, colaboração profissional e conselhos durante a realização do projeto de Mestrado. “Ditinha, mesmo você estando ausente, ainda sinto a sua presença e escuto suas cantorias. Saudades!”

Ao funcionário, Marcos Aparecido Dangona, técnico do Laboratório de Bioquímica - FCFAR, UNESP-Araraquara/SP, pela contribuição prestada dos equipamentos permanentes, para realização do presente projeto.

Ao funcionário Sebastião Anésio Dametto, técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Instituto de Química da UNESP, Araraquara/SP. É indispensável o meu agradecimento, pela

colaboração prestada durante toda prática de MEV realizada em projetos anteriores.

Aos meus Padrinhos, Luiz e Maria Alice, pelo incentivo a pesquisa, apoio e carinho, dedicado durante toda minha trajetória acadêmica!

À todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (do Centro) e Laboratório de Análises Clínicas - CRD/NAC/FCFAr - UNESP, Araraquara/SP, pela amizade atribuída e incentivo aos estudos.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia - FCFAr, UNESP, Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim, Joyce Gimenes Romero, Ângela Bergo, Márcia Adolf, Sonia Ornelas e outras, pela paciência, dedicação e apoio.

Aos Familiares e Amigos: Abigail Gotardi dos Santos, Diogo Pedraci dos Santos, Hugo Pedraci dos Santos, Daniel Aily, Jorge Manuel German, Fábio Anastácio Rosa, Ricardo Zerlin, Sandra Mara Leão, Samanta Santos, Ohana Castro, Maiara, Cristiane Viola, Jamile Carol, Luis Ricardo Fancio, Clébson Barberá, Cleimair Lazarini, Maurinho Tassani, Bruno Pelegrin, Bruno Roveri Saborido, Gustavo Maldonado, Gregory Carvalho, William Gustavo, Rafael Tessarro, Anderson Silveira, Allyson Silveira, Fernando Vendramini, Rafael Vendramini, Camila Solato, Danila Dantas, Vicente e Sueli, José Nivacir e Marlene Vendramini, Karen Ferraz, Flávio Ferraz de Campos e Lourdes Coletti de Campos, Fernanda Sanches, Marcelo Cremonese, Débora Garcia, Brunna Meneghelli, Victória Bravo, Liana Bello, Iris Gonçalves, Lais Rossi. Grato pela amizade, incentivo a pesquisa e por ter acreditado em meu potencial!

Sem citar mais nomes porque poderei esquecer alguns, agradeço aos que me apoiaram de alguma forma, diretamente ou indiretamente, a todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização desse trabalho.

Muito Obrigado!

Mais uma etapa ... mais uma conquista um sonho realizado!

“Mas pra quem tem pensamento forte o impossível é só questão de opinião”

*Na ignorância não conseguiríamos, como não
conseguiremos, enxergar o caminho real que Deus
traçou a cada um de nós na Terra.
Todos nós sejamos crianças ou jovens, adultos ou
já muitíssimo maduros, devemos estudar sempre.*

Chico Xavier

Resumo

SANTOS, C. A. L. **Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias Recuperadas de Implante Ortopédico de Conjunto Placa-Parafuso e Parafuso de Aço Inoxidável Austenítico após Remoção Cirúrgica.** 2011. 218f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara/SP.

A maioria dos casos de fraturas ósseas é utilizada nas cirurgias, implantes ortopédicos de osteossíntese (placa-parafuso e parafusos) confeccionados em aço inoxidável austeníticos, devido à sua baixa relação custo-benefício. As infecções associadas aos implantes de osteossíntese estão relacionadas com o crescimento de microrganismos em biofilmes, resultando em um processo infeccioso de difícil erradicação. O objetivo do estudo foi identificar os microrganismos recuperados do conjunto metálico placa-parafuso e parafusos após remoção cirúrgica, avaliar a capacidade de aderência dos microrganismos, verificar a viabilidade celular, caracterizar genotipicamente os isolados Gram-positivos e detectar a resistência aos antimicrobianos. Os conjuntos placa-parafuso e parafusos de aço inoxidável austenítico ASTM F138/F139 e ISO NBR 5832-1/9 foram transportados em bolsa de polietileno para o Laboratório de Microbiologia Clínica. Os implantes foram lavados em solução tampão fosfato-salino, armazenados em bolsa contendo solução Ringer e submetidos ao banho ultrassônico em frequência de 40 ± 2 kHz por 5 minutos. O fluido sonicado foi transferido para tubos Falcon e centrifugado a 3.000g durante 20 minutos. O sedimento foi resuspenso em nova solução Ringer, homogeneizado por vortex e 10 μ L semeados em ágar Sangue de carneiro 5%, MacConkey e Sabouraud. Os meios foram incubados em diferentes condições de temperatura por 7 a 14 dias para recuperação de microrganismos. O perfil de resistência dos isolados foi obtido de acordo com CLSI 2011. Para análise da viabilidade celular foi utilizado o *kit Live/Dead* e microscópio de fluorescência. Após

análise microbiológica observou-se o isolamento polimicrobiano em algumas amostras de implantes. Os dados obtidos mostraram que as bactérias mais isoladas foram os *Staphylococcus* coagulase-negativa resistente à eritromicina, oxacilina e clindamicina. Em menor frequência, foram isolados *Pseudomonas aeruginosa* resistente à sulfametoxazol/trimetoprim e ampicilina; *Acinetobacter baumannii* com resistência à ceftazidima; *Enterobacter cloacae* resistente à cefalotina, cefoxitina, cefazolina, levofloxacina, ciprofloxacina; *Bacillus spp.* e *Candida tropicalis*. Por microscopia de fluorescência foram observados agrupamentos celulares vivos envoltos em substância amorfa, sugestivo de polissacarídeo extracelular e característico de biofilme. A avaliação de aderência à placa de poliestireno mostrou que o *Staphylococcus epidermidis* aderiu fracamente e os *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus simulans* aderiram fortemente. A amplificação do DNA dos três isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativa demonstrou ausência do gene *icaA*. Os *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus schleiferi* demonstrou, concomitante, a presença dos genes *icaD* e *icaC*, e *Staphylococcus simulans* não apresentou os genes *icaA*, *icaD* e *icaC*. A amplificação do gene *16S rDNA* foi detectada concomitantemente nas amostras analisadas. Concluí-se que os conjuntos placa-parafuso e parafusos usados como implantes ortopédicos para fixação de fratura óssea foram colonizados por diversos microrganismos que apresentaram resistência múltipla aos antimicrobianos e estão relacionados à infecção de implantes ortopédicos.

Palavras-chave: amplificação dos genes *icaA*, *icaD*, *icaC*, *16S rDNA*, banho ultrassônico, biofilme, implante de osteossíntese, resistência bacteriana.

Abstract

SANTOS, C. A. L. **Genotypic and Phenotypic Characterization of Bacteria Recovered of Orthopedic Implant of Set Screw-Plate and Screw of Stainless Steel Austenitic after surgical removal.** 2011. 218f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara/SP.

The majority of cases of bone fractures is used in surgery, internal fixation of orthopedic implants (screw-plate and screws) manufactured in austenitic stainless steel due to its low cost-benefit. Infections associated with implant fixation are related to the growth of microorganisms in biofilms, resulting in an infection difficult to eradicate. The objective of study was to identify the microorganisms recovered from the set screw-plate and screws metallic after surgical removal, evaluate the capacity of adherence of microorganisms, check the cell viability and characterize the isolates genotypically Gram-positive and detect antimicrobial resistance. The sets screw-plate and screws of austenitic stainless steel ASTM F138/F139 and ISO NBR 5832-1/9 were transported in polyethylene bag to the Laboratory of Clinical Microbiology. The implants were washed in phosphate buffered saline solution, stored in bags containing Ringer's solution and submitted to ultrasonic bath at a frequency of 40 kHz \pm 2 for 5 minutes. The sonicate fluid was transferred to falcon tubes and centrifuged at 3.000g for 20 minutes. The new sediment was re-suspended in Ringer's solution, homogenized by vortex and 10 μ L seeded agar 5% sheep blood, MacConkey and Sabouraud. The media were incubated at different temperatures for up to 7 days for growth of CFU mL⁻¹. The resistance profile of the isolates was obtained according to CLSI 2011. For analysis of cell viability kit was used for *Live/Dead* and fluorescence microscope. After microbiological analysis the isolation was observed in some samples of polymicrobial implants. The data obtained showed that bacteria were the most isolated coagulase-negative

Staphylococcus resistant to erythromycin, clindamycin and oxacillin. Less frequently, were isolated from *Pseudomonas aeruginosa* resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and ampicillin, *Acinetobacter baumannii* resistant to ceftazidime, *Enterobacter cloacae* resistant to cephalothin, cefoxitin, cefazolin, levofloxacin, ciprofloxacin, *Bacillus spp.* and *Candida tropicalis*. On fluorescence microscopy were observed live cell groups enveloped in an amorphous substance, suggestive of extracellular polysaccharide and characteristic biofilm. The evaluation of adherence to the polystyrene plate showed that *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus schleiferi* adhered weakly and *Staphylococcus simulans* strongly adhered. The amplification of DNA from three strains of coagulase-negative *Staphylococcus* showed the absence of the *icaA* gene. The *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus schleiferi* showed, concomitantly, the presence of genes *icaD* and *icaC*, and *Staphylococcus simulans* showed to be negative for the presence of genes *icaA*, *icaD*, *icaC*. The amplification of the *16S rDNA* was detected simultaneously in the samples analyzed. We concluded that the plate sets screw-plate and screws used as orthopedic implants for fixation of bone fracture were colonized by various microorganisms that showed resistance to multiple antibiotics and are related to infection of orthopedic implants.

Keywords: gene amplification *icaA*, *icaD*, *icaC*, *16S rDNA*, ultrasonic bath, biofilm, implant of osteosynthesis, bacterial resistance.

1. Introdução

Os implantes ortopédicos têm se tornado componente essencial da medicina moderna porque restauram a mobilidade do indivíduo, reduzem as dores e, melhoram a qualidade de vida de milhões de pessoas por ano (FITZGERALD, 1992; BERBARI, et al., 1998; TRAMPUZ et al., 2003b; LONG, 2008). A artroplastia tornou-se tratamento de escolha para pacientes com dores crônicas e incapacidade por artrite no joelho (MORAN e HORTON, 2000). Em virtude do número crescente de paciente com idade superior a 65 anos o número de pacientes que requerem implante continuará crescendo junto com o risco de infecção relacionada a dispositivo ortopédico, o que ainda limita o irrestrito uso de biomaterial em humanos (ISIKLAR et al., 1996; BERBARI et al., 1998; TRAMPUZ et al., 2003b).

O grande desafio para engenheiros e cientistas é produzir um material que em contato com o tecido vivo não apresente reações adversas (não tóxico, não carcinogênico, não antigênico e não mutagênico). Os biomateriais são projetados para realizar uma função específica do corpo e são utilizados para reparar ou substituir partes do organismo. Os metais comumente utilizados para implantes ortopédicos são os aços inoxidáveis austeníticos, as ligas de cobalto-cromo e as ligas de titânio. Os aços inoxidáveis apresentam boas características de resistência mecânica, porém sua resistência à corrosão é a mais baixa entre esses materiais. Entretanto, seu uso é bastante difundido, tanto em próteses de uso permanente como em estruturas de fixação (pinos, parafusos) de uso temporário, especialmente, devido ao custo mais baixo (RODRÍGUEZ et al., 2004).

8. Conclusão

- Os *Staphylococcus* coagulase-negativa foram os microrganismos mais isolados do conjunto placa-parafuso e parafusos.
- Comprovou-se a presença de agentes bacterianos responsáveis por altas taxas de incidência de infecções hospitalares e contaminações em materiais cirúrgicos.
- Por microscopia de fluorescência observou-se microrganismos viáveis em todas as amostras em suspensão e após formação de biofilme.
- As cepas isoladas apresentaram resistência múltipla aos antimicrobianos.
- Os isolados cocos Gram-positivos submetidos ao teste de aderência em placa de poliestireno mostraram-se positivos para formação de biofilme.
- Através da análise de PCR observou-se a presença de genes de virulência *icaD* e *icaC* nas amostras de *S. epidermidis* e *S. schleiferi* e ausência dos genes *icaA*, *icaD*, *icaC* no isolado *S. simulans*. O gene *16S do rDNA* foi observado em todos os isolados *Staphylococcus* coagulase-negativa.