

RENATA GUSSON AGELUNE MARTINS

Avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* obtidos de amostras respiratórias de pacientes portadores de Fibrose Cística

**São Paulo
2011**

RENATA GUSSON AGELUNE MARTINS

Avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* obtidos de amostras respiratórias de pacientes portadores de Fibrose Cística

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública (PLSP).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Martins, Renata Gusson Agelune

Avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Achromobacter xylosoxidans* supsp. *xylosoxidans* obtidos de amostras respiratórias de pacientes portadores de fibrose cística. / Renata Gusson Agelune Martins, São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Doroti de Oliveira Garcia

- | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 2. Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> |
| 3. <i>Burkholderia gladioli</i> | 4. <i>Achromobacter denitrificans</i> |
| 5. Testes de sensibilidade microbiana | 6. Fibrose cística |

SES/CCD/CD-248/11

DEDICATÓRIA

Aos pacientes portadores de
Fibrose Cística, especialmente às
crianças que participaram deste estudo.

A seus pais, pelos quais nutro
especial admiração.

A todos aqueles que compreendem
o valor da Vida humana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela possibilidade de minha existência, de todos os professores e colegas conhecidos ao longo deste trabalho e, especialmente, de cada uma das crianças portadoras de Fibrose Cística envolvidas neste estudo e de seus pais.

Agradeço à Dra. Doroti de Oliveira Garcia por sua orientação durante este período, contribuindo com sua grande experiência, perícia e auxílio.

Agradeço aos pacientes e seus pais que com sua autorização tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Luis Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho pela parceria no projeto.

Agradeço às chefias e colegas do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pela amizade e auxílio prestado em tantas ocasiões.

Agradeço às chefias e colegas do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Santos, especialmente à Dra. Lilians Aparecida Zamarioli, por todo o cuidado, atenção e ajuda recebidos durante o período em que lá desenvolvi uma parte do estudo.

Agradeço à Dra. Elsa Masae Mamizuka, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela doação de alguns dos antimicrobianos utilizados neste estudo.

Agradeço ao Dr. Nilton Lincopan do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, à Dra. Maria Helena Matté, da Faculdade de Saúde Pública da USP e ao Dr. Nilton J. Fernandes Cavalcante do Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da SES-SP pela valiosa contribuição no exame de qualificação do mestrado.

Agradeço às colegas do Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da SES-SP, Dra. Ana Carolina Azzuz Chernishev e Cássia Rigueiro Saraiva, pela amizade, estímulo e auxílio em diversos momentos.

Agradeço à Vera Lúcia R. S. Figueiredo e demais colegas de trabalho do NAPS I de Santos, por toda a compreensão e auxílio sem os quais este trabalho não poderia ter sido concluído.

Agradeço ao Professor Me. Antonio Donato Paulo Rosa pela amizade, cuidado e por ter proporcionado o vislumbre de “novos horizontes”.

Agradeço aos meus pais Renato e Luci, sogros Norzi e Ivan (*in memoriam*), irmãs Fernanda e Caroline e cunhados Marcelo, Diogo, Laila e Sarita por sempre auxiliarem, de diversas formas, para que eu pudesse desempenhar todas as atividades necessárias para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos meus filhos Pedro, Letícia, Teresa e Paulo por serem crianças adoráveis e amorosas. Muitas vezes, quando o cansaço “batia à porta”, seus rostinhos sorridentes serviam de grande estímulo para continuar o desafio.

Agradeço ao meu marido, Felipe, pelo amor, dedicação, compreensão e auxílio. Sem sua ajuda eu não poderia chegar ao fim.

Finalmente, agradeço às demais pessoas que de modo direto ou indireto contribuíram para o início, desenrolar e conclusão deste trabalho.

A todos, minha imensa gratidão.

*“A perseverança é mais eficaz
do que a violência,
e muitas coisas que,
quando reunidas, são invencíveis,
cedem a quem as enfrenta
um pouco de cada vez”*

Vidas Paralelas de Homens Ilustres

Plutarco

(46-126 d.C.)

RESUMO

Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no canal de cloreto CFTR e caracterizada por uma extensa gama de sinais e sintomas clínicos. Devido a alterações na composição eletrolítica da camada de líquido periciliar, uma série de fatores converge para o estabelecimento de infecção e inflamação pulmonar crônicas. *Stenotrophomonas matophilia* (SM), Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Burkholderia gladioli* (Bg) e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Ax) são bacilos Gram-negativos não fermentadores frequentemente isolados de culturas de amostras respiratórias de pacientes com FC e intrinsecamente resistentes a diversas classes de antimicrobianos. O presente estudo buscou avaliar o perfil de sensibilidade destes microrganismos isolados de amostras respiratórias de pacientes fibrocísticos atendidos no Instituto da Criança do HC-FMUSP. Um total de 781 amostras foi obtido entre junho de 2003 a junho de 2004 e setembro de 2006 a setembro de 2007. Deste total, foram isoladas 57 cepas (7,3%) de SM (23 no primeiro e 34 no segundo períodos), 34 cepas (4,4%) de CBc (22 no primeiro e 12 no segundo períodos), 8 cepas (1%) de Bg (5 no primeiro e 3 no segundo períodos) e 23 (2,9%) de Ax (17 no primeiro e 6 no segundo períodos). Os isolados foram submetidos ao teste de disco-difusão (DD) frente a 22 antimicrobianos. A verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método da diluição em ágar e teste epsilométrico. Pesquisou-se, fenotipicamente, a produção de beta-lactamases do tipo Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e Metallo-Beta-Lactamase (MBL). Minociclina foi a droga mais ativa, inibindo 100% das cepas estudadas. Sulfametoxazol-trimetoprim ainda apresenta um bom desempenho contra SM, porém, verificou-se resistência de 10,5%. Levofloxacina inibiu 96% das cepas de SM. Piperacilina-tazobactam foi ativa contra 100% das cepas do gênero *Burkholderia* e Ax. Notou-se diferenças importantes entre CBc e Bg. O primeiro, intrinsecamente resistente aos aminoglicosídeos, e a segunda, 100% sensível à tobramicina. Observou-se, também, diferenças entre os

membros do CBc: *B. multivorans* apresentou 100% de resistência ao imipenem, enquanto *B. vietnamiensis* foi sensível a esta droga. Ao comparar-se os resultados obtidos pela CIM e DD, observou-se uma grande discrepância entre as duas técnicas, para a maioria das drogas testadas. Não foi evidenciada a produção de ESBLs e MBLs. Foram observadas variações do fenótipo de resistência em cepas isogênicas isoladas de pacientes cronicamente colonizados/ infectados pelas diferentes espécies avaliadas. O aparecimento de cepas resistentes aos poucos antimicrobianos disponíveis para uso clínico ainda eficazes reforça a necessidade de um contínuo monitoramento dos padrões de sensibilidade deste grupo específico de microrganismos colonizantes/ infectantes do trato respiratório de pacientes portadores de FC.

Descritores: *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, testes de sensibilidade microbiana, fibrose cística.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the CFTR chloride channel and characterized by a broad range of clinical signals and symptoms. As a consequence of electrolytical imbalance in the periciliary liquid layer a series of factors converge to the onset of chronic bacterial infection and concomitant airway inflammation. *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), *Burkholderia gladioli* (Bg) and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Ax) are non-fermentative gram-negative bacilli frequently recovered from respiratory tract samples of Cf patients and intrinsically resistant to diverse antimicrobial agents. The aim of the present study was to evaluate the susceptibility profiles of these microorganisms recovered from respiratory samples of CF patients attending the Pediatric Pulmonology Unit of the Instituto da Criança, University of São Paulo Medical School. A total of 781 samples were obtained from June 2003 to June 2004 and September 2006 to September 2007. From this total, 57 Sm isolates (7,3%) (6/2003–6/2004 = 23; 9/2006–9/2007 = 34), 34 Bcc isolates (4,4%) (6/2003-06/2004 = 22; 9/2006-9/2007 = 12), 8 Bg isolates (1%) (6/2003-6/2004 = 5; 9/2006–9/2007 = 3) and 23 Ax isolates (6/2003-6/2004 = 17; 9/2006–9/2007 = 6) were obtained. The isolates were tested for 22 antimicrobial agents using disk diffusion (DD) method. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was carried out using agar dilution and epsilometer test techniques. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and Metallo- β -lactamases (MBLs) were phenotypically searched using double-disk diffusion method. Minocycline was the most effective drug, inhibiting 100% of the isolates. Sulphamethoxazole-trimethoprim still showed a good effect against Sm, however 10,5% of the isolates presented resistance. Levofloxacin inhibited 96% of Sm isolates. Piperacillin-tazobactam inhibited 100% of Bcc, Bg and Ax isolates. Important differences between Bcc and Bg were found. The first, intrinsically resistant to aminoglycosides, the last, 100% susceptible to tobramycin. *Burkholderia multivorans* isolates were 100% resistant to imipenem while *Burkholderia vietnamiensis* was

susceptible. Discrepancies were noticed between the results obtained by CIM and DD techniques. ESBLs and MBLs were not phenotypically evidenced. Isogenic isolates obtained from chronically colonized/ infected patients showed phenotypical differences in the susceptibility profile for all the different species surveyed. The resistance rates found for the few antimicrobial agents still effective on this important group of microorganisms colonizing/ infecting CF patients, reinforce the need for a continuous *in vitro* monitoring of susceptibility profiles.

Key-words: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia gladioli*, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, antimicrobial susceptibility testing, cystic fibrosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC7	Proteína da família ABC “ATP-Binding Cassette” subfamília C7 (CFTR)
AD	Ágar-diluição
Agar SM	Meio de cultura seletivo para <i>S. maltophilia</i>
AMC	Amoxicilina/ ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATM	Aztreonam
BC	<i>Burkholderia cepacia</i> medium
BGN-NF	Bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose
CAZ	Ceftazidima
CDC	“Center for Disease Control”
CFTR	Regulador transmembrana de condutância da fibrose cística
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM₅₀	Concentração mínima necessária para inibir o crescimento de 50% dos microrganismos estudados
CIM₉₀	Concentração mínima necessária para inibir o crescimento de 90% dos microrganismos estudados
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DD	Disco-difusão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
FEP	Cefepima

GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
LEV	Levofloxacin
MBL	Metallo-Beta-Lactamase
MEM	Meropenem
MEVAG	Meio de estudo da via de ataque à glicose
MH	Minociclina
MPA	Ácido mercaptopropiônico
MSD1	Domínio "Membrane Spanning" 1
MSD2	Domínio "Membrane Spanning" 2
NaCl	Cloreto de sódio
NBD1	Domínio de Ligação ao Nucleotídeo-1
NBD2	Domínio de Ligação ao Nucleotídeo-2
NET	Netilmicina
PB	Polimixina B
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
PKA	Proteína Quinase A
PPT	Piperacilina/ tazobactam
R DOMAIN	Domínio regulatório
rpm	Rotações por minuto
SAM	Ampicilina/ sulbactam
STX	Sulfametoxazol/ trimetoprim
T	Transmitância
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TIC	Ticarcilina/ ácido clavulânico
TOB	Tobramicina
TSA	"Trypticase Soy Agar"
TSB	"Trypticase Soy Broth"
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema de classificação das β -lactamases	30-31
Quadro 2. Espécies pertencentes ao Complexo <i>B. cepacia</i> e referências bibliográficas	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupamento inicial para a identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.....	47
Tabela 2. Concentrações das soluções-estoque e respectivos intervalos testados pelo método de ágar-diluição	52
Tabela 3. Frequência de amostras de <i>S. maltophilia</i> (n=57) isoladas de pacientes portadores de fibrose cística, em dois períodos distintos, segundo as características de resistência aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.....	64
Tabela 4. Diferentes perfis de resistência, obtidos pela técnica de disco-difusão, de 57 cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística. São Paulo, 2003-2007	66
Tabela 5. CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e atividade de 9 antimicrobianos testados frente a 57 isolados de <i>S. maltophilia</i>	67
Tabela 6. Comparação do perfil de sensibilidade de 57 cepas de <i>S. maltophilia</i> obtido pela CIM e disco-difusão	68
Tabela 7. Frequência de amostras do Complexo <i>B. cepacia</i> (n=34) Isoladas de pacientes portadores de fibrose cística, em dois períodos distintos, segundo as características de resistência aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007 ...	73
Tabela 8. Diferentes perfis de resistência, obtidos pela técnica de disco-difusão, de 34 cepas do Complexo <i>B. cepacia</i> isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística.	

São Paulo, 2003-2007	75
Tabela 9. Perfil de crescimento de cepas do Complexo <i>B. cepacia</i> resistentes ao imipenem, em meio seletivo para <i>S. maltophilia</i>	76
Tabela 10. CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e atividade de 6 antimicrobianos testados frente a 34 isolados do Complexo <i>B. cepacia</i>	77
Tabela 11. Comparação do perfil de sensibilidade de 34 cepas do Complexo <i>B.cepacia</i> obtido pela CIM e disco-difusão	77
Tabela 12. Frequência de amostras de <i>B. gladioli</i> (n=8) isoladas de pacientes portadores de fibrose cística, em dois períodos distintos, segundo as características de resistência aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007	80
Tabela 13. Diferentes perfis de resistência, obtidos pela técnica de disco-difusão, de 8 cepas de <i>Burkholderia gladioli</i> isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística. São Paulo, 2003-2007	83
Tabela 14. CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e atividade de 5 antimicrobianos testados frente a 8 isolados de <i>Burkholderia gladioli</i>	83
Tabela 15. Comparação do perfil de sensibilidade de 8 ceoas de <i>B. gladioli</i> obtido pela CIM e disco-difusão	84
Tabela 16. Frequência de amostras de <i>A. xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i> (n=23) isoladas de pacientes portadores de fibrose cística, em dois períodos distintos, segundo as características de resistência aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.....	86

Tabela 17. Diferentes perfis de resistência, obtidos pela técnica de disco-difusão, de 23 cepas de <i>A. xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i> isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística. São Paulo, 2003-2007	88
Tabela 18. CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e atividade de 5 antimicrobianos testados frente a 23 isolados de <i>A. xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	89
Tabela 19. Comparação do perfil de sensibilidade de 23 cepas de <i>A. xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i> obtido pela CIM e disco-difusão	89
Tabela 20. Variação dos perfis de resistência obtido por diversos estudos realizados com cepas de <i>S. maltophilia</i> oriundas de amostras clínicas	95
Tabela 21. Variação dos perfis de resistência aos antimicrobianos obtidos por diversos estudos realizados com cepas do Complexo <i>B. cepacia</i> oriundas de amostras clínicas	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do <i>Regulador de Condutância Transmembrana da Fibrose Cística – CFTR (ABCC7)</i>	24
Figura 2. Acúmulo de muco nas vias aéreas inferiores, um dos fatores fisiopatológicos mais importantes na fibrose cística	25
Figura 3. Modelo esquemático do posicionamento dos discos de β -lactâmicos e inibidor de beta-lactamases (centro-a-centro), para detecção fenotípica de ESBLs	56
Figura 4. Modelo esquemático do posicionamento dos discos de antimicrobianos e agentes sequestrantes de íons (centro-a-centro), para pesquisa de MBLs	57
Figura 5. Perfil de sensibilidade de <i>S. maltophilia</i> obtido pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.....	65
Figura 6. Formação de halo de sinergismo (seta) entre os discos de Amoxicilina/ ácido clavulânico e Aztreonam, colocados a uma distância de 30 mm centro a centro	70
Figura 7. Perfil de sensibilidade do Complexo <i>B. cepacia</i> obtido pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007	74
Figura 8. Perfil de sensibilidade de <i>B. gladioli</i> obtido pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007	81
Figura 9. Comparação entre a sensibilidade do Complexo <i>B. cepacia</i> e <i>B. gladioli</i> frente a 22 antimicrobianos	82

Figura 10. Perfil de sensibilidade de *A. xylooxidans* subsp. *xylooxidans* obtido pelo método de disco - difusão. São Paulo, 2003-2007 **87**

ÍNDICE¹

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Fibrose Cística	23
1.2 Mecanismos de Resistência em Bacilos Gram-Negativos não Fermentadores	28
1.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	32
1.4 Gênero <i>Burkholderia</i>	35
1.5 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	39
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Amostras clínicas	45
3.2 Processamento e semeadura das amostras clínicas	46
3.2.1 Escarro	46
3.2.2 Secreção de orofaringe	47
3.3 Isolamento e identificação dos microrganismos	47
3.4 Determinação do perfil de sensibilidade pelo método de disco- difusão	48
3.4.1 Agentes antimicrobianos	49
3.4.2 Controle de qualidade	49
3.4.3 Preparo do inóculo bacteriano	49
3.4.4 Aplicação dos discos contendo antimicrobianos	50
3.4.5 Leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano...	50
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de ágar-diluição	51
3.5.1 Agentes antimicrobianos	51
3.5.2 Preparo das soluções-estoque	51
3.5.3 Diluição dos agentes antimicrobianos em placas de ágar Müller-Hinton	53

¹Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6027. Sumário. Rio de Janeiro. 1989. (Melo et al., 2005)

3.5.4	Controle de qualidade	53
3.5.5	Preparo do inóculo bacteriano	54
3.5.6	Aplicação das suspensões bacterianas nas placas de ágar	54
3.5.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	55
3.6	Verificação da Concentração Inibitória Mínima do sulfametoxazol-trimetoprim e ticarcilina-ácido clavulânico por método epsilométrico	55
3.7	Detecção fenotípica de Beta-Lactamases de Espectro Estendido	56
3.8	Detecção fenotípica de Metallo-beta-Lactamases	57
3.9	Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) para análise genotípica de <i>S. maltophilia</i> , Complexo <i>B. cepacia</i> e <i>A. xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	58
3.9.1	Preparo das amostras	58
3.9.2	Digestão das amostras de <i>S. maltophilia</i> , Complexo <i>B.</i> <i>cepacia</i> e <i>A. xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i> com enzimas de restrição	59
4	RESULTADOS	61
4.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	63
4.1.1	Disco-difusão	63
4.1.2	Concentração inibitória mínima	67
4.1.3	Pesquisa de Beta-Lactamases de Espectro Estendido e Metallo-beta-Lactamases	70
4.1.4	Eletroforese em Campo Pulsado	71
4.2	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	72
4.2.1	Disco-difusão	72
4.2.2	Concentração inibitória mínima	77
4.2.3	Pesquisa de Beta-Lactamases de Espectro Estendido e Metallo-beta-Lactamases	78
4.2.4	Eletroforese em Campo Pulsado	78
4.3	<i>Burkholderia gladioli</i>	79
4.3.1	Disco-difusão	79
4.3.2	Concentração inibitória mínima	83
4.3.3	Pesquisa de Beta-Lactamases de Espectro Estendido e Metallo-beta-Lactamases	84
4.3.4	Eletroforese em Campo Pulsado	84

4.4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	85
4.4.1	Disco-difusão	85
4.4.2	Concentração inibitória mínima	89
4.4.3	Pesquisa de Beta-Lactamases de Espectro Estendido e Metallo-beta-Lactamases	90
4.4.4	Eletroforese em Campo Pulsado	90
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÃO	105
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
	ANEXOS	127

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fibrose Cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética, de caráter recessivo, predominantemente encontrada em populações caucasianas de origem europeia. Manifesta-se como uma síndrome clínica, caracterizada por infecção sinopulmonar crônica, bem como por anormalidades gastrintestinais e nutricionais (Lyczak *et al.*, 2002).

A causa genética da FC é devida a mutações no gene que codifica a proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator*), uma proteína transmembrana, da superfamília das proteínas ABC (*ATP binding cassette*), responsável pelo transporte do íon cloreto através da membrana celular. Em 1989, o gene *cftr*, que encontra-se no cromossomo 7, foi identificado e clonado (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Romens *et al.*, 1989).

A proteína CFTR atua como um canal de cloreto de baixa condutância, sensível ao AMPc, sem preferência pela direção de transporte do ânion cloreto (Bear *et al.*, 1992). É composta por cinco domínios: dois domínios "*membrane-spanning*" (MSD1 e MSD2) que formam o canal iônico de cloreto; dois domínios "*nucleotide-binding*" (NBD1 e NBD2) que ligam e hidrolizam ATP e um domínio regulador (R) (Figura 1).

Dados recentes, obtidos do *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* (2010), indicam a detecção de 1717 mutações do gene *cftr*. A mais frequente, chegando a contabilizar 70% de todos os alelos mutantes, é denominada $\Delta F508$. Consiste na deleção do códon 508 que codifica para um resíduo de fenilalanina integrante do primeiro domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD-1) da proteína CFTR (Welsh, 1995). A proteína mutada deixa de ser expressa por não chegar ao estágio final de maturação e ser destruída por ação de proteases (Cheng, 1990; Gregory, 1991; Zhang *et al.*, 1998).

Das drogas testadas, a ticarcilina/ ácido clavulânico foi a que apresentou melhor desempenho, inibindo 63% das cepas. Contudo, a CIM₉₀ mostrou-se elevada: 256µg/ mL.

Comparando-se o perfil de sensibilidade de *S. maltophilia* obtido tanto pela CIM quanto pela disco-difusão, observou-se que apenas os aminoglicosídeos e a cefotaxima mantiveram uma certa concordância dos resultados. Os demais antimicrobianos apresentaram resultados discrepantes obtidos por uma técnica e outra (Tabela 6).

TABELA 6. Comparação do perfil de sensibilidade de 57 cepas de *S. maltophilia*, obtido pela CIM e disco-difusão.

ANTIMICROBIANO	RESULTADO (%)					
	Sensível		Intermediário		Resistente	
	CIM ¹	DD ²	CIM	DD	CIM	DD
CEFTAZIDIMA	23	25	9	0	68	75
CEFOTAXIMA	0	5	12	9	88	86
CEFEPIMA	5	26	12	9	83	65
CLORANFENICOL	40	61	42	32	18	7
AMICACINA	12	10	4	2	84	88
GENTAMICINA	5	7	7	2	88	91
TOBRAMICINA	7	5	4	4	89	91
CIPROFLOXACINA	28	42	32	32	40	26
TICARCILINA/ AC ³	63	51	21	0	16	49

¹CIM: concentração inibitória mínima; ²DD: disco-difusão; ³AC: ácido clavulânico

Um total de 20 cepas (35%) apresentou resistência à polimixina B no teste de disco-difusão. Tais cepas foram então submetidas ao teste de ágar-diluição e confirmou-se sua resistência a esta droga, sendo que destas, quatro cepas (20%) apresentaram uma alta resistência, com CIM de 256 µg/mL.

Seis cepas apresentaram halo inibitório de 6 mm frente ao sulfametoxazol-trimetoprim pelo método de disco-difusão. Ao serem submetidas ao método epsilométrico, todas apresentaram uma CIM



Figura 2. Acúmulo de muco nas vias aéreas inferiores, um dos fatores fisiopatológicos mais importantes na fibrose cística.

Fonte: <http://www.mdconsult.com>

Dados da *Cystic Fibrosis Foundation* (2009) revelam que nos Estados Unidos a prevalência da FC no ano de 2008 foi de aproximadamente 25.600 casos, com uma incidência de 1006 casos no mesmo ano. No Canadá, dados do relatório anual mais recente (2007) mostram uma prevalência de aproximadamente 3270 casos, com incidência de 80 novos casos.

No Brasil, a inexistência de um centro de referência nacional responsável pela obtenção, análise e divulgação de dados dos diversos centros de referência existentes no país, dificulta a obtenção de informações precisas e condizentes com a atual realidade da FC no país.

No Rio de Janeiro, Cabello *et al.* (1999), trabalhando com duas populações distintas desta cidade, uma composta por 44 indivíduos fibrocísticos, e outra composta por indivíduos não portadores de FC, estimaram uma incidência da doença de aproximadamente 1/ 6900 indivíduos.

Um outro estudo analisou a incidência da FC em populações de origem europeia e africana dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. Apesar dos resultados demonstrarem

que a incidência da doença em diferentes partes do país pode diferir em quase vinte vezes (de 1/ 32258 nascidos vivos em São Paulo, para 1/ 1587 no Rio Grande do Sul), para os cinco estados como um todo, a incidência para os descendentes europeus foi de 1/ 7576 (Raskin *et al.*, 2008).

Um estudo coorte que analisou a média de sobrevida de pacientes fibrocísticos atendidos no Hospital Geral da Universidade Federal de Minas Gerais entre os anos de 1972 e 1994 revelou que tais pacientes sobreviviam, em média, 12,6 anos. Nos países desenvolvidos, essa média já havia sido atingida na década de 1970. Os autores sugerem que problemas relacionados à organização do sistema de saúde e más condições sócio-econômicas nos países em desenvolvimento podem afetar diretamente a expectativa de vida dos pacientes (Reis *et al.*, 1998).

Um estudo retrospectivo no qual foram acompanhados 104 pacientes atendidos em um centro de referência em Campinas/SP, revelou uma média de sobrevida, após o diagnóstico, de 18 anos e 4 meses (Alvarez *et al.*, 2004).

Devido às alterações na capacidade em manter um fluxo constante de muco através do epitélio pulmonar, as vias aéreas dos pacientes fibrocísticos são colonizadas muito cedo com bactérias, e uma vez estabelecida a infecção, essa é raramente erradicada. *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* são geralmente os primeiros organismos detectados (Gilligan, 1999).

Com o progresso da doença pulmonar, *Pseudomonas aeruginosa* é geralmente o único organismo isolado do escarro, e pode apresentar-se com diferentes fenótipos coloniais, geralmente com diferentes padrões de sensibilidade aos antimicrobianos. Tipicamente, um desses fenótipos é o mucoide, devido à produção de grandes quantidades de alginato, um exopolissacáride. (Costerton *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, outras espécies têm sido isoladas de maneira cada vez mais frequente dos pulmões de pacientes com FC, particularmente Complexo *Burkholderia cepacia*. Este organismo tem-se tornado prevalente em alguns centros de cuidado a pacientes fibrocísticos e são particularmente

de difícil tratamento por sua resistência natural à maioria dos antimicrobianos disponíveis. Outros Gram-negativos podem encontrar-se presentes no escarro, incluindo *Escherichia coli* mucoide, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp e *Achromobacter xylosoxidans* (Boucher, 2005).

Em 2008, nos Estados Unidos, dados da Cystic Fibrosis Foundation revelaram que 52,5% das culturas bacterianas obtidas do trato respiratório de pacientes fibrocísticos foram positivas para *P. aeruginosa*, 2,8% para complexo *B. cepacia* e 12,5% para *S. maltophilia*. Não existem, para esse período, dados referentes à positividade de *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*.

Dados brasileiros obtidos de um centro de referência do município de Campinas/SP (2004) revelaram uma taxa de 80,2% de colonização pulmonar por *S. aureus*, 70,6% por *P. aeruginosa* e 5,2% por *B. cepacia* (Alvarez *et al.*, 2004).

Paschoal *et al.* (2007), estudando uma população de pacientes fibrocísticos adultos (média de idade de 41,8 anos), também do município de Campinas, atendidos pelo Serviço de Doenças Pulmonares do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual deste município relataram uma taxa de colonização de 48% por *P. aeruginosa*, 28% por *S. aureus*, 9% por *S. maltophilia* e 2% por *B. cepacia*.

Souza *et al.* (2006), estudando a dinâmica da colonização das vias aéreas de uma população de 25 crianças diagnosticadas com FC pelo teste de triagem neonatal e atendidas no Ambulatório Clínico de FC do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, observaram que 76% dos pacientes estavam colonizados por *S. aureus*, sendo este microrganismo o primeiro patógeno a ser isolado em 72% dos pacientes. *H. Influenzae* também foi isolado em 76% dos pacientes, sendo o primeiro patógeno isolado em 40% dos pacientes (quatro pacientes apresentaram colonização concomitante por *S. aureus* e *H. influenzae*). *P. aeruginosa* foi isolada em 36% dos pacientes, sendo o primeiro patógeno isolado em 8% deles. *B. cepacia* foi isolada em apenas 01 paciente (4%), mas não como o primeiro

patógeno isolado. *S.maltophilia* e *A. xylosoxidans* não foram isolados em nenhuma amostra analisada.

No Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Chernishev *et al.* (2008) relataram uma taxa de 72,5% de colonização do trato respiratório por *P. aeruginosa*, 83,2% por *S. aureus*, 5,9% por Complexo *B. cepacia*, 1,3% por *Burkholderia gladioli*, 5,9% por *S. maltophilia* e 4,4% por *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*.

Em um estudo anterior, também desenvolvido no Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP, da Silva Filho *et al* (2004) relataram uma taxa de isolamento de 56% para *P. aeruginosa*, 45,9% para *S. aureus*, 4,3% para o Complexo *B. cepacia* e 2,7% para *S. maltophilia*.

1.2 Mecanismos de Resistência em Bacilos Gram-Negativos não Fermentadores

As bactérias Gram-negativas possuem um arsenal de mecanismos de resistência que lhes permite inibir a ação dos antimicrobianos em geral, e particularmente carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos. Mutações em proteínas da membrana externa e bombas de efluxo, que levam, respectivamente, à falta de penetração e à expulsão da droga, além da produção aumentada de beta-lactamases do tipo AmpC e/ou que hidrolizam carbapenêmicos são as formas mais comuns de resistência. As serinoenzimas, que são beta-lactamases que possuem resíduo de serina em seu sítio ativo, e as metalo-beta-lactamases (MBLs), que requerem geralmente o zinco como cofator em seu sítio ativo, são dois tipos de beta-lactamases capazes de hidrolisar os carbapanêmicos (Bush, 1999; Bush, 2001) (Quadro 1).

Um grupo especial de beta-lactamases denominado *Extended-spectrum beta-lactamases* (ESBLs), em português, beta-lactamases de espectro estendido, desempenha um papel importante na resistência aos

antimicrobianos em Gram-negativos. ESBLs são beta-lactamases capazes de conferir resistência bacteriana às penicilinas, cefalosporinas de primeira à quarta gerações e aztreonam, mas não às cefamicinas e carbapenêmicos e são inibidas pelos inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico.

As principais famílias de ESBLs são denominadas:

- 1) TEM (identificada em uma cepa de *E. coli* isolada de uma paciente grega chamada **Temoneira**) (Datta *et al.*, 1965).
- 2) OXA (ativa frente a **oxacilina**) (Hedges *et al.*, 1974; Matthew *et al.*, 1976).
- 3) SHV (**sulphydryl variable**) (Matthew *et al.*, 1979).
- 4) CTX-M (devido sua potente ação frente a **cefotaxima** e inicialmente isolada em **Munique**) (Bauernfeind *et al.*, 1990).
- 5) PER (***Pseudomonas extended resistant***) (Nordmann *et al.*, 1993).
- 6) VEB (**Vietnamese ESBL** identificada de *E. coli* isolada de uma criança do Vietnã) (Poirel *et al.*, 1999).
- 7) GES (**Guiana extended-spectrum**) (Poirel *et al.*, 2000).
- 8) BES (**Brazil extended-spectrum**) (Bonnet *et al.*, 2000)

Quadro 1. Classificação das β -lactamases.

B-LACTAMASES				
Classificação BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995		Classificação AMBLER, 1989	CARACTERÍSTICAS	Representantes
Grupo Funcional	Subgrupos maiores	Classe molecular		
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenêmicos. Não são inibidas pelo ác. clavulânico	MIR-1, ACT-1, FOX
2	Inibidas pelo Ácido Clavulânico			
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina.	Penicilinas de Gram-positivas
	2b	A	β -lactamases de amplo espectro de bactérias Gram-negativas	TEM-1, SHV-1
	2be	A	β -lactamases de espectro estendido, conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (ESBLs)	ESBL
	2br	A	β -lactamases resistentes aos inibidores de β -lactamases	Enzimas derivadas da TEM (IRT) e uma enzima derivada de SHV
	2c	A	Enzimas que hidrolisam carbenicilina	PSE
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina), possuem pouco efeito contra carbenicilina. São levemente inibidas pelo ác. clavulânico	Oxacilinas
	2e	A	Cefalosporinas que podem hidrolisar os monobactâmicos.	-
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos. Possuem uma serina no seu sítio ativo	SME, KPC

Continua

Continuação

3	3a, 3b, 3c	B	Conferem resistência aos carbapenêmicos e todos os tipos de β -lactâmicos com exceção de monobactâmicos. Não são inibidas pelo ác. clavulânico. São zinco-dependentes e são inibidas por EDTA	Metallo-beta-lactamases
4		ND	Penicilinases miscelâneas não sequenciadas, não categorizadas em nenhum dos grupos detalhados. Não são inibidas pelo ác. clavulânico	-

Fonte: Adaptado de BUSH & JACOBY, 2010; ND: Não determinadas.

As MBLs são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, mas não o aztreonam. Não são inibidas por inibidores de beta-lactamases, mas são inibidas por agentes quelantes de zinco, tais como EDTA, ácido mercapto propiônico e ácido mercapto acético, e podem ser divididas em cromossomais e codificadas em genes transferíveis (Bush *et al.*, 1995). As principais famílias de MBLs são:

- 1) IMP (**I**mipenemase) (Osano *et al.*, 1994).
- 2) VIM (**V**erona **i**mipenemase) (Lauretti *et al.*, 1999).
- 3) SPM (**S**ao **P**aulo **M**etallo-beta-lactamase) (Toleman *et al.*, 2002).
- 4) GIM (**G**erman **i**mipenemase) (Castanheira *et al.*, 2004).
- 5) SIM (**S**eoul **i**mipenemase) (Lee *et al.*, 2005).
- 6) NDM (**N**ew **D**elhi **m**etallo-beta-lactamase) (Yong *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos sobre MBLs cromossomais focaram-se em *Bacillus cereus* (BC II) (Lim *et al.*, 1988) e *S. maltophilia* (L1) (Walsh, *et al.*, 1994). Nos últimos anos, porém, muitos tipos de MBLs transferíveis têm sido estudados e parecem ter a capacidade de se espalhar de forma muito rápida. Acredita-se que a disseminação de genes que codificam MBLs deva-

se ao uso regional de cefalosporinas de amplo espectro ou carbapenêmicos (Lombardi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003).

As MBLs codificadas em genes transferíveis foram primeiramente detectadas no final da década de 1980 em *P. aeruginosa* isolada no Japão (Watanabe *et al.*, 1991), e desde a metade da década de 1990 têm sido observadas em vários países. Até o momento, *P. aeruginosa* tem sido a maior produtora de tais enzimas, contudo seus genes podem difundir-se efetivamente para outras bactérias Gram-negativas.

Um estudo realizado no Brasil por Gales e colaboradores (2003) com 43 cepas de *P.aeruginosa* resistentes ao imipenem e meropenem revelou que aproximadamente 34% das cepas isoladas de ambiente nosocomial possuíam MBL do tipo SPM-1. Já outro estudo brasileiro detectou 57% de produção de SPM-1 em 51 cepas de *P.aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de amostras clínicas (Doi *et al.*, 2007).

1.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia foi isolada pela primeira vez em 1958 por Hugh e Leifson (1963), em uma cultura de orofaringe de um paciente com carcinoma oral, sendo descrita inicialmente como *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Ryschenkow, 1960; Hugh & Ryschenkow, 1961). Uma nova classificação foi proposta por Swings *et al.* (1983), passando a ser denominada *Xanthomonas maltophilia*.

Estudos posteriores utilizando técnicas de hibridização, análise de ácidos graxos e da poliamina levaram a uma outra classificação taxonômica (De Vos & De Ley, 1983; Oyiazu & Komagata, 1983; Yang *et al.*, 1993). Foi proposto então um novo gênero denominado *Stenotrophomonas* (*stenos*, grego: limitado; *trophos*, grego: que alimenta-se; *monas*, grego: uma unidade; i.e., uma unidade que se alimenta de poucos substratos) (Palleroni & Bradbury, 1993). Nesme *et al.*, (1995) utilizando a amplificação do gene

16S rRNA confirmaram a diferenciação entre *S. maltophilia* e membros do gênero *Xanthomonas*.

O habitat de *S. maltophilia* é bastante diversificado, já tendo sido isolada de rios (Nakatsu *et al.*, 1995), garrafas de água (Hernandez-Duquino & Rosenberg, 1987), esgotos (Aznar *et al.*, 1992), diversos tipos de solos (Bollet *et al.*, 1995) e plantas como capim, cana de açúcar e palmeiras (Juhnke & Des Jardim, 1989). Em adultos saudáveis e portadores de câncer já foi isolada de orofaringe, mãos e fezes (Khardori *et al.*, 1990; Rosenthal, 1974).

Frederiksen *et al.* (1975) relataram o primeiro caso de isolamento de *S. maltophilia* do trato respiratório de pacientes com FC. A prevalência desse microrganismo em pacientes fibrocísticos aumentou de < 2% em 1975, para 19% em 1993 na Dinamarca (Frederiksen *et al.*, 1995); de 0% em 1983 para 10% em 1990 em um centro britânico (Gladman *et al.*, 1992); em 1996, em outro centro britânico, a prevalência foi de 19% (Denton *et al.*, 1996); em um centro espanhol, ultrapassou 30% (Ballesteros, *et al.*, 1995). Nos Estados Unidos, a prevalência tem sido geralmente menor, alcançando em 2008, a marca de 12,5% (Cystic Fibrosis Foundation, 2009).

Apesar de não serem claras as razões que contribuem para esse aumento da prevalência, um estudo sugeriu que a quantidade de antibióticos anti-pseudomonas com os quais são tratados os pacientes com FC, unida à duração da hospitalização, são importantes fatores de risco (Gladman *et al.*, 1992).

S. maltophilia é resistente a muitos dos agentes antimicrobianos de amplo espectro disponíveis atualmente, particularmente aos β -lactâmicos. Inicialmente, acreditava-se que a resistência a tais agentes fosse conferida por duas β -lactamases cromossômicas, designadas L1 e L2 (Saino *et al.*, 1982; Saino *et al.*, 1984). A primeira, produzida por virtualmente todas as cepas selvagens (Payne *et al.*, 1994), pertence à família das metaloenzimas, embora a sequência de aminoácidos apresente grandes diferenças quando comparada a outras enzimas pertencentes a essa classe, tais como as β -lactamases produzidas por *Aeromonas hydrophila* e *Bacillus cereus* (Felici *et*

al, 1993; Walsh *et al*, 1994). Essas enzimas são dependentes de zinco (Zn^{2+}) em seu sítio ativo. Têm sido objeto de maior atenção, contudo, por causa da sua capacidade em hidrolisar carbapenêmicos, como o imipenem e o meropenem. Não são sensíveis aos inibidores de β -lactamases, tais como o clavulanato, e Payne *et al*. (1997) relataram a inibição de L1 e outras metalo- β -lactamases por derivados do ácido mercaptoacético.

Diferentemente de L1, L2, que existe como um dímero em seu estado nativo, é uma enzima com um sítio ativo contendo serina. Ela exhibe principalmente atividade de cefalosporinase, mas também hidrolisa o aztreonam (Saino *et al*, 1984). É sensível aos inibidores de β -lactamases, o que a difere de L1.

Apesar de serem beta-lactamases cromossomais, Avison *et al*. (2001) reportaram a presença dos genes I_1 e I_2 em um plasmídeo de aproximadamente 200 kb encontrado em dez cepas de *S. maltophilia* isoladas de amostras clínicas. A localização dos genes de tais enzimas em um plasmídeo torna mais provável sua disseminação para outras bactérias Gram-negativas.

A existência de outras β -lactamases produzidas por *S. maltophilia* foi primeiramente sugerida por Cullman & Dick (1990), que descreveram a presença de seis enzimas diferentes em vinte cepas de origem clínica. Relatos posteriores confirmaram a heterogeneidade da produção de β -lactamases por *S. maltophilia*, sendo tais enzimas categorizadas como serino-enzimas ou metaloenzimas (Paton *et al*, 1994). Uma diminuição da difusão de penicilinas e cefalosporinas através da membrana celular bacteriana tem sido também sugerida como um fator contribuinte para a resistência a tais compostos. (Cullmann, 1999; Mett *et al*, 1988).

Garcia *et al*. (2002) relataram sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim em 100% das 46 *S. maltophilia* isoladas de diversas amostras clínicas em hospitais da cidade de São Paulo.

Um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no qual os autores analisaram 60 casos de infecções severas por *S. maltophilia* demonstrou que, de 18

amostras submetidas ao teste de sensibilidade por disco-difusão, 25% apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes contra este microrganismo (Paez *et al.*, 2008a).

Os mesmos autores realizaram uma revisão sistemática da literatura sobre os fatores de risco associados com mortalidade em infecções causadas por *S. maltophilia*. Os trabalhos revisados sugerem que infecções causadas por *S. maltophilia* provocam elevada taxa de mortalidade e que os fatores de risco associados relacionam-se com a condição clínica inicial e com o tipo de paciente. Em pacientes com infecção de corrente sanguínea e pneumonia, os fatores de risco associados com o prognóstico são: choque séptico, trombocitopenia e índice APACHE (*Acute Physiological Assessment and Chronic Health Evaluation*) maior que 15 (Paez *et al.*, 2008b).

Gasparetto *et al.* (2007) relataram um caso de pneumonia por *S. maltophilia* seguida a um transplante de medula óssea. A paciente era uma criança do sexo feminino, de 6 anos de idade, que apresentou rápido declínio clínico com insuficiência respiratória e óbito.

Souza Dias *et al.* (2008) relataram um surto de infecção hospitalar no município de São Paulo/ SP causado por *Pseudomonas putida* e *S. maltophilia* contaminando uma solução de heparina em catéteres implantados de longa permanência. Devido sua alta resistência a diversos agentes antimicrobianos e sanitizantes, *S. maltophilia* é um significativo agente de infecções hospitalares.

1.4 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* compreende mais de 30 espécies distribuídas em diversos nichos ecológicos: de plantas e animais ao ser humano e ambientes hospitalares (Coenye & Vandamme, 2003).

Descrita por Burkholder (1950), *Pseudomonas cepacia* era conhecida como um fitopatógeno responsável pelo apodrecimento do bulbo de cebola,

causando uma enfermidade chamada “pele áspera”. Em 1992, *P. cepacia* e outras seis espécies pertencentes ao grupo II de homologia do rDNA do gênero *Pseudomonas* (*Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas picketti*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei* e *Pseudomonas caryophylli*) (Palleroni *et al.*, 1973) foram transferidas para o novo gênero *Burkholderia* e *B. cepacia* passou então a ser designada a espécie-tipo do gênero (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Entretanto, Vandamme *et al.* (1997) demonstraram que os isolados inicialmente classificados como *B. cepacia* eram compostos por pelo menos 5 espécies distintas, denominadas de genomovares (espécies genômicas). Genomovar é um termo utilizado para denotar grupos genômicos distintos com fenótipos similares (Ursing, 1995).

A este grupo de diferentes espécies genômicas denominou-se Complexo *Burkholderia cepacia* que, atualmente, compreende ao menos 17 espécies (Quadro 2).

Na década de 1980 foi relatada uma epidemia infecciosa por Complexo *B. cepacia* em pacientes fibrocísticos, sendo notada uma alta taxa de mortalidade. Uma análise posterior, na década de 1990 de 124 pacientes infectados por Complexo *B. cepacia* e controles sadios de mesma idade e sexo mostrou uma taxa de mortalidade significativamente maior no primeiro ano seguido à detecção da colonização por Complexo *B. cepacia* (Lewin *et al.*, 1990).

Em 1992, Gladman *et al.* relataram que um número grande de pacientes com FC estava colonizado com Complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia* (Gladman *et al.*, 1992). Tais autores referiram uma propensão para a coinfeção com *P. aeruginosa* na população de pacientes estudada. Whiteford *et al.* (1995) também demonstraram que esta coinfeção piorava o prognóstico clínico quando comparada com a infecção exclusiva por *P. aeruginosa*.

Complexo *B. cepacia* é capaz de invadir o epitélio das vias aéreas (Burns *et al.*, 1996), o que tem sido considerada uma explicação para sua

Quadro 2 - Espécies pertencentes ao complexo *B. cepacia* e referências bibliográficas.

Microrganismo	Referências bibliográficas
<i>B. cepacia</i>	Vandame <i>et al.</i> (1997)
<i>B. multivorans</i>	Vandame <i>et al.</i> (1997)
<i>B. cenocepacia</i>	Vandame <i>et al.</i> (1997)
<i>B. stabilis</i>	Vandame <i>et al.</i> (1997)
<i>B. vietnamiensis</i>	Gillis <i>et al.</i> (1995); Vandame <i>et al.</i> (1997)
<i>B. dolosa</i>	Vermis <i>et al.</i> (2004)
<i>B. ambifaria</i>	Coenye <i>et al.</i> (2001)
<i>B. anthina</i>	Vandame (2002)
<i>B. pyrrocinia</i>	Vandame (2002)
<i>B. ubonensis</i>	Coenye & Vandame (2003); Vanlaere (2008)
<i>B. latens</i>	Vanlaere (2008)
<i>B. diffusa</i>	Vanlaere (2008)
<i>B. arboris</i>	Vanlaere (2008)
<i>B. seminalis</i>	Vanlaere (2008)
<i>B. metallica</i>	Vanlaere (2008)
<i>B. contaminans</i>	Vanlaere (2009)
<i>B. lata</i>	Vanlaere (2009)

grande resistência aos antimicrobianos e sua habilidade em causar bacteremia disseminada. Além do mais, como já citado, trata-se de um microrganismo intrinsecamente resistente a vários antibióticos. Essa resistência intrínseca parece requerer a presença de uma porina bacteriana de 30-kDa, e anticorpos específicos contra esta porina correlacionam-se com um bom prognóstico (Burnie *et al.*, 1995).

Todos os membros do complexo *B. cepacia* são intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos e à polimixina B (Moore *et al.*, 1986). A taxa de resistência *in vitro* aos beta-lactâmicos, com exceção do meropenem, também é bastante alta (Aaron *et al.*, 2000; Lewin *et al.*, 1993). As quinolonas parecem ter uma atividade variável, mas a resistência pode ser facilmente induzida (Lewin *et al.*, 1993).

Os perfis de sensibilidade de cepas isoladas de pacientes com FC diferem daqueles observados em cepas de pacientes não fibrocísticos, uma vez que os primeiros recebem múltiplas administrações de antibióticos, seja por via oral, intravenosa ou aerossóis. Zhou *et al.*, (2007) do Centro de Referência de FC nos Estados Unidos, avaliaram aproximadamente 2600 cepas do Complexo remetidas durante 9 anos por 150 centros de FC espalhados por todo o país e relataram uma taxa de 18% de resistência aos 18 antimicrobianos testados, incluindo altas doses de tobramicina (256 µg/mL).

Em 2004, da Silva Filho *et al.*, publicaram um trabalho no qual foi avaliada a identificação de *P. aeruginosa*, Complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*, diretamente em amostras respiratórias, através da técnica de Multiplex-PCR. Foram utilizados três pares de iniciadores para sequências genômicas específicas de cada espécie. Comparada à cultura, a técnica de Multiplex-PCR apresentou especificidade de 45,5% para *P. aeruginosa* e sensibilidade de 45,5% para Complexo *B. cepacia* e 40% para *S. maltophilia*.

Um estudo realizado com pacientes portadores de FC atendidos no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, demonstrou uma maior prevalência da espécie genômica *B. cenocepacia* (53,1%), seguida por *B. multivorans* (37,5%), *B. vietnamiensis* (6,3%) e *B. cepacia* (3,1%) (Martins *et al.*, 2008).

Martins *et al.* (2010), avaliando um surto hospitalar de infecção de corrente sanguínea por Complexo *B. cepacia* ocorrido no Rio de Janeiro/ RJ, concluíram que a fonte do microrganismo se encontrava em frascos de bromoprida injetável contaminados. Por sua alta resistência a antimicrobianos e sanitizantes, Complexo *B. cepacia* torna-se um importante e significativo agente em infecções hospitalares.

B. gladioli, antigamente *Pseudomonas marginata* e *P. gladioli*, foi primeiramente designada como um fitopatógeno de espécies de gladiolos e íris (Palleroni, 1970). Christenson *et al.* (1989) foram os primeiros autores a relatarem a colonização de pacientes portadores de FC por este

microrganismo. Desde então, diversos relatos de caso vêm destacando morbidade relacionada à infecção por *B. gladioli*.

Murray *et al.* (2008) demonstraram que pacientes fibrocísticos com cultura positiva para *B. gladioli* apresentaram maior taxa de mortalidade pós-transplante pulmonar do que pacientes positivos para *B. multivorans* ou não infectados. Entretanto, a causa da morte não foi especificada.

Kennedy *et al.* (2007) realizando estudo retrospectivo em um Centro de FC nos Estados Unidos, relataram que entre 1999 e 2006, 4,2 % dos pacientes fibrocísticos apresentaram cultura de escarro positiva para *B. gladioli*. Diferentemente do Complexo *B. cepacia*, os autores referiram uma pan-sensibilidade aos antimicrobianos anti-pseudomonas em cerca de dois-terços das cepas estudadas. Como característica do gênero *Burkholderia*, *B. gladioli* é intrinsecamente resistente à polimixina B.

1.5 *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*

Atualmente, o gênero *Achromobacter* é constituído pelas espécies *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans*, *A. piechaudii*, *A. rulhandii*, *A. insolitus* e *A. spanius*.

A. xylosoxidans subsp. *xylosoxidans* está distribuído em diversos ecossistemas naturais e associado a várias doenças relacionadas à infecção nosocomial, incluindo bacteremia, meningites, pneumonia e peritonites (Legrand *et al.*, 1992; Duggan *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002)

A. xylosoxidans é um patógeno encontrado de forma não infrequente em culturas orofaríngeas de pacientes fibrocísticos (Burns *et al.*, 1998), mas seu isolamento ainda não possui um claro significado clínico (Lyczak *et al.*, 2002).

Tan *et al.* (2002) em estudo retrospectivo de caso controle com 557 pacientes com FC, mostraram que os pacientes cronicamente infectados por *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* não apresentaram declínio e

deterioração da função pulmonar mais intensos do que os apresentados por pacientes colonizados apenas por *P. aeruginosa*.

A. xylosoxidans subsp. *xylosoxidans* é frequentemente isolado em associação com outras espécies, tais como complexo *B. cepacia* (Blecker-Shelly *et al.*, 2000; McMEnamin *et al.*, 2000). Infecção com essas espécies está associada a um significativo aumento da morbidade e mortalidade em pacientes com FC, e com difícil controle da infecção (LiPuma, 1998).

A. xylosoxidans subsp. *xylosoxidans* é frequentemente resistente a diversos antibióticos, tais como aminoglicosídeos, ampicilina, cefalosporinas de espectro estendido, cloranfenicol, carbapenêmicos e fluorquinolonas, que são normalmente administrados no tratamento da infecção pulmonar em pacientes com FC (Spangler *et al.*, 1996; Kanellopoulou *et al.*, 2004)

O gene *bla*_{IMP} foi detectado em *A. xylosoxidans*, pela primeira vez, em duas cepas isoladas de amostras clínicas obtidas em um hospital japonês (Senda *et al.*, 1996). Na Itália, Riccio *et al.* (2001) relataram a presença do gene *bla*_{VIM-1} em um integron classe 1 presente em uma cepa de *A. xylosoxidans* isolada de amostra urinária.

Shin *et al.* (2005), estudaram sete cepas de *A. xylosoxidans* resistentes ao imipenem, isoladas de pacientes hospitalizados na unidade de terapia intensiva de um hospital coreano, durante os anos de 2001 a 2003. Após a análise das cepas, encontraram, em todas, a produção de β -lactamases dos tipos VIM-2, OXA-30 e AmpC cromossomal. Os antibiogramas de todas as cepas apresentaram um perfil semelhante, com resistência a todos os aminoglicosídeos testados, bem como a beta-lactâmicos incluindo imipenem. Esse trabalho relatou o primeiro caso de VIM-2 em *A. xylosoxidans*.

Neuwirth *et al.* (2006), relataram a produção de VEB-1, uma β -lactamase de espectro estendido (ESBL) obtida de uma cepa de *A. xylosoxidans* isolada em novembro de 2003, a partir do escarro de um paciente de 17 anos de idade, portador de FC. O antibiograma, realizado pelo método de disco-difusão, revelou que a cepa era altamente resistente à ceftazidima, aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimetoprim e ciprofloxacina,

mas totalmente sensível às tetraciclinas, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ác. clavulânico e iminepem. Esse trabalho relatou o primeiro caso de resistência à cefalosporinas de amplo espectro mediada por ESBLs em *A. xylosoxidans* isolado de pacientes fibrocísticos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os perfis de sensibilidade de *S. maltophilia*, Complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* e *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* isolados de amostras respiratórias de pacientes portadores de fibrose cística, frente a diversos antimicrobianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar teste de sensibilidade a antimicrobianos através do método de disco-difusão (Bauer-Kirby).
2. Verificar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antimicrobianos através da técnica de ágar-diluição ou teste epsilométrico.
3. Verificar, fenotipicamente, a produção de β -lactamases de espectro estendido e metalo- β -lactamases em cepas do Complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* e *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*.
4. Verificar a persistência ou não do mesmo clone bacteriano ao longo do tempo pela técnica de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE) e co-relacionar com os perfis de sensibilidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Amostras clínicas de escarro e secreção de orofaringe de pacientes portadores de fibrose cística atendidos no Ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança “Professor Pedro de Alcântara” do HC-FMUSP foram obtidas em dois períodos distintos. O primeiro, de junho de 2003 a junho de 2004, resultou em 415 amostras (170 secreções orofaríngeas e 245 escarros) oriundas de 113 pacientes com idade entre 6 meses e 20 anos (média de 9,7 anos), sendo 58 do sexo feminino e 55 do sexo masculino. O segundo período, compreendido entre setembro de 2006 a setembro de 2007, resultou em 366 amostras (193 secreções orofaríngeas e 173 escarros) obtidas de 110 pacientes com idade entre 10 meses e 20 anos (média de 9,8 anos), sendo 55 do sexo feminino e 55 do sexo masculino. Desta forma, durante todo o período abrangido pelo estudo, obteve-se um total de 781 amostras clínicas obtidas de 151 pacientes.

As amostras foram colhidas dos pacientes após consulta médica, no período matutino. O número de amostras por paciente variou de 1 a 12, (média de 3,6 no primeiro e 3,4 no segundo períodos) conforme o número de consultas médicas realizadas durante todo o período do estudo.

O material de preferência foi o escarro, porém, na impossibilidade de obtê-lo, swabs de algodão estéreis foram utilizados para coleta de secreção orofaríngea. Os escarros foram armazenados em frascos coletores estéreis; os swabs contendo a secreção orofaríngea, colocados em meio de transporte. Ao fim das coletas, os materiais foram enviados à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, acondicionados em caixa térmica refrigerada.

Em relação às amostras obtidas no primeiro período, foram utilizadas as cepas bacterianas estocadas a -70°C e/ou liofilizadas.

3.2 PROCESSAMENTO E SEMEADURA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

O processamento das amostras foi realizado no mesmo dia de sua obtenção. Inicialmente, procedeu-se o registro manual dos dados relativos ao paciente, tais como idade, sexo, data da coleta da amostra e tipo de material colhido (escarro ou secreção orofaríngea).

3.2.1 ESCARRO

Para o isolamento dos microrganismos estudados foram utilizados três meios de cultura: Ágar MacConkey, meio seletivo para cultivo de *S. maltophilia*, denominado Ágar SM (de Oliveira-Garcia, D) (Anexo 2) e meio seletivo para *B. cepacia*, *Burkholderia cepacia* Medium (BC) (Oxoid). Porções do escarro foram semeadas diretamente em cada um dos meios de cultura, pela técnica de esgotamento por estrias, de modo a obterem-se colônias isoladas.

Com o intuito de se realizar uma quantificação do crescimento microbiano, as amostras foram diluídas. Um volume entre 250 µl e 1ml de escarro foi colocado em frasco graduado cônico de polipropileno e fluidificado com igual volume de solução a 0,5% de N-acetil-L-cisteína dissolvida em tampão fosfato (pH 6,8-7,2). O tubo foi mantido sob agitação em agitador mecânico por 1 minuto e deixado em repouso por 15 minutos. Decorrido o tempo de repouso, foi agitado novamente por cerca de 20 segundos. Uma série de três diluições foi realizada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em solução de NaCl 0,85%.

Dez microlitros (10µL) das diluições foram semeados, com auxílio de alça de Drigalsky, na superfície total dos seguintes meios de cultura:

- diluição 10^{-1} – ágar SM, BC e Mac Conkey
- diluição 10^{-2} – ágar Mac Conkey
- diluição 10^{-3} – ágar Mac Conkey

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ$ C e lidas com 24, 48 e 72 horas de incubação. A porção restante do escarro puro foi armazenada a -20° C.

3.2.2 SECREÇÃO DE OROFARINGE

Em um tubo cônico graduado de polipropileno foi adicionado 1 mL de solução de NaCl 0,85%. O swab foi submergido na salina e agitado vigorosamente para desprendimento da secreção. Após retirado o excesso de líquido pressionando-se a haste contra a parede interna do tubo, a suspensão foi semeada em ágar MacConkey, SM e BC.

Foram realizadas as mesmas diluições descritas acima, e estas, semeadas nos mesmos meios de cultura e da mesma forma como as amostras de escarro. A temperatura, o período de incubação e os intervalos das leituras foram os mesmos. A suspensão inicial não diluída foi congelada a -20°C.

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Colônias foram semeadas em: Trypticase Soy Agar (TSA), para verificação da atividade de citocromo oxidase; meio IAL (Rugai modificado) (Pessoa e Silva, 1974), para verificação da ausência de fermentação e Trypticase Soy Broth (TSB), para confecção de lâminas para o exame microscópico por coloração de Gram e verificação de motilidade (Tab. 1).

TABELA 1. Grupamento inicial para a identificação de bacilos Gram-negativos não-fermentadores.

Gênero	Morfologia	Atividade da oxidase	Motilidade	Oxidação da glicose
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	bacilar	positiva lenta	positiva	positiva
<i>Stenotrophomonas</i>	bacilar	negativa / positiva lenta	positiva	variável
<i>Achromobacter xylooxidans</i> subsp. <i>xylooxidans</i>	bacilar	positiva	positiva	positiva
<i>Pseudomonas</i> e outras <i>Burkholderia</i>	bacilar	positiva	positiva	variável

Colônias que demonstraram ausência de fermentação no meio IAL, atividade de oxidase positiva, positiva lenta ou negativa e apresentaram-se como bacilos Gram-negativos ao exame bacterioscópico foram submetidas a uma extensa série de testes bioquímicos convencionais para confirmação da identificação:

- oxidação de açúcares (D-glicose, D-manitol, trealose, D-xilose, lactose, adonitol, maltose e sacarose) utilizando o meio MEVAG (Hugh & Leifson, 1953) como base (Anexo 2)
- produção de pigmentos: pioverdina e piocianina
- redução de nitrato a nitrito
- respiração de nitrato
- utilização de citrato de Simmons
- crescimento a 4°C e 42°C
- descarboxilação de aminoácidos (lisina, arginina e ornitina)
- produção de lipase e DNase
- hidrólise da esculina e gelatina
- assimilação de cis-acnitato

Todas as cepas foram semeadas em TSA e incubadas por 18-24 horas a 30°C. O crescimento bacteriano foi suspenso em TSB acrescido de glicerol a 15% e congelado a -70°C. Os microrganismos também foram liofilizados.

3.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

Realizado pelo método descrito por Bauer-Kirby (1969), de acordo com as instruções do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009a)

3.4.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os seguintes discos de antimicrobianos testados foram obtidos da Oxoid® (Basingstoke, Reino Unido): amicacina (30 µg), amoxicilina/ác. clavulânico (20/10 µg), ampicilina (10 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacina (5 µg), meropenem (10 µg), minociclina (30 µg), netilmicina (30 µg), piperacilina/ tazobactam (100/10 µg), polimixina B (300 U), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 µg), ticarcilina/ác.clavulânico (75/10 µg) e tobramicina (10 µg).

3.4.2 CONTROLE DE QUALIDADE

As seguintes cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas para controle de qualidade dos discos de antibióticos, do meio de cultura e da técnica:

- A) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, cepa produtora de ESBL.
- B) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, para controle da qualidade do meio de cultura Müller-Hinton.
- C) *Escherichia coli* ATCC 35218, para controle dos discos de antimicrobianos beta-lactâmicos e beta-lactâmicos conjugados a inibidores de beta-lactamases.
- D) *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para controle dos demais discos de antimicrobianos e da qualidade do ágar Müller-Hinton.

3.4.3 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

As cepas foram semeadas em TSA, meio nutriente não seletivo,

recomendado para o cultivo de microrganismos não-fastidiosos a serem submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos. As placas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, preparou-se o inóculo bacteriano em solução de NaCl 0,85%, através da suspensão direta de colônias isoladas. Uma turbidez semelhante ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi obtida com auxílio de aparelho fotométrico, em absorvância de 625nm.

3.4.4 APLICAÇÃO DOS DISCOS CONTENDO ANTIMICROBIANOS

Obtida a suspensão bacteriana, procedeu-se sua semeadura em placas de ágar Müeller-Hinton. Hastes com pontas de algodão estéreis foram introduzidas na suspensão bacteriana, pressionadas contra a parede interna do tubo para retirada do excesso de líquido e semeadas em várias direções sobre a superfície do meio de cultura. Após a absorção do excesso de líquido pelo ágar, procedeu-se a aplicação dos discos contendo os antimicrobianos, respeitando-se o limite de, no máximo, 12 discos nas placas com 150 mm de diâmetro e 5 discos na placa com diâmetro de 90 mm. As placas foram invertidas e incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20-24 horas.

3.4.5 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se a leitura. Com o auxílio de uma régua, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros e os microrganismos interpretados como sendo sensíveis, intermediários ou resistentes às drogas testadas, de acordo com critérios estabelecidos pelo CLSI, 2009a. Para as drogas e microrganismos testados cujos critérios de interpretação não foram estabelecidos, utilizou-se os critérios para *Pseudomonas aeruginosa*. Na falta de critérios inclusive para

P. aeruginosa, (cloranfenicol) utilizou-se os critérios interpretativos padronizados para *Enterobacteriaceae* (Anexo 9).

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE ÁGAR-DILUIÇÃO

A determinação da CIM foi realizada de acordo com as instruções contidas no CLSI, 2009b.

3.5.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos utilizados no teste de ágar-diluição foram os seguintes: sulfato de amicacina (Sigma®, EUA), cloridrato de cefepima (Aurobindo Pharma®, Índia), cefotaxima sódica (Aurobindo Pharma®, Índia), monidrato de ceftazidima (Sigma®, EUA), ceftriaxona sódica (Aurobindo Pharma®, Índia), ciprofloxacina (Sigma®, EUA), cloranfenicol (Sigma®, EUA), gentamicina (Calbiochem®, EUA), imipenem/cilastatina sódica (Tienam®) (Merck & Co.®, EUA), levofloxacina (Sigma®, EUA), meropenem (MepenoX®) (Biochimico, Brasil), sulfato de polimixina B (Sigma®, EUA) e sulfato de tobramicina (Sigma®, EUA). Os sais dos agentes antimicrobianos utilizados no preparo das soluções-estoque foram mantidos nas condições ambientes indicadas pelos fabricantes, sempre ao abrigo da luz. As indicações da potência ou unidade e data de validade encontravam-se nos rótulos das embalagens.

3.5.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE

A fórmula indicada a seguir foi utilizada para determinar a quantidade do antimicrobiano a ser pesada a fim de obter-se as concentrações das soluções-estoque indicadas na Tabela 2.

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg})}$$

Para o preparo da solução-estoque de Polimixina B, utilizou-se o seguinte cálculo para a conversão de Unidade (U) em Potência ($\mu\text{g}/\text{mg}$):

$$\text{Atividade (U/ mg)} \times 0,1 \mu\text{g/ U} = \text{Atividade (Potência) } \mu\text{g/ mg}$$

TABELA 2. Concentrações das soluções-estoque e respectivos intervalos testados pelo método de ágar-diluição.

Antimicrobianos	Concentração das soluções-estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo das concentrações ($\mu\text{g/mL}$)
Amicacina	10000	0,25 - 256
Cefepima	10000	0,015 - 256
Cefotaxima	20000	0,015 - 256
Ceftazidima	10000	0,06 - 128
Ceftriaxona	40000	0,03 - 256
Ciprofloxacina	2000	0,06 - 16
Cloranfenicol	10000	0,5 - 128
Gentamicina	10000	0,125 - 64
Imipenem	10000	0,06 - 32
Levofloxacina	5000	0,125 - 32
Meropenem	10000	0,125 - 64
Polimixina B	10000	0,125 - 256
Tobramicina	3000	0,125 - 64

As soluções-estoque foram preparadas de acordo com as recomendações do CLSI (2009b) utilizando-se os solventes e diluentes indicados no Anexo 3. Após o preparo, foram aliqüotadas, armazenadas em frascos de polietileno e mantidas a -70°C . Os frascos com antimicrobianos fotossensíveis como a ciprofloxacina e levofloxacina foram envolvidos com papel alumínio antes de serem armazenados.

3.5.3 DILUIÇÃO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS EM PLACAS DE ÁGAR MÜELLER-HINTON

Com o intuito de evitar-se a perda da potência dos antimicrobianos, as placas foram preparadas no dia imediatamente anterior ou, no máximo, dois dias antes de seu uso; exceto as placas de imipenem que, por tratar-se de um antimicrobiano muito sensível, foram preparadas no dia de seu uso. Primeiramente, preparou-se ágar Müller-Hinton de acordo com orientação do fabricante. Após um pequeno arrefecimento, alíquotas de 50 mL foram distribuídas em frascos de vidro estéreis que foram então colocados em banho-maria até que o meio de cultura atingisse uma temperatura entre 45 – 50°C.

Alíquotas das soluções-estoque dos antimicrobianos foram adicionadas a cada frasco, sendo o conteúdo homogeneizado e vertido em duas placas de Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro cada, previamente identificadas com a concentração do antimicrobiano. A espessura do meio de cultura, obtida após solidificação, foi de 4 mm. O Anexo 1 indica de forma detalhada os cálculos e alíquotas utilizados na obtenção das séries de placas com as faixas de concentrações desejadas para cada antimicrobiano testado.

As placas foram deixadas sobre uma superfície plana até a completa solidificação do meio, sendo posteriormente acondicionadas em sacos plásticos, seladas e armazenadas a 4°C até o momento do uso.

3.5.4. CONTROLE DE QUALIDADE

Cepas de referência American Type Culture Collection (ATCC®) *Escherichia coli* 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853 foram utilizadas para o controle de qualidade em todos os testes. O Anexo 4 indica os limites aceitáveis da CIM para os antimicrobianos testados.

3.5.5 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

As cepas foram semeadas em TSA e incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. O inóculo bacteriano foi então preparado em solução de NaCl 0,85%, através da suspensão direta de colônias isoladas. Uma turbidez semelhante ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi obtida com auxílio de aparelho fotométrico, em absorvância de 625nm.

A turbidez referente ao padrão 0,5 de McFarland corresponde a uma concentração bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Como a concentração bacteriana semeada na placa deveria ser aproximadamente 10^4 UFC/ponto, e o aplicador de Steers utilizado possuía pontas de 3 mm de diâmetro, que aplicavam cerca de 2 μL à superfície do meio, procedeu-se uma diluição 1:10 da suspensão bacteriana inicial, em solução de NaCl 0,85% estéril.

3.5.6 APLICAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS NAS PLACAS DE ÁGAR

As placas contendo os antimicrobianos foram retiradas da refrigeração e mantidas em temperatura ambiente. Após o equilíbrio térmico, foram colocadas por alguns instantes em estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ a fim de que qualquer umidade visível evaporasse da superfície do ágar. As placas foram marcadas em sua lateral com um pequeno traço, a fim de orientar a aplicação dos inóculos bacterianos. Alíquotas de 50 μL das suspensões bacterianas (10^7 UFC/mL) foram distribuídas nas cavidades do aplicador de Steers.

A inoculação foi realizada em duplicata, sendo primeiramente inoculada uma placa sem o agente antimicrobiano para verificar-se a viabilidade do microrganismo. A seguir, começando-se pela concentração mais baixa, foram inoculadas as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Após a inoculação da placa com a maior concentração, uma segunda placa de controle do crescimento foi inoculada para verificar-se possível contaminação ou transferência significativa de

antimicrobiano.

Após a inoculação, as placas permaneceram em temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo tivesse sido absorvida pelo ágar. A seguir, as placas foram invertidas e incubadas, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 20-24 horas.

3.5.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Decorrido o período de incubação, as placas foram colocadas sobre uma superfície escura, não refletiva, para a determinação das concentrações inibitórias mínimas. A CIM é definida como sendo a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando-se qualquer colônia única ou turvação leve na superfície do meio causada pelo inóculo.

3.6 VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIM E DA TICARCILINA-ÁCIDO CLAVULÂNICO POR MÉTODO EPSILOMÉTRICO

O método epsilométrico (Etest®, AB BIODISK, Solna, Suécia) foi utilizado para a verificação da CIM do sulfametoxazol-trimetoprim frente às cepas que se mostraram resistentes pelo método de disco-difusão. Foi utilizado também para a verificação da CIM da ticarcilina-ácido clavulânico frente a *S. maltophilia* e Complexo *B. cepacia*. Placas de ágar Müller-Hinton foram preparadas de acordo com instruções do fabricante. O inóculo bacteriano foi obtido conforme já descrito anteriormente, para o teste de disco-difusão. Após a semeadura do inóculo em toda a superfície da placa, aguardou-se até que o excesso de líquido tivesse sido completamente absorvido. Uma fita plástica com gradientes de concentração variando entre 0,002-32 $\mu\text{g/mL}$ (sulfametoxazol-trimetoprim) e 0,016-256 $\mu\text{g/mL}$ (ticarcilina-ácido clavulânico) foi então colocada delicadamente sobre a superfície do ágar inoculado e a placa incubada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas, de acordo com

as instruções do fabricante.

3.7. DETEÇÃO FENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs)

Utilizou-se o teste de disco-aproximação para a verificação fenotípica de possível produção de ESBL. Para isso, um disco contendo amoxicilina/ ácido clavulânico (20/10 µg) foi posicionado na superfície do ágar Müller-Hinton. Discos contendo ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepima (30 µg) e aztreonam (30 µg) foram posicionados a uma distância de 20-30 mm do disco central de amoxicilina/ ácido clavulânico (Figura 3). Após um período de incubação de 20-24 horas, procedeu-se a leitura do teste. Um teste positivo caracteriza-se pelo aparecimento de um distorção do halo de inibição entre o disco de amoxicilina/ ácido clavulânico e o disco do beta-lactâmico testado.

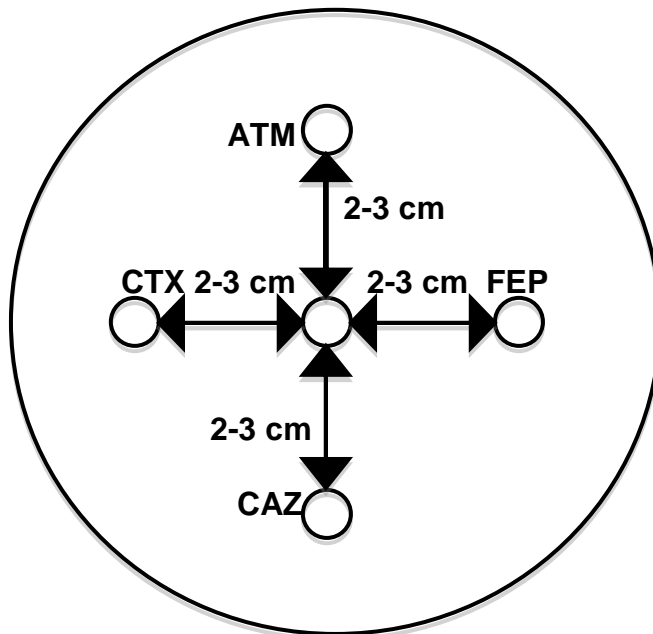


FIGURA 3. Modelo esquemático do posicionamento dos discos de β -lactâmicos e inibidor de beta-lactamases (centro-a-centro), para detecção fenotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ ác. clavulânico; CTX: cefotaxima; FEP: cefepima.

3.8 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-BETA-LACTAMASES (ARAKAWA, 2000)

A pesquisa de metalo-beta-lactamases foi realizada com as cepas bacterianas resistentes ao imipenem, excetuando-se *S. maltophilia*. Após a semeadura do inóculo bacteriano, seguindo-se o mesmo procedimento padronizado para a disco-difusão, discos de imipenem e ceftazidima foram depositados na superfície do meio e discos contendo EDTA 0,5 M (5µL/disco) e ácido mercaptopropiônico (3µL/disco), que são agentes sequestrantes de íons, foram posicionados a distâncias pré-determinadas (Figura 4).

O aumento do halo de inibição do crescimento bacteriano na área de encontro entre o disco da droga e do agente sequestrante sugere, fenotipicamente, a presença de metalo-beta-lactamases.

Os discos de ceftazidima e imipenem afastados dos demais serviram para a visualização da inibição do crescimento bacteriano sem a interferência dos inibidores enzimáticos.

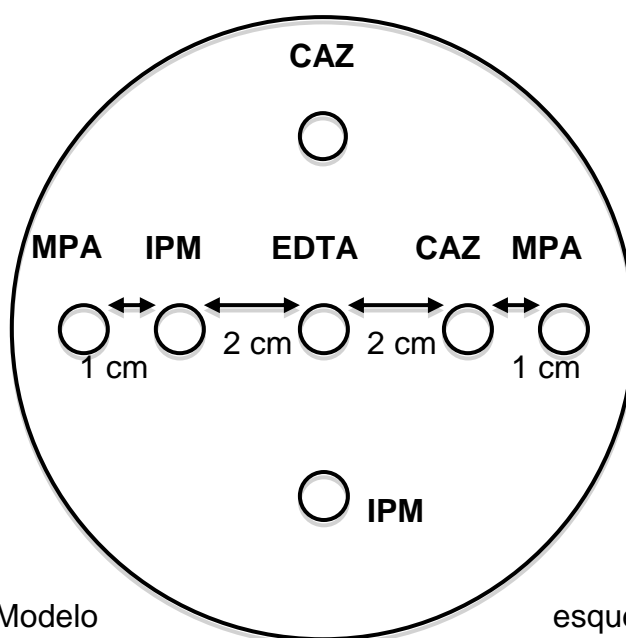


FIGURA 4. Modelo esquemático do posicionamento dos discos de antimicrobianos e agentes sequestrantes de íons (centro-a-centro), para pesquisa de metalo-beta-lactamases (MBLs). CAZ: ceftazidima; IPM: Imipenem; MPA: ácido mercaptopropiônico; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

3.9 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) PARA ANÁLISE GENOTÍPICA DE *S. maltophilia*, COMPLEXO *B. cepacia*, E *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*

A determinação dos perfis eletroforéticos pela técnica de PFGE foi realizada por Cláudia Doy, como parte do projeto de Iniciação Científica desenvolvido na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, sob orientação da Pesquisadora Científica Dra. Doroti de Oliveira Garcia. A técnica foi realizada com as cepas de *S. maltophilia*, complexo *B. cepacia* e *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* isoladas no segundo período de coletas compreendido entre setembro de 2006 a setembro de 2007. Os perfis eletroforéticos obtidos foram então comparados com os obtidos por Chernishev (2008), correspondentes aos isolados no período entre junho de 2003 a junho de 2004.

3.9.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foi utilizado o Protocolo do Programa Pulse Net, padronizado pelo Center for Disease Control (CDC), Estados Unidos (www.cdc.gov/pulsenet), o qual foi baseado na metodologia descrita por Gautom (1997).

As amostras de *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia* foram repicadas em TSB e incubadas a 30°C por 18 horas. Posteriormente, foram semeadas em placas de TSA e incubadas a 30°C por 18-48 horas.

Após o crescimento bacteriano, foi feita uma suspensão em tampão de suspensão celular (Anexo 3) ajustando a turbidez a 15% T em colorímetro (VITEK).

Foram aliqüotados 200 µL da suspensão bacteriana para um eppendorf e acrescentados 10 µL de proteinase K (solução estoque 20 mg/mL) (Anexo 3), 5 µL de lisozima (solução estoque 40 mg/mL) (concentração

final de lisozima e proteinase K 1µg/ mL) e 200 µL de agarose (pulsed field certified agarose - ultra pure DNA grade agarose, cat. 162-0137, Bio-Rad) 1,2% em tampão Tris-EDTA (TE) (Anexo 3) a 45° – 50°C, misturando delicadamente com a ajuda de uma pipeta para que não se formassem bolhas.

O gel contendo a suspensão bacteriana foi então distribuído nos moldes para a formação dos blocos. Após a solidificação, os blocos foram colocados em um tubo tipo Falcom de 50 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular (Anexo 3) e 25 µL da solução estoque de proteinase K, incubados em agitador a 54°C a 120 rpm por 3 h.

Após a lise, a solução foi desprezada e lavada com aproximadamente 12 mL de água ultra pura estéril pré-aquecida a 50°C. As amostras foram colocadas novamente no agitador a 50°C, 120 rpm por 15 minutos e lavadas novamente. Depois da segunda lavagem foi retirada a água e feita a lavagem com 10 a 15 mL de tampão TE estéril pré-aquecido a 50°C e reincubados em agitador a 50°C e 120 rpm por 15 minutos, e repetidas por mais três vezes. Após a última lavagem, os blocos foram suspensos em 10 mL de Tampão TE em temperatura ambiente e estocados a 4°C até a digestão.

3.9.2 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS DE *S. maltophilia*, COMPLEXO *B. cepacia* e *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os blocos foram cortados, com a ajuda de um bisturi, em pedaços de dois milímetros de espessura e colocados em tubos tipo eppendorf contendo tampão da enzima. Os eppendorfs foram incubados a 37°C em banho-maria por 10 minutos. Após a incubação, a solução foi desprezada e os blocos de *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* foram suspensos em uma solução contendo 50 U da enzima XbaI (Invitrogen); os blocos do

complexo *B. cepacia* foram suspensos em solução contendo 5 U da enzima SpeI (Gibco BRL) e incubados em banho-maria a 37°C/ 16-18h.

As amostras foram retiradas do banho-maria e a solução com a enzima foi desprezada acrescentando-se 200 µL de Tampão Tris-EDTA-Ácido Bórico (TBE) (Anexo 3) (0,5x) por 20 minutos, e então inseridas nos “pocinhos” do gel de agarose. DNA Lambda Ladder (New England Biolabs) foi utilizado como marcador.

A corrida foi realizada em equipamento CHEF DR II (BioRad) a 6 V/cm e temperatura de 14°C, nas seguintes condições:

A) Para *S. maltophilia* e complexo *B. cepacia*:

Tempo final: 54,2 segundos

Tempo de corrida total: 20 horas

B) Para *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Kanellopoulou *et al*, 2004):

Tempo inicial: 5 segundos

Tempo final: 35 segundos

Tempo de corrida total: 21 horas

Após a corrida, os geis foram corados com brometo de etídeo 0,5 mg/mL e observados no fotodocumentador Gel Doc EQ (System Quantity One version 4.5, Bio-Rad Laboratories, Inc. Milão, Itália). A similaridade entre as amostras foi determinada segundo os critérios de Tenover *et al.* (1995).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Durante o primeiro período de coleta de amostras, compreendido entre junho de 2003 a junho de 2004, um total de 415 amostras foi obtido de 113 pacientes. Deste total, em 67 amostras (16,1%), obtidas de 34 pacientes, foram isolados os BGN-NF avaliados neste trabalho, sendo:

- 23 amostras (34,3%) positivas para *S. maltophilia* obtidas de 13 pacientes (38,2%);
- 22 amostras (32,8%) positivas para Complexo *B. cepacia* obtidas de 11 pacientes (32,4%);
- 17 amostras (25,4%) positivas para *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* obtidas de 11 pacientes (32,4%);
- 5 (7,5%) amostras positivas para *B. gladioli* obtidas de 2 pacientes (5,9%)

Os pacientes 1 e 3 apresentaram amostras positivas para *A. xylosoxidans* e Complexo *B. cepacia*. Os pacientes 4 e 10 apresentaram amostras positivas para *A. xylosoxidans* e *S. maltophilia*.

Durante o segundo período de estudo, de setembro de 2006 a setembro de 2007, um total de 366 amostras foi obtido de 110 pacientes. Deste total, 55 amostras (15,0%) de BGN-NF utilizados neste estudo, foram obtidas de 35 pacientes, sendo:

- 34 amostras (61,8%) positivas para *S. maltophilia* obtidas de 21 pacientes (60%);
- 12 amostras (21,8%) positivas para Complexo *B. cepacia* obtidas de 10 pacientes (28,6%);
- 06 amostras (10,9%) positivas para *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* obtidas de 5 pacientes (14,3%);
- 03 amostras (5,4%) positivas para *B. gladioli* obtidas de 2 pacientes (5,7%).

O paciente 52 apresentou amostras positivas para *A. xylosoxidans*, Complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*. Os pacientes 26, 38, 45 e 50 apresentaram amostras positivas para Complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*.

Portanto, um total de 781 amostras respiratórias foi obtido durante todo o período abrangido pelo estudo. Deste total, em 122 amostras (15,6%) foram isolados os BGN-NF avaliados neste trabalho, sendo:

- 57 amostras (46,7%) positivas para *S. maltophilia*;
- 34 amostras (27,9%) positivas para Complexo *B. cepacia*;
- 23 amostras (18,8%) positivas para *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*;
- 8 amostras (6,6%) positivas para *B. gladioli*

4.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

4.1.1 DISCO-DIFUSÃO

Um total de 57 cepas de *S. maltophilia* foi submetido ao teste de disco-difusão para a verificação do perfil de sensibilidade a 22 antimicrobianos. Vinte e três cepas do primeiro e 34 cepas do segundo período de coleta de amostras foram avaliadas. (Figura 5 e Tabela 3)

TABELA 3. Frequência de amostras de *S. maltophilia* (n=57) isoladas de pacientes portadores de fibrose cística, em dois períodos distintos, 23 no primeiro período e 34 no segundo período, de acordo com as características de resistência aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	I*	II**	I	II	I	II
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
CEFTAZIDIMA	5 (21,7)	9 (26,5)	0 (0)	0 (0)	18 (78,3)	25 (73,5)
CEFTRIAXONA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	23 (100)	33 (97,1)
CEFOTAXIMA	0 (0)	3 (8,8)	1 (4,3)	4 (11,8)	22 (95,7)	27 (79,4)
CEFEPIMA	8 (34,8)	7 (20,6)	1 (4,3)	4 (11,8)	14 (60,9)	23 (67,6)
AZTREONAM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (100)	34 (100)
AMPICILINA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	23 (100)	33 (97,1)
IMIPENEM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	23 (100)	33 (97,1)
MEROPENEM	0 (0)	3 (8,8)	0 (0)	0 (0)	23 (100)	31 (91,2)
AMC ¹	0 (0)	3 (8,8)	2 (8,7)	0 (0)	21 (91,3)	31 (91,2)
PPT ²	6 (26,1)	13 (38,2)	0 (0)	0 (0)	17 (73,9)	21 (61,8)
TIC ³	12 (52,2)	17 (50)	11 (47,8)	0 (0)	0 (0)	17 (50)
SAM ⁴	0 (0)	2 (5,9)	0 (0)	0 (0)	23 (100)	32 (94,1)
CLORANFENICOL	11 (47,8)	24 (70,6)	10 (43,5)	8 (23,5)	2 (8,7)	2 (5,9)
POLIMIXINA B	17 (73,9)	20 (58,8)	0 (0)	0 (0)	6 (26,1)	14 (41,2)
STX ⁵	21 (91,3)	30 (88,2)	0 (0)	0 (0)	2 (8,7)	4 (11,8)
AMICACINA	4 (17,4)	1 (2,9)	0 (0)	1 (2,9)	19 (82,6)	32 (94,1)
GENTAMICINA	4 (17,4)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	19 (82,6)	33 (97,1)
NETILMICINA	4 (17,4)	2 (5,9)	0 (0)	2 (5,9)	19 (82,6)	30 (88,2)
TOBRAMICINA	2 (8,7)	1 (2,9)	0 (0)	2 (5,9)	21 (91,3)	31 (91,2)
MINOCICLINA	23 (100)	34 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
LEVOFLOXACINA	21 (91,3)	34 (100)	1 (4,3)	0 (0)	1 (4,3)	0 (0)
CIPROFLOXACINA	11 (47,8)	13 (38,2)	5 (21,7)	13 (38,2)	7 (30,4)	8 (23,5)

¹AMC: amoxicilina/ ác. clavulânico; ²PPT: piperacilina/tazobactam; ³TIC: ticarcilina/ ác. clavulânico;

⁴SAM: ampicilina/ sulbactam; ⁵STX: sulfametoxazol-trimetoprim.

*I: junho de 2003 a junho de 2004; II**: setembro de 2006 a setembro de 2007.

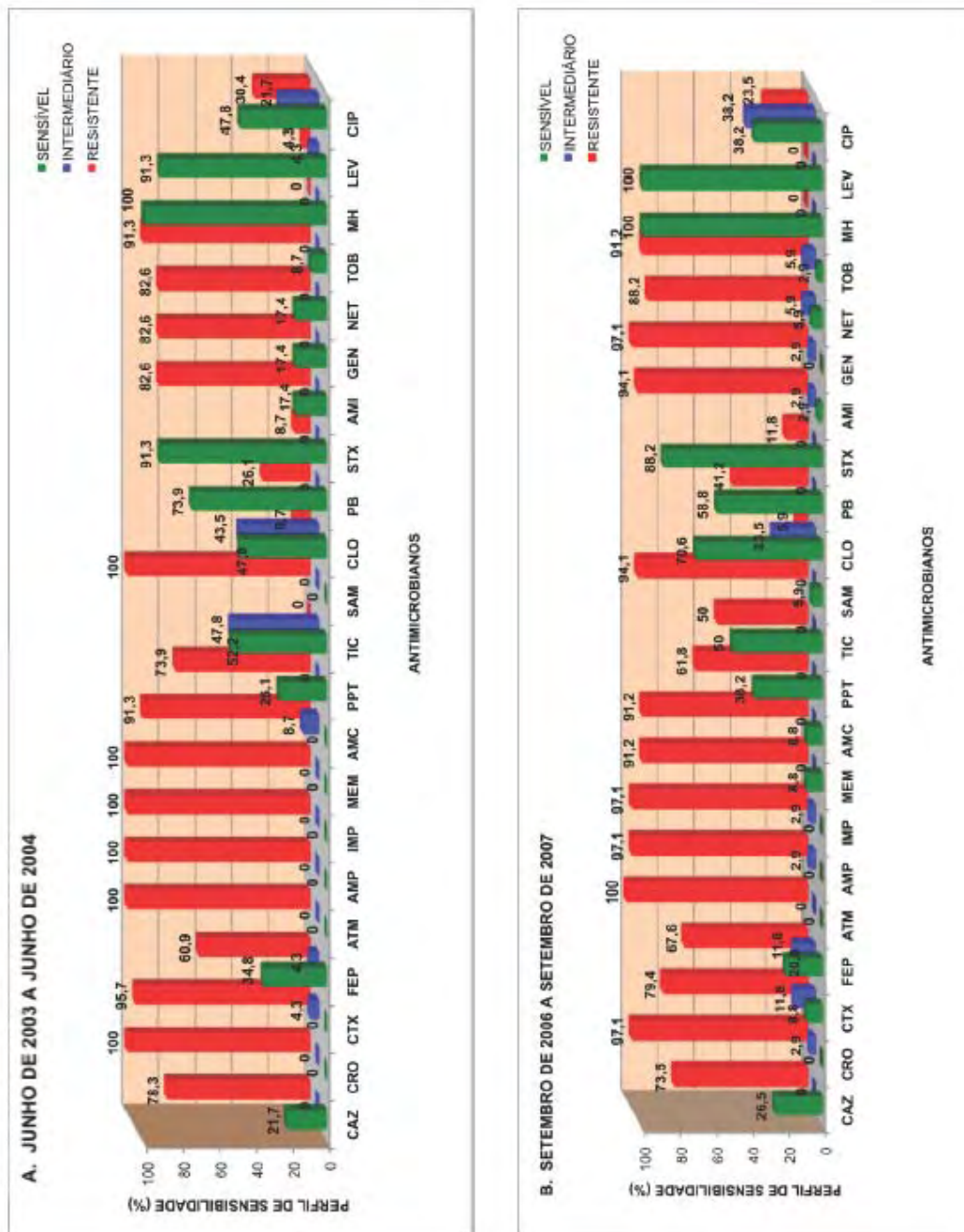


FIGURA 5. Perfil de sensibilidade de *S. maltophilia* obtido pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.

CAZ—cefazidima, CRO-ceftriaxona, CTX-cefotaxima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, AMP-ampicilina, MEM-meropenem, IMP-imipenem, AMC-amoxicilina/ác. clavulânico, PPT-piperacilina-tazobactam, TIC-ticarcilina/ác. clavulânico, SAM-ampicilina/sulbactam, CLO-cloranfenicol, PB-polimixina B, STX-sulfametoxazol-trimetoprim, AMI-amicacina, GEN-gentamicina, NET-netilmicina, TOB-tobramicina, MH-minocilina, LEV-levofloxacina, CIP-ciprofloxacina

TABELA 4. Diferentes perfis de resistência, obtidos pela técnica de disco-difusão, de 57 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de Fibrose Cística. São Paulo, 2003-2007.

Número da Amostra	Paciente	Perfil PFGE	Perfil de resistência																		
497	40	AQ	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	PB	Stx	Clo
350	28	F	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	PB	Clo	
521	42	T	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	PB	Cip	
296	33	A	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	Stx	Clo	
431, 571, 892 e 736	30,42,42, 4	L,T,U,AQ	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	PB		
362, 409, 626 e 644	33,27,49,51	M,C,AD,AA	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	Cip		
372	10	B	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Fep	PB	Cip	Lev		
774	42	T	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	PB	Cip		
219	33	M	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Cip	Stx		
586	35	Q	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	Stx	Clo		
264,467,575,679, 720 e 725	32,37,45,54, 43,49	G,AN,X,AH, AG,AD	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic			
320	27	C	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Cip			
723	56	V	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	PB			
146	27	C	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep	Tic	Cip			
233,416,506,527,604	12,12,41,12,47	E,E,O,S,R	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Fep				
339 e 418	35,35	G,G	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt	Tic				
378	34	K	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Fep	PB				
606 e 642	48,38	AJ,Al	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Caz	Fep	Tic	PB				
569	61	AM	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Net	Caz	Ppt	Tic	PB				
258	27	C	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Ppt	Cip					
696	37	AN	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Caz	Ppt					
661	43	AF	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Amc	Ami	Ctx	Caz	Ppt	Fep						
457 e 552	36,44	W,AB	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	PB						
215	32	N	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Ppt						
44	26	D	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ctx	Caz	Ppt	Tic	PB					
479	12	E	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net	Fep						
682	52	AK	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Net	PB							
356 e 797	31,50	H,AC	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Ctx	Net							
531	43	AE	Atm	Cro	Amp	Sam	Gen	Tob	Ami	Ctx	Net	Caz	Fep	Cip							
492	39	Z	Atm	Ipm	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Net	Caz	PB							
425	28	F	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Amc	Ctx	Caz	Ppt	Fep	Tic							
246	35	G	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Ctx	Net	Caz								
637	32	P	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Gen	Tob	Amc	Ami	Net								
2	29	J	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Tob	Amc	Ami	PB									
773	52	AL	Atm	Ipm	Cro	Amp	Gen	Tob	Ami	Net	Cip	Stx									
762	57	Y	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Amc	Ami	Cip										
763	35	AP	Atm	Ipm	Cro	Gen	Tob	Net	Cip	Stx											
361	24	I	Atm	Ipm	Cro	Amp	Sam	Mem	Amc	Ctx											

Atm – Aztreonam; Ipm – Imipenem; Cro – Ceftriaxona; Amp – Ampicilina; Sam – Ampicilina/Sulbactam; Mem – Meropenem; Gen – Gentamicina; Tob – Tobramicina; Amc – Amoxicilina/ Ácido clavulânico; Ami – Amicacina; Ctx – Cefotaxima; Net – Netilmicina; Caz – Ceftazidima; Ppt – Piperacilina/ Tazobactam; Fep – Cefepima; Tic – Ticarcilina/ Ácido clavulânico; PB – Polimixina B; Stx – Sulfametoxazol-trimetoprim; Clo - Cloranfenicol

Seis cepas (10,5%) apresentaram o mesmo perfil de resistência: aminoglicosídeos, cefalosporinas, carbapenêmicos, aztreonam, ampicilina e penicilinas associadas a inibidores de β -lactamases. Resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim também foi verificada em 10,5% das cepas.

4.1.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O teste de ágar-diluição foi realizado com todas as cepas frente aos seguintes antimicrobianos: ceftazidima, cefepima, cefotaxima, cloranfenicol e ciprofloxacina. Os aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina foram testados apenas frente a *S. maltophilia*.

Imipenem, meropenem e ceftriaxona foram testados apenas frente aquelas cepas que apresentaram-se resistentes a tais drogas no teste de disco-difusão (exceto *S. maltophilia*). Polimixina B (exceto gênero *Burkholderia*) e levofloxacina foram testadas frente a todas as cepas resistentes. O método de ágar-diluição não foi realizado com as seguintes drogas: beta-lactâmicos conjugados a inibidores de beta-lactamases, netilmicina, minociclina, ampicilina e aztreonam.

Sulfametoxazol-trimetoprim foi testado pela metodologia epsilométrica somente para as cepas resistentes a esta droga no teste de disco-difusão. Ticarcilina/ ácido clavulânico foi testada para todas as cepas de *S. maltophilia* e Complexo *B. cepacia* pela epsilometria.

TABELA 5. CIM₅₀, CIM₉₀ e atividade de 9 antimicrobianos testados frente a 57 isolados de *S. maltophilia*.

ANTIMICROBIANOS	CIM (µg/mL)		PONTOS DE CORTE (µg/mL)		RESULTADO (%)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	S	R	S	I	R
Cefepima ²	32	64	≤8	≥32	5	12	83
Cefotaxima ²	128	256	≤8	≥64	0	12	88
Ceftazidima ¹	64	>128	≤8	≥32	23	9	68
Ciprofloxacina ²	2	16	≤1	≥4	28	32	40
Cloranfenicol ¹	8	32	≤8	≥32	40	42	18
Amicacina ²	256	>256	≤16	≥64	12	4	84
Gentamicina ²	32	>64	≤4	≥16	5	7	88
Tobramicina ²	>64	>64	≤4	≥16	7	4	89
Ticarcilina/ ác. clavulânico ¹	24	256	≤16/2	≥128/2	63	21	16

¹ Interpretação realizada de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI para *S. maltophilia*.

² Interpretação realizada de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI para outros não-*Enterobacteriaceae*.

Das drogas testadas, a ticarcilina/ ácido clavulânico foi a que apresentou melhor desempenho, inibindo 63% das cepas. Contudo, a CIM₉₀ mostrou-se elevada: 256µg/ mL.

Comparando-se o perfil de sensibilidade de *S. maltophilia* obtido tanto pela CIM quanto pela disco-difusão, observou-se que apenas os aminoglicosídeos e a cefotaxima mantiveram uma certa concordância dos resultados. Os demais antimicrobianos apresentaram resultados discrepantes obtidos por uma técnica e outra (Tabela 6).

TABELA 6. Comparação do perfil de sensibilidade de 57 cepas de *S. maltophilia*, obtido pela CIM e disco-difusão.

ANTIMICROBIANO	RESULTADO (%)					
	Sensível		Intermediário		Resistente	
	CIM ¹	DD ²	CIM	DD	CIM	DD
CEFTAZIDIMA	23	25	9	0	68	75
CEFOTAXIMA	0	5	12	9	88	86
CEFEPIMA	5	26	12	9	83	65
CLORANFENICOL	40	61	42	32	18	7
AMICACINA	12	10	4	2	84	88
GENTAMICINA	5	7	7	2	88	91
TOBRAMICINA	7	5	4	4	89	91
CIPROFLOXACINA	28	42	32	32	40	26
TICARCILINA/ AC ³	63	51	21	0	16	49

¹CIM: concentração inibitória mínima; ²DD: disco-difusão; ³AC: ácido clavulânico

Um total de 20 cepas (35%) apresentou resistência à polimixina B no teste de disco-difusão. Tais cepas foram então submetidas ao teste de ágar-diluição e confirmou-se sua resistência a esta droga, sendo que destas, quatro cepas (20%) apresentaram uma alta resistência, com CIM de 256 µg/mL.

Seis cepas apresentaram halo inibitório de 6 mm frente ao sulfametoxazol-trimetoprim pelo método de disco-difusão. Ao serem submetidas ao método epsilométrico, todas apresentaram uma CIM

>32µg/mL, confirmando a resistência a esta droga. As seis cepas resistentes foram obtidas de 4 (12%) pacientes colonizados por *S. maltophilia*. Apesar de dois pacientes apresentarem duas cepas resistentes ao SXT cada um, os perfis de PFGE de tais cepas foram distintos entre si. Dos quatro pacientes portadores de cepas resistentes ao SXT, dois apresentaram cepas isoladas anteriormente ainda sensíveis a esta droga (Anexo 8).

4.1.3 PESQUISA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO E METALO-BETA-LACTAMASES

Apesar de ter sido observada a presença de um halo sinérgico entre os discos de aztreonam e amoxicilina/ ácido clavulânico e este fenômeno ser reportado por alguns autores (Muñoz-Bellido & García-Rodríguez, 1998) como sendo devido à atividade da enzima cromossomal L2 que degrada o aztreonam e é inibida pelo ácido clavulânico, não se pode descartar, apenas com base em uma metodologia fenotípica, a possibilidade da existência de beta-lactamases do tipo ESBL.

Durante a leitura do teste de disco-difusão observou-se, em 77% das cepas, a formação de um halo de sinergismo (halo fantasma) entre os discos de amoxicilina/ ácido clavulânico e aztreonam. Os discos estavam dispostos a uma distância de 30 mm centro a centro (Figura 6).

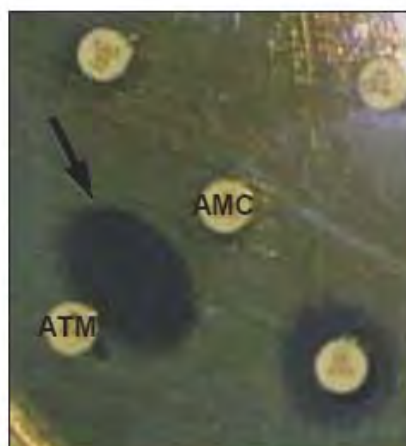


FIGURA 6. Formação de halo de sinergismo (seta) entre os discos de Amoxicilina/ ácido clavulânico e Aztreonam, colocados a uma distância de 30 mm centro a centro. AMC: Amoxicilina/ ácido clavulânico; ATM: Aztreonam.

4.1.4 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

Foram obtidos 42 perfis eletroforéticos distintos em 57 cepas de *S. maltophilia* (Anexo 8). Quatro amostras oriundas do paciente 27 apresentaram o mesmo perfil (perfil C). Ao comparar-se o perfil de sensibilidade das quatro amostras deste mesmo clone, observou-se uma única discordância maior, referente à ticarcilina-ácido clavulânico. Enquanto a primeira e a última cepa isoladas apresentaram resistência a esta associação pelo método de disco-difusão, as duas cepas intermediárias foram sensíveis. Entretanto, ao serem submetidas ao teste de ágar-diluição, as quatro cepas foram igualmente sensíveis.

O perfil G também foi compartilhado por 4 cepas, sendo 3 oriundas do paciente 35 e uma, do paciente 32. A primeira cepa isolada do paciente 35 revelou-se sensível à ticarcilina-ácido clavulânico e piperacilina-tazobactam na disco-difusão, diferentemente das outras duas amostras, que apresentaram resistência. Entretanto, também foi resistente a ambas associações, quando submetida ao teste de ágar-diluição.

Três cepas apresentaram o perfil E, sendo todas obtidas de um único paciente (12) durante a primeira fase de coleta de amostras. Na segunda fase de coleta, uma cepa deste mesmo paciente foi isolada e apresentou um perfil eletroforético distinto (perfil S). Das cepas obtidas primeiramente, houve apenas uma discordância maior, referente à ceftazidima. Enquanto as duas primeiras cepas apresentaram resistência a esta droga no teste de disco-difusão, a terceira foi sensível. Entretanto, ao serem submetidas ao teste de ágar-diluição, as três cepas mostraram-se sensíveis à ceftazidima.

Foram isoladas 4 cepas do paciente 42 durante a segunda fase de coleta de amostras. As duas primeiras cepas apresentaram o perfil T, a terceira, o perfil U e a quarta, o mesmo perfil T. A maior discrepância observada nas três amostras pertencentes ao clone T também foi referente à ticarcilina-ácido clavulânico. A última amostra isolada apresentou sensibilidade a esta combinação pelo método de disco-difusão, enquanto as duas primeiras, resistência.

As duas amostras pertencentes ao clone AD foram obtidas do paciente 49. Ambas apresentaram um perfil de sensibilidade quase idêntico, sendo notada uma pequena discordância apenas com relação ao cloranfenicol. A primeira amostra isolada em abril de 2007 mostrou-se intermediária, enquanto a segunda (junho/ 2007), apresentou sensibilidade. Entretanto, pelo teste de ágar-diluição, ambas mostraram-se igualmente intermediárias a esta droga (CIM 16 µg/ mL).

O paciente 43 teve três amostras obtidas durante o primeiro semestre de 2007 (janeiro, maio e junho) e as mesmas apresentaram perfis eletroforéticos distintos (AE, AF, AG). O paciente 52 igualmente apresentou duas amostras isoladas em maio e agosto de 2007, com perfis distintos (AK, AL).

4.2 COMPLEXO *Burkholderia cepacia*

4.2.1 DISCO-DIFUSÃO

Um total de 34 cepas do Complexo *B. cepacia* foi submetido ao teste de disco-difusão para a verificação de seus perfis de sensibilidade frente a 22 antimicrobianos. Vinte e duas cepas do primeiro e 12 cepas do segundo período de coleta de amostras foram avaliadas. (Figura 7 e Tabela 7).

TABELA 7. Frequência de amostras do Complexo *B. cepacia* (n=34) isoladas de pacientes portadores de fibrose cística, em dois períodos distintos, 22 no primeiro período e 12 no segundo período, de acordo com as características de resistência aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	I*	II**	I	II	I	II
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
CEFTAZIDIMA	22 (100)	11 (91,7)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)
CEFTRIAXONA	18 (81,8)	9 (75)	0 (0)	2 (16,7)	4 (18,2)	1 (8,3)
CEFOTAXIMA	15 (68,2)	4 (33,3)	2 (9,1)	7 (58,3)	5 (22,7)	1 (8,3)
CEFEPIMA	20 (90,9)	11 (91,7)	0 (0)	1 (8,3)	2 (9,1)	0 (0)
AZTREONAM	12 (54,5)	4 (33,3)	8 (36,4)	3 (25)	2 (9,1)	5 (41,7)
AMPICILINA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
IMIPENEM	10 (45,4)	6 (50)	1 (4,5)	3 (25)	11 (50)	3 (25)
MEROPENEM	18 (81,8)	12 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (18,2)	0 (0)
AMC ¹	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
PPT ²	22 (100)	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TIC ³	3 (13,6)	2 (16,7)	0 (0)	0 (0)	19 (86,4)	10 (83,3)
SAM ⁴	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
CLORANFENICOL	19 (86,4)	6 (50)	1 (4,5)	3 (25)	2 (9,1)	3 (25)
POLIMIXINA B	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
STX ⁵	20 (90,9)	10 (83,3)	1 (4,5)	0 (0)	1 (4,5)	2 (16,7)
AMICACINA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
GENTAMICINA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
NETILMICINA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
TOBRAMICINA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	12 (100)
MINOCICLINA	22 (100)	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
LEVOFLOXACINA	18 (81,8)	6 (50)	2 (9,1)	2 (16,7)	2 (9,1)	4 (33,3)
CIPROFLOXACINA	16 (72,7)	5 (41,7)	1 (4,5)	3 (25)	5 (22,7)	4 (33,3)

¹AMC: amoxicilina/ ác. clavulânico; ²PPT: piperacilina/tazobactam; ³TIC: ticarcilina/ ác. clavulânico

⁴SAM: ampicilina/ sulbactam; ⁵STX: sulfametoxazol-trimetoprim.

*I: junho de 2003 a junho de 2004; II**: setembro de 2006 a setembro de 2007.

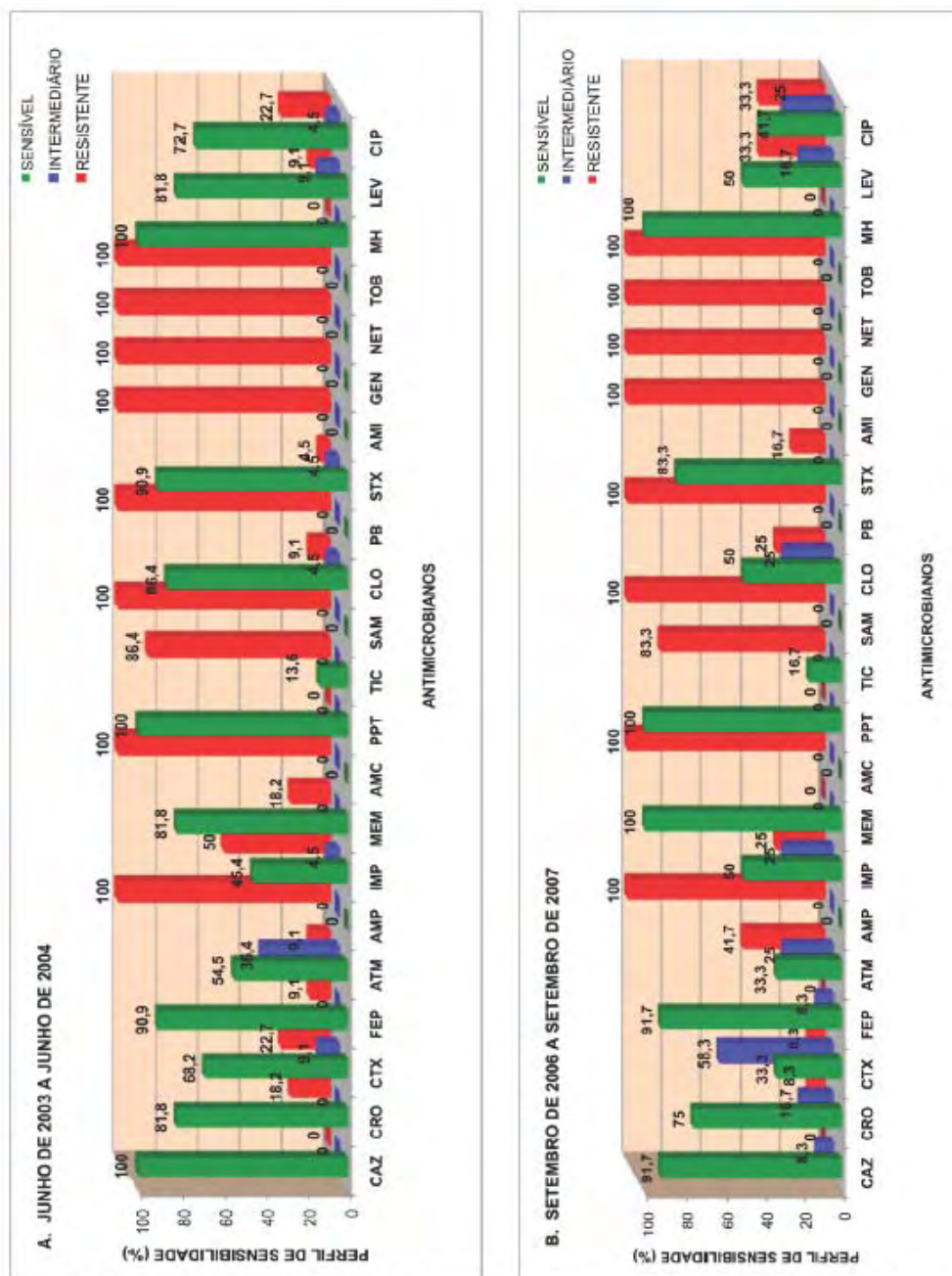


FIGURA 7. Perfil de sensibilidade do Complexo *B.cepacia* obtido pelo método de disco-difusão. São Paulo, 2003-2007.

CAZ–ceftazidima, CRO-ceftriaxona, CTX-cefotaxima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, AMP-ampicilina, MEM-meropenem, IMP-imipenem, AMC-amoxicilina/ác. clavulânico, PPT-piperacilina-tazobactam, TIC-ticarcilina/ác. clavulânico, SAM-ampicilina/sulbactam, CLO-cloranfenicol, PB-polimixina B, STX-sulfametoxazol-trimetoprim, AMI-amicacina, GEN-gentamicina, NET-netilmicina, TOB-tobramicina, MH-minociclina, LEV-levofloxacina, CIP-ciprofloxacina

TABELA 8. Diferentes perfis de resistência, obtidos pela técnica de disco-difusão, de 34 cepas do Complexo *B. cepacia* isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de Fibrose Cística. São Paulo, 2003-2007.

Número da Amostra	Paciente	Perfil PFGE	Perfil de resistência																		
			PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip	Atm	Ctx	Lev	Clo	Cro	Mem	Stx	Fep
326	19	C	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip	Atm	Ctx	Lev	Clo <td>Cro</td> <td>Mem</td> <td>Stx</td> <td>Fep</td>	Cro	Mem	Stx	Fep
405	19	C	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip	Atm	Ctx	Lev	Clo	Cro	Mem	Fep	
680	13	H	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Cip	Atm	Ctx	Lev	Cro	Stx				
47	19	C	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip	Ctx	Cro	Mem					
458	13	H	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip	Lev	Clo	Stx					
700	55	V	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip	Lev							
779	55	V	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Cip	Atm	Lev							
225 e 345	19, 25	C, D	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Cip								
363	21	I	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm	Mem								
271	25	O	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Ipm	Ctx	Cro								
600, 643 e 662	46, 50, 52	T, U, NT	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Atm									
463 e 486	37, 38	Q, R	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Clo									
17, 218, 394 e 456	1, 23, 20, 21	NT*, F, K, I	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ipm									
287	1	A	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic	Ctx									
61, 77, 216, 217, 276, 328, 364, 380 e 413	17, 14, 1, 17, 17, 13, 1, 17 e 26	N, E, A, N, N, H, A, N e L	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Tic										
374	25	O	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam	Ipm										
365, 673 e 718	16, 3, 45	J, P, S	PB	Ami	Gen	Net	Tob	Amp	Amc	Sam											

*NT - Cepa não tipada por PFGE (desintegração do DNA)

PB – Polimixina B; Ami – Amicacina; Gen – Gentamicina; Net – Netilmicina; Tob – Tobramicina; Amp – Ampicilina; Amc – Amoxicilina/ Ácido clavulânico; Sam – Ampicilina/Sulbactam; Tic – Ticarcilina/ Ácido clavulânico; Ipm – Imipenem; Atm – Aztreonam; Ctx – Cefotaxima; Cro – Ceftriaxona; Clo – Cloranfenicol; Mem – Meropenem; Stx – Sulfametoxazol-trimetoprim; Fep – Cefepima;

Nove cepas (26,5%) apresentaram o mesmo perfil: resistência aos aminoglicosídeos, polimixina B, ampicilina e beta-lactâmicos conjugados a inibidores de beta-lactamases, exceto piperacilina-tazobactam, contra a qual inclusive, todas as 34 cepas foram sensíveis. (Tabela 8)

Três cepas (9%) apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim pelo teste de disco-difusão. Entretanto, ao serem submetidas ao teste epsilométrico, apenas uma cepa (3%) confirmou esta resistência (CIM 6µg/mL).

Em um estudo anterior (Chernishev, 2008; Martins et al, 2008) 22 cepas do primeiro período de coleta de amostras foram identificadas bioquímica e molecularmente (sequenciamento do gene 16S rRNA). Posteriormente, outras 10 cepas do segundo período também foram identificadas molecularmente (Anexo 7). Observou-se que as cepas

identificadas como *B. multivorans* apresentaram 100% de resistência ao imipenem, segundo o método de disco-difusão e padrão interpretativo estabelecido para *P. aeruginosa* (Anexo 9). Cepas identificadas como *B. cenocepacia* apresentaram resistência de 25% frente a este antimicrobiano. As duas cepas identificadas como *B. vietnamiensis* foram sensível ao imipenem. A taxa de resistência a 11 dos 22 antimicrobianos testados foi desigualmente distribuída entre as espécies do Complexo. *B. multivorans* foi a espécie mais resistente frente às fluorquinolonas, carbapenens e cefalosporinas, exceto ceftazidima. *B. contaminans* foi a mais resistente ao aztreonam. *B. vietnamiensis* foi 100% sensível à ticarcilina-ácido clavulânico, diferentemente do restante do Complexo, que apresentou de 80-100% de resistência a esta combinação de drogas.

O meio de cultura seletivo para crescimento de *S. maltophilia* utilizado e denominado meio SM (desenvolvido por de Oliveira-Garcia, D.), apresenta o antimicrobiano imipenem em sua composição a uma concentração de 10µg/mL de meio (Anexo 2). Como todas as amostras obtidas durante o estudo foram semeadas tanto em meio seletivo para *S. maltophilia* como para *B. cepacia*, verificamos qual havia sido o comportamento das cepas do Complexo resistentes ao imipenem com relação ao crescimento no meio SM. A Tabela 9 evidencia a diferença entre *B. cenocepacia* e *B. multivorans*.

TABELA 9. Perfil de crescimento de cepas do Complexo *B. cepacia* resistentes ao imipenem, em meio seletivo para *S. maltophilia*

Espécie genômica	Crescimento no meio SM ¹	
	Positivo N (%)	Negativo N (%)
<i>B. cenocepacia</i>	0 (0)	2 (100)
<i>B. multivorans</i>	6 (67)	3 (33)

¹meio de cultura seletivo para *S. maltophilia*

4.2.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

TABELA 10. CIM₅₀, CIM₉₀ e atividade de 6 antimicrobianos testados frente a 34 isolados do Complexo *B. cepacia*.

ANTIMICROBIANOS	CIM (µg/mL)		PONTOS DE CORTE (µg/mL)		RESULTADO (%)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	S	R	S	I	R
Cefepima ²	8	>256	≤8	≥32	53	18	29
Cefotaxima ²	16	64	≤8	≥64	47	38	15
Ceftazidima ¹	4	32	≤8	≥32	76	9	15
Ciprofloxacina ²	2	16	≤1	≥4	29	27	44
Cloranfenicol ¹	16	32	≤8	≥32	12	56	32
Ticarcilina/ ác. clavulânico ¹	>256	>256	≤16/2	≥128/2	15	3	82

¹ Interpretação realizada de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI para *B. cepacia*.

² Interpretação realizada de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI para outros não-*Enterobacteriaceae*.

A ceftazidima foi a droga que apresentou o melhor resultado no teste de ágar-diluição, inibindo 76% das cepas do Complexo *B. cepacia* e apresentando CIM₉₀ de 32µg/mL.

TABELA 11. Comparação do perfil de sensibilidade do Complexo *B. cepacia* obtido pela CIM e disco-difusão.

ANTIMICROBIANO	RESULTADO (%)					
	Sensível		Intermediário		Resistente	
	CIM ¹	DD ²	CIM	DD	CIM	DD
CEFEPIMA	53	91	18	3	29	6
CEFOTAXIMA	47	56	38	23	15	21
CEFTAZIDIMA	76	97	9	3	15	0
CIPROFLOXACINA	29	62	27	12	44	26
CLORANFENICOL	12	73	56	12	32	15

¹CIM: Concentração Inibitória Mínima; ²DD: disco-difusão

Três cepas apresentaram-se resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim pelo teste de disco-difusão. Ao serem submetidas à confirmação pelo método epsilométrico, somente uma apresentou CIM de 6 µg/mL, o que

caracterizou-a como resistente. As duas cepas restantes mostraram-se sensíveis (Anexo 7).

4.2.3 PESQUISA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO E METALO-BETA-LACTAMASES

A detecção fenotípica de beta-lactamases ESBL e MBL resultou negativa para todas as cepas testadas.

4.2.4 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

Foram obtidos 18 perfis distintos em 34 cepas do Complexo *B. cepacia* (Anexo 7). Sete pacientes apresentaram a persistência do mesmo clone ao longo do tempo:

Paciente 1: Perfil A - amostras 216, 287 e 364 (a amostra 17, primeira isolada deste paciente, não foi tipada, mesmo após diversas tentativas, devido à degradação do DNA);

Paciente 13: Perfil H – amostras 328, 458 e 680.

Paciente 17: Perfil N – amostras 61, 217, 276 e 380.

Paciente 19: Perfil C – amostras 47, 225, 326 e 405.

Paciente 21: Perfil I – amostras 363 e 456.

Paciente 25: Perfil O – amostras 271, 345 e 374.

Paciente 55: Perfil V – amostras 700 e 779.

A amostra 287 (perfil A) apresentou diferenças no perfil de sensibilidade à ceftazidima, cefotaxima, cefepima e cloranfenicol em relação às demais cepas do mesmo clone.

As amostras pertencentes ao perfil H apresentaram diferenças no perfil de sensibilidade a praticamente todos os antimicrobianos testados, exceto aos aminoglicosídeos, polimixina B, ampicilina, piperacilina-