

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *Mycobacterium avium* A FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

Camile Yukari Okochi¹ (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Renata Alexandre de Oliveira¹, Giulienne Karla Pereira da Silva¹, Carolina Trevisolli Palomo¹, João Vítor Perez de Souza¹; Letícia Sayuri Murase¹, Rosilene Fressatti Cardoso¹ (Orientador),
e-mail: rfcardoso@uem.br

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde, Microbiologia

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium avium*; perfil de suscetibilidade; antimicobacterianos.

RESUMO

As micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) se tornaram relevantes nos últimos 20 anos por causarem infecções pulmonares e extrapulmonares principalmente em pacientes imunocomprometidos. O tratamento padrão para infecções causadas por MAC é poliquimioterápico baseado na associação de antibióticos macrolídeos. Entretanto, estudos recentes demonstraram a recorrente resistência aos antimicrobianos tradicionais em espécies pertencentes ao MAC. Desta maneira, esquemas particulares de fármacos são indicados em cada caso, concomitantemente a avaliação de atividade dos fármacos por testes de susceptibilidade antimicrobiana tentativa de proporcionar um tratamento mais eficaz e promissor para pacientes com micobacterioses. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos do MAC a fármacos antimicobacterianos. A concentração inibitória mínima de cada fármaco foi determinada pelo método *Resazurin Broth Microdilution Assay* (REBMA). Foram selecionados quatro isolados clínicos do MAC pertencentes à micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica (LEPAC-UEM). A CIM de amicacina (AMK) variou de 0,5 a 1 µg/mL, de 4 a 16 µg/mL para rifampicina (RIF), de 0,06 a 0,25 µg/mL paramoxifloxacina (MXF), de 0,06 até 0,25 µg/mL para CIP, de 256 a 512 µg/mL para CLA e para LNZ o valor de CIM variou de 16 a 32 µg/mL. Os isolados clínicos de MAC presentes neste estudo apresentaram diferentes perfis de suscetibilidade aos fármacos antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

As micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) são micobactérias não tuberculosas, ubíquas, encontradas em locais como o solo e

água. Essas micobactérias podem ser causadoras de variados tipos de doenças. Um grupo que merece destaque são indivíduos com doenças pulmonares subjacentes ou pessoas com sistema imune comprometido, com risco de infecções pulmonares (Hajikhani *et al.*, 2021).

As bactérias pertencentes ao MAC apresentam variabilidade quanto ao aspecto de suas colônias, podendo ser lisas ou rugosas, sem cor ou amareladas, ou podendo se assemelhar a distintas espécies bacterianas. Essas micobactérias também podem ser causa de maior crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, causadora de bronquiectasia (Carazo-Fernández *et al.*, 2022), e a coinfeção de micobactérias não-tuberculosas, como a *M. avium*, com bactérias causadoras de bronquiectasia é muito relacionada e amplamente descrita na literatura.

A infecção por MAC pode ser pela via respiratória, pelo trato gastrointestinal e também por inoculação direta por trauma ou procedimento invasivo. MAC apresenta mecanismos de resistência à imunidade do hospedeiro que podem ser devido aos lipídios (ácidos micólicos) presentes na parede celular da micobactéria (Busatto *et al.*, 2019).

No tratamento de doenças ocasionadas por MAC, geralmente, é utilizada uma combinação de um antibiótico macrolídeo com etambutol e rifampicina (Kim *et al.*, 2022). Algumas micobactérias podem apresentar resistência a esses antimicrobianos. Nesse sentido, é de extrema importância a realização testes de suscetibilidade aos fármacos de uso padrão no tratamento para micobacterioses, tendo em vista que estes representam a primeira alternativa de tratamento e são amplamente utilizados. Considerando a ubiquidade apresentada pelo complexo *M. avium*, as doenças ocasionadas por ele, o perfil de resistência à imunidade do hospedeiro e as dificuldades do tratamento, o presente trabalho objetiva avaliar o perfil de suscetibilidade, *in vitro*, de isolados clínicos do MAC aos fármacos antimicrobianos convencionalmente utilizados para o tratamento de micobacterioses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados clínicos pertencentes ao MAC estocados na micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica (LEPAC-UEM) foram selecionados para este estudo. As culturas bacterianas foram descongeladas e reativadas de acordo com protocolo previamente padronizado e colocados inicialmente em meio de cultura sólido Lowenstein-Jensen por 3 a 5 dias a 30 °C. Após, foram cultivados em meio líquido Mueller Hinton Broth (MHB) e incubados à temperatura de 35 °C por 5 – 7 dias.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de CLA, AMK, RIF, MXF, LNZ e CIP foi determinada pelo método *resazurin broth microdilution assay* (REBMA), de acordo com Castilho *et al.* (2015), utilizando uma microplaca de 96 orifícios, para cada isolado clínico pertencente ao complexo *Mycobacterium avium* (MAC). Primeiramente, foram adicionados 200µL de água destilada estéril aos orifícios marginais da microplaca (coluna 1 e 12). Em seguida, foi adicionado 100µL de MHB cátion ajustado (CAMHB) nos orifícios restantes, com exceção das linhas marginais superiores e inferiores. Nas cavidades da coluna 11, destinados ao controle negativo do ensaio, foi adicionado apenas MHB. Na coluna 02 da microplaca adicionamos

100 µL dos fármacos CLA, AMK, RIF, MXF, LNZ e CIP em solução estoque no primeiro orifício, e em seguida foi feita a diluição seriada até a coluna 10 para se obter diluições seriadas de 0,03-4 µg/mL, 0,03-4 µg/mL, 1-256 µg/mL, 0,03-4 µg/mL, 0,25-64 µg/mL e 0,06-16 µg/mL, respectivamente. O inóculo bacteriano foi padronizado utilizando escala de McFarland 0,5. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi diluída 1:200 e em seguida, adicionados 100 µL nos orifícios da microplaca contendo as diluições dos fármacos bem como nos destinados ao controle positivo. As microplacas foram tampadas e incubadas a 35 °C em atmosfera normal por 5 dias. Após esse período, foram adicionados 30 µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) recém preparada a cada uma das cavidades e as placas foram reincubadas por mais 24 h nas mesmas condições usadas previamente. A mudança da cor azul para rosa, pela redução da resazurina, foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir a mudança de cor da resazurina de azul para róseo (inibição do crescimento bacteriano). Controles de esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. A CIM de ciprofloxacino (CIP) para a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 também foi determinada como controle, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM de AMK variou de 0,5 a 1 µg/mL, de 4 a 16 µg/mL para RIF, 0,06 a 0,25 µg/mL para MXF, de 0,06 até 0,25 µg/mL para CIP, de 256 a 512 µg/mL para CLA e para LNZ o valor de CIM variou de 16 a 32 µg/mL. Para a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 os valores da CIM encontrados variaram de 0,125 a 0,5 µg/mL dependendo da espécie de MAC. Os resultados encontram-se na tabela 1. Uma vez que o tratamento e a epidemiologia das micobacterioses diferem significativamente de outras infecções e mesmo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e hanseníase (*Mycobacterium leprae*), outras duas doenças causadas por micobactérias, a identificação do perfil de susceptibilidade de MAC aos fármacos é essencial para o diagnóstico e o devido esquema terapêutico a ser empregado para o tratamento. Os isolados clínicos de MAC presentes neste estudo apresentaram diferentes perfis de suscetibilidade frente aos fármacos antimicrobianos. Sabendo que a maioria das espécies podem não responder aos antimicrobianos tradicionais, esquemas particulares são indicados em cada caso.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de AMK, RIF, MXF, CIP, CLA e LNZ para isolados clínicos do complexo *Mycobacterium avium* selecionados neste estudo.

Concentração Inibitória Mínima (ug/mL)						
Isolado clínico	AMK	RIF	MXF	CIP	CLA	LNZ

<i>M. avium</i> 1	0,5	8	0,06	0,125	256	32
<i>M. avium</i> 2	0,5	4	0,06	0,06	512	32
<i>M. avium</i> 4	0,5	8	0,25	0,06	256	16
<i>M. intracellulare</i> ODS	1	16	0,06	0,25	512	16

AMK: amicacina, RIF: rifampicina, MXF: moxifloxacino, CIP: ciprofloxacino, CLA: claritromicina, LNZ: linezolida.

CONCLUSÕES

Os isolados de MAC apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de micobacterioses. Para obter um panorama do perfil de susceptibilidade mais representativo, de bactérias desse Complexo (MAC), um estudo com um maior número de isolados clínicos e com perfis de resistência conhecidos se faz necessário.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

BUSATTO, C.; VIANNA, J. S.; DA SILVA, L. V.; RAMIS, I. B. *et al.* *Mycobacterium avium*: an overview. **Tuberculosis**, 114, p. 127-134, 2019.

CASTILHO, Aline Lemes *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.

CARAZO-FERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, C.; LÓPEZ-MEDRANO, R.; DIEZ-TASCÓN, C. *et al.* *Mycobacterium avium* complex infected cells promote growth of the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, 2022.

KIM, B.-G. *et al.* Treatment outcomes of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease according to disease severity. **Scientific Reports**, 12, n. 1, p. 1970, 2022.

HAJIKHANI, B *et al.* Clofazimine susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus*: a meta-analysis study. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, p. 188-193, 2021.