

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE CRESCIMENTO LENTO.

Beatriz Ignácio Pinel (PIBIC/CNPq/FA/UEM), João Vítor Perez de Souza, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

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

Área: microbiologia (21200009) e subárea: bacteriologia (21201021)

Palavras-chave: *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, resistência.

Resumo:

As micobactérias não tuberculosas são um grupo que se destaca por causar infecções em qualquer local do corpo humano. O tratamento é constituído de múltiplos fármacos, com diferentes mecanismos de ação, visando evitar o desenvolvimento de resistência. O objetivo deste projeto foi determinar a suscetibilidade de micobactérias não tuberculosas de crescimento lento a antimicrobianos que são comumente empregados no tratamento de infecções causadas por esse grupo bacteriano. Foram selecionados isolados clínicos de *Mycobacterium kansasii*, *M. gordonae* e *M. avium* e cultivados em Mueller Hinton Broth cátion ajustado enriquecido com 5% de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC) a 37°C. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada por microdiluição em caldo, com o método *resazurin broth microdilution assay*. Os isolados clínicos testados mostraram perfis de susceptibilidade variados para rifampicina (RIF), claritromicina (CLA) e ciprofloxacino (CIP). *M. avium* mostrou-se como o isolado mais resistente à CLA (256 µg/mL) e o mais sensível à RIF (8 µg/mL) e CIP (0,125 µg/mL). Por outro lado, *M. kansasii* e *M. gordonae* apresentaram as mais altas CIMs para RIF (256 µg/mL). Nossos resultados corroboram com a literatura e indicam presença de isolados clínicos resistentes aos fármacos de primeira escolha para o tratamento de micobacterioses.

Introdução

O gênero *Mycobacterium* spp. é composto por bactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* e o grupo de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT). As MNT são caracterizadas por apresentarem patogenicidade variável e estarem dispersas na natureza, principalmente no solo e na água potável (COELHO, L., 2016). Podem causar infecções em qualquer local do corpo humano, sendo mais frequente em indivíduos que já possuem um histórico de doença respiratória ou em imunocomprometidos, mas também podendo se desenvolver em pessoas saudáveis (COWMAN et al., 2016).

As MNT podem ser diferenciadas de acordo com a velocidade de crescimento e produção de pigmentos *in vitro*. Micobactérias de crescimento lento (SGM, do

inglês *slowly growing mycobacteria*) crescem e desenvolvem colônias em um período maior que sete dias de incubação (BOMBARDA S, et al). As SGM incluem principalmente o complexo *M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. szulgai* e *M. gordonae*. Dentro deste grupo, destacam-se *M. avium* e *M. kansasii* por sua patogenicidade e incidência de infecções respiratórias.

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções causadas por MNTs é um problema para o enfrentamento dessas doenças. Assim, conhecer o perfil de resistência de cada isolado clínico realizado por testes específicos é de suma importância a fim de que a terapia farmacológica seja precisa e eficaz. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de *M. avium*, *M. kansasii* e *M. gordonae* à claritromicina (CLA), rifampicina (RIF) e ciprofloxacino (CIP), antimicrobianos empregados no tratamento de infecções causadas por esse grupo.

Materiais e métodos

Seleção de isolados clínicos de SGM

A seleção dos isolados de SGM ocorreu pelo levantamento nos registros do Laboratório de Bacteriologia Médica da UEM (LBM-UEM), e *M. avium*, *M. kansasii* e *M. gordonae* foram selecionadas. Assim, esses isolados foram descongelados e cultivados em meio de cultura Mueller Hinton Broth (MHB) (Difco Laboratories, Detroit, USA) cátion ajustado enriquecido com 5% de OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e cultivados em estufa a 37°C.

Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos CLA, RIF e CIP, empregados no tratamento de micobacterioses foi determinada de acordo com o método *resazurin broth microdilution assay* (CASTILHO, A. L. et al., 2015). Resumidamente, os fármacos foram diluídos de forma seriada em MHB cátion ajustado enriquecido com 5% de OADC, em microplacas de 96 cavidades. Em seguida, as suspensões bacterianas foram padronizadas com a escala de McFarland nº 0,5, diluídas na razão de 1:200 em MHB cátion ajustado enriquecido com 5% de OADC e inoculadas 100 µL nas cavidades das microplacas. As microplacas foram então incubadas a 37 °C em atmosfera normal durante 5 dias. Após incubação, 30µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) foi adicionado a cada cavidade e as placas foram incubadas por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano (inibir a mudança de cor da resazurina de azul para róseo, avaliado visualmente).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos indicam que *M. avium* mostrou-se como o isolado mais resistente à CLA (256 µg/mL) e o mais sensível à RIF (8 µg/mL) e CIP (0,125 µg/mL). Enquanto que *M. kansasii* e *M. gordonae* apresentaram as mais altas CIMs para RIF (256 µg/mL), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade de *M. kansasii*, *M. avium* e *M. gordonae* aos antimicrobianos rifampicina, claritromicina e ciprofloxacino.

Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
Espécie	Rifampicina	Claritromicina	Ciprofloxacino
<i>M.kansasii</i>	256	4	0,25
<i>M. Avium</i>	8	256	0,125
<i>M. gordonae</i>	256	32	0,25

A menor CIM de RIF foi observada para *M. avium* (8 µg/mL), enquanto *M. kansasii* e *M. gordonae* apresentaram concentrações muito mais elevadas (256 µg/mL) (Tabela 1). RIF é um dos principais fármacos empregados no tratamento de infecções causadas por *M. kansasii* e *M. gordonae* e resistência à RIF nessas espécies já foi relatada. Os isolados clínicos testados neste trabalho demonstraram CIM para RIF muito elevada, quando comparada com a literatura pertinente (LIU, C.-F. et al., 2021).

Considerando CLA, a CIM desse fármaco em *M. avium* foi que demonstrou maior valor (CIM = 256 µg/mL), seguido por *M. gordonae* e *M. kansasii* com CIMs de 32 e 4 µg/mL, respectivamente. Estudos indicam que a CLA é o medicamento mais ativo contra bactérias do complexo *M. avium*, juntamente com a amicacina, por possuírem ótimos efeitos bacteriostáticos, sendo considerados antimicrobianos de primeira linha para o tratamento de infecções causadas pelo complexo MAC (LIU, C.-F. et al., 2021).

Finalmente, CIP demonstrou atividade inibitória muito semelhante entre as SGM testadas, com CIMs de 0.25 µg/mL em *M. kansasii* e *M. gordonae* e 0.125 µg/mL em *M. avium*. Estes resultados concordam com recomendações internacionais de tratamento que preconizam o uso de fluoroquinolonas (dentre elas CIP) em casos de resistência à RIF nessas micobactérias.

Além de resistência adquirida a fármacos do esquema terapêutico, as SGM são reconhecidamente agentes formadores de biofilme e podem induzir a formação de granulomas no hospedeiro. Somadas, essas características fazem com que esse grupo de micobactérias seja resistente à ação de desinfetantes e dificulte ainda mais a ação de fármacos no hospedeiro no combate as micobacterioses.

Conclusões

RIF e CLA apresentaram altas concentrações inibitórias contra os isolados clínicos testados. Esses resultados são preocupantes, pois indicam a disseminação de resistência que pode levar a diminuições no sucesso terapêutico. Nesse sentido,

o estabelecimento de estratégias de vigilância ou ainda de novos fármacos ou regimes terapêuticos se faz necessário para o combate da resistência nas MNT.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida, a Profª Drª Rosilene Fressatti Cardoso pela oportunidade de adquirir mais conhecimento neste projeto de pesquisa no laboratório de Bacteriologia Médica, e também ao doutorando João Vitor Perez Souza pela dedicação e disposição ao me auxiliar neste projeto.

Referências

BOMBARDA S, *et al.* Recomendações para o diagnóstico e tratamento das micobacterioses não tuberculosas no Estado de São Paulo. Divisão de Tuberculose, Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjak, **Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**, Brasil, p. 1-15, 2014.

CASTILHO, A. L. *et al.* Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 119–121, 2015.

COELHO, L. Ocorrência de micobactérias não causadoras de tuberculose no Brasil. Trabalho de conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional. **Programa 2016 do Instituto Adolfo Lutz**. Campinas, p. 15-17, 2016.

COWMAN, S. *et al.* The antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria. **Journal of Infection**, v. 72, n. 3, p. 324–331, 2016.

LIU, C.-F. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in China: incidence and antimicrobial resistance spectrum from a nationwide survey. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p.5-11, 2021.