



CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE UMA COLEÇÃO DE CEPAS-PADRÃO E DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE BACTÉRIAS NÃO FERMENTADORAS EM FIBROSE CÍSTICA E INFECÇÃO HOSPITALAR.



ESTEVES CZ¹, LEVY CE²

¹Fac Farmácia FCM UNICAMP, ²Depto Patologia Clínica FCM UNICAMP.
¹cibele_bi@hotmail.com, ²celevy@fcm.unicamp.br

Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111-Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.

Bactérias Não Fermentadoras, Fibrose Cística, Infecção Hospitalar

INTRODUÇÃO

Bactérias Gram negativas não fermentadoras são potenciais patógenos envolvidos em infecções hospitalares e em infecções crônicas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística. Devido à dificuldade de caracterização de algumas destas bactérias de importância clínica, por métodos manuais e automatizados, há necessidade de documentar o desempenho destes agentes frente a provas e testes bioquímicos padronizados, devido à escassez de dados na literatura.

A *P. aeruginosa* é considerada o principal agente infeccioso envolvido na pneumopatias crônicas. Outros microrganismos oportunistas também podem ser encontrados em pacientes com fibrose cística, tais como o complexo *Burkholderia cepacia*, a *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia spp*, *Pandoraea spp*, *Inquilinus spp* e outros. Estas bactérias, principalmente *C. Burkholderia cepacia*, *S. maltophilia* e *Pseudomonas spp*, também podem causar infecções associadas a processos invasivos como bacteremia, meningite, endocardite.

A taxonomia deste grupo de bactérias encontra-se em constante evolução, e para muitos gêneros e espécies os dados disponíveis são muito limitados, envolvendo poucas cepas, sendo esta a importância da caracterização bioquímica e susceptibilidade destas bactérias aos antimicrobianos.

OBJETIVOS

Testar as provas disponíveis para a caracterização de uma coleção de cepas-padrão de bactérias não fermentadoras com finalidade de identificar as provas úteis na diferenciação destas bactérias na rotina laboratorial, bem como conhecer os fármacos potencialmente úteis no tratamento das infecções causadas por estes agentes

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas Padrão: Coleção de Cepas Padrão BCC LMG®.

LMG1225 *P. pseudoalcaligenes*, LMG1224 *P. alcaligenes*, LMG1222 *B. cepacia*, LMG18822 *B. multivorans*, LMG13010 *B. multivorans*, LMG19230 *B. cenocepacia*, LMG18829 *B. cenocepacia*, LMG21462 *B. cenocepacia*, LMG14294 *B. stabilis*, LMG14291 *B. stabilis*, LMG10929 *B. vietnamiensis*, LMG18836 *B. vietnamiensis*, LMG18943 *B. dolosa*, LMG19182 *B. ambifaria*, LMG16670 *B. anthina*, LMG14191 *B. pyrrocinia*, LMG2216 *B. gladioli*, LMG1873 *A. piechaudii*, LMG1231 *A. denitrificans*, LMG1229 *A. faecalis subsp. faecalis*, LMG1863 *A. xylosoxidans*, LMG20952 *I. limosus*, LMG1232 *B. bronchiseptica*, LMG16407 *P. apista*, LMG18379 *P. norimbergensis*, LMG18087 *P. pnomensusa*, LMG18106 *P. pulmonicola*, LMG18819 *P. sputorum*, LMG3244 *C. pauculus*, LMG6866 *R. mannitolilytica*, LMG21421 *R. insidiosa*, LMG21510 *C. respiraculi*, LMG5886 *C. gillardi*, LMG1195 *C. metalidurans*, LMG5942 *R. pickettii*, LMG958 *S. maltophilia*, LMG12279 *E. meningoseptica*, LMG1041 *A. baumannii*, LMG8337 *C. indologenes*, LMG1131 *A. odorans*, LMG22680 *A. faecalis subsp. parafaecalis*.

- Cepas teste: 22 cepas de *S. maltophilia*, 18 de *A. xylosoxidans*, 2 de *A. denitrificans*, 1 de *R. pickettii* e 1 de *R. mannitolilytica* isolados de pacientes diferentes de Fibrose Cística e Infecção Hospitalar identificados na rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP pelo Vitek II.
- Provas bioquímicas manuais e crescimento em meios de cultura: Oxidase, Catalase, OF Leifson para carboidratos glicose, sacarose, xilose, maltose e lactose, Liquefação da gelatina, Descarboxilação de aminoácidos arginina, ornitina e lisina, Uréia, Citrato Simmons, Crescimento a 42°C e 44°C, Caldo NaCl 6,5%, Hidrólise da Esculina, Indol, TSI, PYR, ONPG e DNase, Agar Sangue, A McConkey, Agar SS, Agar Muller Hinton, BCSA, BCSA modificado conforme manual ANVISA 2009.
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Etest®: Ceftazidima, Ciprofloxacina, Imipenem, Meropenem, Minociclina, Polimixina B, Sulfatrim e Tigeciclina, conforme orientação do fabricante, para: cepas padrão e cepas teste de *Achromobacter sp* e 11 de *S. maltophilia*.
- Disco Difusão para: Ampinib-Sulbactam, Amicacina, Aztreonam, Ceftazidima, Cloranfenicol, Cefepima, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Imipenem, Levofloxacino, Meropenem, Minociclina, Piperacilina tazobactam, Polimixina B, Tigeciclina, Trimetoprim-Sulfa, tobramicina conforme normas do CLSI 2008/9, para as mesmas cepas submetidas a determinação da CIM.

RESULTADOS

Cepas Padrão: pudemos confirmar os dados já publicados e obter dados que não se encontram na literatura consultada. Para cada gênero foram determinadas as provas bioquímicas importantes para diferenciar de outros gêneros e das espécies entre si (tabela 1).

Cepas teste: todas as cepas de *S. maltophilia* e as cepas de *R. pickettii* e *R. mannitolilytica* identificadas por série bioquímica foram corretamente identificadas pelo Vitek II. Das 18 cepas identificadas bioquimicamente como *A. xylosoxidans* 8 foram identificadas corretamente pelo Vitek II, enquanto 4 foram identificadas como *A. denitrificans*, 1 como *P. fluorescens*, para 3 as provas não foram suficientes para diferenciar entre *A. xylosoxidans* e *A. denitrificans* 1 ficou entre *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans* e *A. lwoffii* e 1 entre *A. xylosoxidans* e *C. pauculus*. Das duas cepas de *A. denitrificans* uma delas foi identificada corretamente e a outra ficou entre *A. xylosoxidans* e *A. denitrificans*. Analisando os valores de CIM 50 pudemos concluir que os fármacos com melhor desempenho in vitro são Meropenem e Sulfatrim para *A. xylosoxidans* e Sulfatrim e Tigeciclina para *S. maltophilia*. Para CIM 90 os melhores fármacos são Minociclina e Tigeciclina para *A. xylosoxidans* e Sulfatrim para *S. maltophilia* e para as 2 cepas de *A. denitrificans*, Ciprofloxacina, Sulfatrim e Tigeciclina (tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 1: Comparação entre os resultados da Série Bioquímica obtida para as cepas padrão e para as cepas teste das bactérias *A. denitrificans*, *A. xylosoxidans*, *R. mannitolilytica*, *R. pickettii* e *S. maltophilia*.

Provas	<i>Achromobacter denitrificans</i> LMG 1231	<i>Achromobacter denitrificans</i> (N=2)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> LMG 1863	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (N=18)	<i>Bacterium mannitolilytica</i> LMG 2150	<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (N=1)	<i>Bacterium pickettii</i> LMG 5942	<i>Ralstonia pickettii</i> (N=1)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LMG 958	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (N=22)
Motilidade	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%
Cresc em: McConkey	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%
BCSA Oxid ⁴	NEG	100%	NEG	12%	POS	100%	POS	100%	NEG	82%
SS	POS	100%	POS	100%	NEG	0%	NEG	0%	POS	100%
DNase	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	POS	100%
Oxidase	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	NEG	0%
Catalase	POS	100%	POS	100%	NEG	100%	POS	100%	POS	100%
Cresc a:										
25°C	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%
35°C	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%
42°C	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%
44°C	NEG	0%	NEG	0%	POS	100%	NEG	0%	NEG	0%
PYR	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	NEG	0%
TSI	POS	100%	POS	100%	NEG	100%	POS	100%	POS	86%
ONPG	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	POS	86%
Lisina	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	POS	100%
Arginina	POS	0%	POS	67%	POS	0%	NEG	0%	NEG	0%
Omitina	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%
Gelatina	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	POS	91%
Esculina	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	POS	95%
Uréia	NEG	0%	NEG	0%	POS	100%	POS	100%	NEG	0%
Citrato	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	86%
Indol	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%
Rodriguez:										
Nitrito a nitrito	POS	100%	POS	100%	NEG	0%	POS	0%	POS	59%
Nitrito a gás	POS	100%	POS	78%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	14%
Oxidative:										
OF Glicose	NEG	0%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	POS	32%
OF Maltose	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	POS	59%
OF Lactose	NEG	0%	NEG	0%	POS	100%	NEG	0%	NEG	4%
OF Xilose	NEG	0%	POS	100%	POS	100%	POS	100%	NEG	0%
OF Sacarose	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%	NEG	0%
NaCl 4.5%	POS	50%	POS	83%	NEG	0%	NEG	0%	POS	27%
NaCl 6.0%	POS	50%	POS	83%	NEG	0%	NEG	0%	POS	18%
NaCl 8.5%	POS	50%	POS	61%	NEG	0%	NEG	0%	POS	18%

Tabela 2: Comparação entre os CIM 50 e 90 com o CIM obtido pela cepa padrão de *Achromobacter xylosoxidans* LMG 1863.

Antibióticos (µg/mL)	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Imipenem	Meropenem	Minociclina	Polimixina B	Sulfatrim	Tygeciclina
CIM 50%	6	2	1,5	0,19	2	2	0,125	1
CIM 90%	64	>32	>32	>32	3	6	>32	3
Intervalo	3 - >256	0,75 - > 32	0,75 - >32	0,094 - >32	0,75 - 6	1 - 6	0,023 - >32	0,75 - 6
CIM Cepa Padrão	6	> 32	1	1	6	4	> 32	2

Tabela 3: Comparação entre os CIM 50 e 90 com o CIM obtido pela cepa padrão de *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958.

Antibióticos (µg/mL)	Ceftazidime	Sulfatrim	Tygeciclina
MIC 50%	3	0,025	0,032
MIC 90%	> 256	0,75	2
Intervalo	0,5 - >256	0,125 - >32	<0,016- 16
CIM Cepa Padrão	12	0,25	0,19

Tabela 4: Comparação entre os CIM obtidos pelas das cepas testadas e o CIM obtido pela cepa padrão de *Achromobacter denitrificans* LMG 1231.

Antibióticos (µg/mL)	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Imipenem	Meropenem	Sulfatrim	Tygeciclina
Cepa 1	2	0,5	> 32	1,25	0,064	0,19
Cepa 2	2	0,5	0,5	0,32	0,094	0,25
CiM Cepa Padrão	1	0,3	1	0,047	0,047	0,125

CONCLUSÕES

Os testes realizados com as cepas padrão possibilitaram conhecer o padrão bioquímico destas bactérias não fermentadoras possibilitando que sua identificação seja otimizada no Laboratório de Microbiologia do HC da Unicamp. Os testes realizados com as cepas testes confirmaram a dificuldade de identificação destas bactérias, tanto pelo método manual como pelo método automatizado (Vitek II) e as limitadas opções de antimicrobianos que potencialmente podem ser utilizados na terapêutica das infecções causadas por estes agentes.

