

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE LEMES CASTILHO

Resazurin Microtiter Assay (REMA) modificado para detecção de resistência à
ciprofloxacino e linezolida em micobactérias de crescimento rápido

Maringá

2013

ALINE LEMES CASTILHO

Resazurin Microtiter Assay (REMA) modificado para detecção de resistência à ciprofloxacino e linezolida em micobactérias de crescimento rápido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof.^a Dr.^a Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo seu amor incondicional, amizade e dedicação, que são fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me abençoou em todas as etapas da vida, colocando em meu caminho oportunidades inigualáveis e me dando paz e serenidade em tempos difíceis.

Aos meus pais Fátima e Jolberto, e ao meu irmão Artur, pelo apoio em todas as situações, pelos conselhos e amor sem limites.

Ao meu amor, Alexandre, melhor amigo e companheiro, que me ajudou e me compreendeu em todos os momentos.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rosilene Fressatti Cardoso, pelos seus ensinamentos, passados com sabedoria e dedicação. Agradeço também pela paciência e amizade.

Às minhas queridas Heloísa, Laiana e Maria, amigas para o que der e vier, que me deram forças e incentivo na realização de todos os meus projetos de vida.

Às professoras Luciana, Regiane e Vera pelos ensinamentos e apoio.

À professora Katiany, pela amizade, preocupação, apoio e auxílio fundamental para a realização deste trabalho.

Às alunas de pós-graduação Aline Furlan, Mariana, Renata, Fernanda, Cláudia e Flaviane e as alunas de iniciação científica Vanessa, Clariana, Ariadne, Karina e Camila pelo carinho, amizade e colaboração.

Aos funcionários do LEPAC, e antigos colegas de trabalho, Rubia, Sonia, Paula, Edilene, Soninha, Marcos e Izabel, que me acompanham desde o início da minha vida acadêmica, meus sinceros agradecimentos pela colaboração e amizade.

Aos meus colegas de trabalho Shigue, Lusia, Henrique, Angelina, Tereza, Luana, Aline e Vanessa, pela compreensão pelas minhas ausências e amizade

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra
alma humana.

Carl Jung

Resazurin Microtiter Assay (REMA) modificado para detecção de resistência à ciprofloxacino e linezolida em micobactérias de crescimento rápido

RESUMO

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) pertencem ao grupo das micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e contêm espécies patogênicas, que causam infecções disseminadas e localizadas, especialmente em pele, ossos e articulações. Essas infecções estão, na maioria dos casos, associadas a pacientes imunocomprometidos e requerem tratamento prolongado. O teste de susceptibilidade preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* para as espécies patogênicas desse grupo é realizado em microplacas e requer leitura visual o que o torna muito subjetivo. O *resazurin microtiter assay method (REMA)* vem sendo aplicado em pesquisas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fármacos antituberculosos por ser simples, de baixo custo e proporcionar resultados mais rápidos se comparado aos métodos tradicionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da modificação do REMA para determinação da CIM para ciprofloxacino e linezolida pelo cultivo do bacilo em meio contendo resazurina. Foram utilizados para o estudo *Mycobacterium chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* e *M. fortuitum*. Os resultados foram comparados ao teste de susceptibilidade preconizado pelo CLSI e ao REMA tradicional. Não foi observada diferença na CIM para linezolida e ciprofloxacino quando se adiciona resazurina diretamente no meio de cultura para os isolados estudados. A modificação de REMA pela utilização de meio de cultivo contendo previamente a resazurina mostrou ser eficiente, reprodutível, rápido, de baixo custo, fácil execução e interpretação na detecção de resistência a linezolida e ciprofloxacino em MCR.

Palavras-chave: Ciprofloxacino. Linezolida. Micobactérias de crescimento rápido. REMA.

Modified Resazurin Microtiter Assay (REMA) for detecting resistance to ciprofloxacin and linezolid in Rapidly Growing Mycobacteria

ABSTRACT

The rapidly growing mycobacteria (RGM) comprise a group of non-tuberculous mycobacteria (NTM) and contains species of pathogenic microorganisms which cause various types of localized and disseminated infections, especially in skin, bones and joints. These infections are in most cases associated with immunocompromised patients and require long term treatment. The susceptibility test recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for RGM pathogenic requires visual reading which makes it very subjective. The method resazurin microtiter assay method (REMA) has been used in research to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for antituberculous drugs because it is simple, low cost and provide faster results compared to traditional methods. The aim of this study was to evaluate the in vitro effect of REMA modification for MIC determination to MCR to ciprofloxacin and linezolid in the cultivation of bacillus in culture medium containing resazurin. Were used for the study *Mycobacterium chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* and *M. fortuitum*, and the results were compared to the susceptibility test recommended by CLSI and REMA. There was no difference in MIC for linezolid and ciprofloxacin when adding resazurin directly in the culture medium for the isolates studied. The modification of REMA by using culture medium containing resazurin previously shown to be efficient, reproducible, fast, inexpensive, easy to perform and interpret the detection of resistance to linezolid and ciprofloxacin in MCR.

Keywords: Ciprofloxacin. Linezolid. Rapidly growing mycobacteria. REMA.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Journal of Medical Microbiology* (artigo 1) disponível em:<<http://intl-jmm.sgmjournals.org>>

SUMÁRIO

CAPITULO I	10
Introdução	10
Micobactérias de Crescimento Rápido	10
Doenças e afecções específicas	11
Diagnóstico Clínico	11
Diagnóstico Laboratorial	12
Coloração	12
Cultura	12
Identificação	13
Tratamento	13
Testes de determinação de susceptibilidade	14
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo resazurin microtiter assay(REMA)	14
Justificativa	15
Objetivos	15
Referências	16
CAPÍTULO II	19
Artigo: Detecção de resistência em micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido pelo método <i>Resazurin Microtiter Assay</i> (REMA)	20
CAPÍTULO III	29

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

As micobactérias não-tuberculosas são amplamente distribuídas no ambiente. Podem ser isoladas no solo e na água, incluindo fontes naturais e tratadas. A grande maioria das espécies não é patogênica para o homem, porém podem atuar como oportunistas e causar doenças na presença de fatores predisponentes como por exemplo, a imunodepressão. Os bacilos podem ser adquiridos a partir de exposição ambiental, embora a fonte específica de infecção geralmente não possa ser identificada (GRIFFITH et al, 2007).

No aspecto bacteriológico, são divididos em micro-organismos de crescimento rápido e crescimento lento, que diferem entre si pelo padrão de susceptibilidade aos antibióticos e locais de infecção (GRIFFITH et al, 2007). As micobactérias de crescimento rápido (MCR) pertencem ao grupo IV segundo a classificação de Runyon e formam colônias em cinco dias em meios de cultura sólidos (RENAUD et al, 2011).

As MCR são descritas em infecções disseminadas e localizadas, principalmente infecções pulmonares, de pele e tecidos moles adquiridos por via respiratória e cutânea (RUIZ-ARAGÓN et al, 2007). Afetam prevalentemente a pele, ossos e articulações (TORTOLI et al, 2009), sendo as infecções cutâneas as mais frequentes (ESTEBAN et al, 2006). São consideradas menos virulentas, porém essas micobactérias são de difícil erradicação, por serem ambientais e apresentam maior resistência aos antimicrobianos disponíveis. Apesar da resistência aos fármacos antituberculosos, algumas espécies são susceptíveis a fármacos não rotineiramente testados em laboratórios de micobacteriologia (SWENSON et al, 1985; RUIZ-ARAGÓN et al, 2007; FONSECA et al, 2008).

No Brasil, os casos de infecção envolvendo MCR não são comuns e estão relacionados com procedimentos inadequados de esterilização e desinfecção. Há relatos de surtos após cirurgias a laser e mesoterapia. Desde 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária tem divulgado a ocorrência de surtos isolados, relacionados a cuidados com a saúde, de MCR em vários estados. Dentre estes, podemos citar Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e Distrito Federal (PITOMBO et al, 2009).

DOENÇAS E AFECÇÕES ESPECÍFICAS

A imunodepressão é um entre tantos fatores predisponentes para as infecções por micobactérias. Podemos citar como exemplos a existência de lesões locais ou outras enfermidades que podem alterar a imunidade local, como a fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema, silicose, bronquiectasias e lesões cavitárias antigas do pulmão. Alguns fatores estão mais relacionados a certos tipos de micobactérias como a presença de corpos estranhos, próteses, suturas e procedimentos cirúrgicos (ESTEBAN et al, 2006).

Mycobacterium abscessus pode ser isolado de diferentes habitats aquáticos e no solo, e pode contaminar reservatórios de água e soluções de lavagem em hospitais. Tem habilidade de sobreviver na ausência de nutrientes e em variadas temperaturas. Podem causar infecções pulmonares, endocardites, otite média crônica, ceratite pós cirurgia a laser, infecções relacionadas a injeções, cateteres e hemodiálise, bem como infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos (GARCÍA-AGUDO e GARCÍA-MARTOS, 2011).

Entre as micobactérias de crescimento rápido, o *Mycobacterium chelonae* é uma das mais patogênicas e apresenta grande resistência a antibióticos. O achado clínico mais comum relacionado a esta micobactéria é a infecção de pele, que algumas vezes pode ser disseminada geralmente em pacientes sob terapia com imunossupressores em transplantados, artrite reumatóide ou outros processos autoimunes. Podem produzir infecções localizadas como celulites, abscessos e osteomielites, infecções cirúrgicas, relacionadas a injeções e cateteres intravasculares (GARCÍA-AGUDO e GARCÍA-MARTOS, 2011).

Mycobacterium fortuitum está relacionado a abscessos pós-injeção, infecções pós cirurgia plástica, osteomielite traumática, celulite, mastite, peritonite e infecções relacionadas à cateter endovenoso. Infecções pulmonares e disseminadas são raras (GARCÍA-AGUDO e GARCÍA-MARTOS, 2011).

Mycobacterium smegmatis tem sido descrito como agente causador de doenças pulmonares, bacteremia relacionada a cateter, infecções de pele e tecidos moles, endocardite, osteomielite, linfadenites e infecções disseminadas (GARCÍA-AGUDO e GARCÍA-MARTOS, 2011).

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas, assim como outras doenças de origem infecciosa, começa pela suspeita clínica. Quadros crônicos com

evolução lenta e que não respondem ao tratamento com antibioticoterapia convencional, em especial aos antibióticos betalactâmicos, devem sugerir a possibilidade deste tipo de infecção. Além disso, existem quadros clínicos que são muito característicos de determinadas espécies, por exemplo, pacientes que apresentam infecções disseminadas envolvendo a pele muitas vezes são colonizados por *M. fortuitum* e *M. chelonae* (ESTEBAN et al, 2006; KOTHAVADE et al, 2013).

Após levar em consideração a suspeita clínica, o diagnóstico de certeza se dá pelo isolamento do microorganismo no tecido afetado por cultura direcionada para estes microorganismos e identificação adequada, que nem sempre é fácil de realizar (ESTEBAN et al, 2006).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Coloração

As MCR aparecem na coloração de Gram como bastonetes Gram-positivos fracamente corados e se assemelham a difteroides pela característica não-uniforme da coloração do bacilo (ESTEBAN et al, 2006). Estas características auxiliam no direcionamento do diagnóstico, porém a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) ou o método de Kinyoun são técnicas recomendadas para diagnóstico de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (B.A.A.R.). Estas colorações são métodos rápidos e de fácil execução, porém tem baixa sensibilidade e não possibilitam a diferenciação de espécies (GRIFFITH et al, 2007).

Cultura

As culturas para MCR podem ser realizadas em meio líquido e/ou sólido. A cultura em meio líquido produz resultados mais rápidos, porém não permite isolamento do microorganismo e pode não ser satisfatória em casos paucibacilares. As vantagens do meio sólido são a possibilidade de isolar as colônias e observar sua morfologia, permitindo o reconhecimento de micro-organismos contaminantes e a quantificação da carga micobacteriana na amostra clínica (GRIFFITH et al, 2007).

Pode ser utilizado o MGIT (*mycobacteria growth indicator tube*), um sistema não radiométrico para detecção de crescimento bacteriano que contém meio líquido Middlebrook 7H9 modificado e um sensor fluorescente. Entre os meios sólidos estão o Loweinstein-Jensen (L-J) e os meios Middlebrook 7H10 e 7H1(GRIFFITH et al, 2007).

Identificação

A identificação de MCR envolve testes bioquímicos, pigmentação e morfologia das colônias. Entretanto, estes métodos têm baixa sensibilidade e podem ser influenciados pela variabilidade fenotípica do microorganismo (HONG et al, 2003).

TRATAMENTO

O tratamento medicamentoso de infecções por MCR, baseado no perfil de sensibilidade das bactérias, é complicado devido à longa duração e porque alguns antimicrobianos são de alto custo e podem apresentar efeitos adversos (SET e SHASTRI, 2011). A cirurgia por vezes é necessária, em casos de formação de abscessos, para remover corpos estranhos como cateteres ou implantes, ou quando o tratamento não faz o efeito esperado. Para infecções ósseas, em geral, pelo menos seis meses de terapia são recomendados (GRIFFITH et al, 2007).

Para tratamento de infecções graves da pele, tecidos moles e ósseas causadas por *M. abscessus*, é utilizada a claritromicina e azitromicina por via oral, podendo combinar com terapia parenteral de amicacina, cefoxitina ou imipenem. Os macrolídeos são a única classe de antimicrobianos orais ativos *in vitro* contra *M. abscessus*. Para doenças graves, são necessários pelo menos quatro meses de terapia para obter altas chances de cura. Doenças pulmonares por *M. abscessus* vem sendo tratadas com linezolida acompanhada de um macrolídeo (GRIFFITH et al, 2007).

Para *M. chelonae*, em tratamentos de infecção de pele, o antimicrobiano mais utilizado é a claritromicina. Outras opções de tratamento são amicacina, fluorquinolonas e azitromicina, que são escolhidos dependendo do padrão de susceptibilidade do microorganismo (GRIFFITH et al, 2007).

Isolados de *M. fortuitum* são usualmente susceptíveis a antimicrobianos orais. O tratamento de doenças pulmonares causadas por esta micobactéria combina dois agentes e é continuado por 12 meses a partir da negatificação da cultura de escarro. Para infecções de pele, ossos e tecidos moles, são necessários no mínimo de quatro meses de terapia com a combinação de dois fármacos (GRIFFITH et al, 2007).

O tratamento contra *M. smegmatis* geralmente envolve os mesmos antimicrobianos utilizados em *M. fortuitum*, juntamente com doxiciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. Para infecções severas, são mais utilizados a amicacina ou imipenem, por via parenteral (GRIFFITH et al, 2007).

TESTES DE DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE

O teste de susceptibilidade para MCR patogênicas requer conhecimento e experiência na realização da técnica e também o conhecimento do padrão esperado de susceptibilidade das diferentes espécies do grupo. O teste é realizado em microplaca, onde se inocula a suspensão bacteriana padronizada nos poços na microplaca contendo diluições do antimicrobiano. A CIM (concentração inibitória mínima) não é um valor absoluto, pois a CIM real está entre a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano e o valor que está abaixo deste. Mesmo em condições controladas, pode ser que não se encontre o mesmo valor da CIM em cada teste realizado. Geralmente, a reprodutibilidade é aceitável quando a CIM tem no máximo uma diluição de diferença entre os testes realizados (CLSI, 2011).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO RESAZURIN MICROTITER ASSAY (REMA)

Palomino et al. (1999) propuseram um ensaio baseado na oxidação e redução da resazurina para fazer testes de determinação de sensibilidade para *Mycobacterium tuberculosis*. Este é um ensaio simples, de baixo custo e proporciona resultados mais rápidos se comparado aos métodos tradicionais. A resazurina (IUPAC: 7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) é um indicador de atividade metabólica, não-tóxico, hidrossolúvel, de cor azul e não-fluorescente, que pode ser reduzido por bactérias metabolicamente ativas a resorufina, um composto de cor rosa e altamente fluorescente. O desaparecimento da cor rosa (estado reduzido do corante) pode ocorrer depois de uma incubação mais prolongada, devido a formação de produtos incolores, as diidroresofurinas (RAMBERSAD, 2012).

A resazurina já foi utilizada com sucesso em testes de viabilidade em protozoários (DUARTE et al, 2009; BOWLING et al, 2012), fungos (TIBALLI et al, 1995) e bactérias aeróbias (VIDAL-AROCA et al, 2009). Esta também vem sendo utilizada em pesquisa para

determinação de susceptibilidade à fármacos com ação em *M. tuberculosis* (JADAUN et al, 2007; MIYATA et al, 2011; ZANETTI et al, 2011; DIXIT et al, 2012) e outras micobactérias não tuberculosas (JADAUN et al, 2007).

JUSTIFICATIVA

Considerando que o método atual para determinação de susceptibilidade à MCR apresenta dificuldades em sua interpretação, torna-se necessário o estudo de ferramentas para melhorar este teste, visto a importância de um resultado preciso para o tratamento medicamentoso das micobacterioses.

Neste contexto, o REMA modificado pode ser promissor em testes laboratoriais para o estudo de resistência á fármacos. Para isto, é necessário realizar um estudo comparativo com a técnica preconizada.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a atividade *in vitro* de linezolida e ciprofloxacino em micobacterias não-tuberculosas de crescimento rápido por modificação no *resazurin microtiter assay* (REMA).

ESPECÍFICOS

Determinar a CIM de ciprofloxacino e linezolida para micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido utilizando o REMA e REMA modificado;

Avaliar o efeito da rezasurina no crescimento de micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido no método REMA modificado;

Avaliar o efeito da rezasurina na CIM para o ciprofloxacino e linezolida pelo método REMA modificado;

Avaliar o tempo de incubação para determinação da CIM pelo método REMA modificado.

REFERÊNCIAS

BOWLING, T.; MERCER, L.; DON, R.; JACOBS, R.; NARE, B. Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human African trypanosomiasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.2, p. 262–270, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard- Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, Pa. USA: CLSI; 2011.

DIXIT, P.; SINGH, U.; SHARMA, P.; JAIN, A. Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of *M. tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v.88, p. 122–126, 2012.

DUARTE, M.; GIORDANI, R.B.; DE CARLI, G. A.; ZUANAZZI, J. A.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Cytotoxicity of solubilization vehicles for *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus* measured by the resazurin microtiter assay. **Veterinary Parasitology**, v.166, p. 167–170, 2009.

ESTEBAN ,J.; CIA, J.I.G.; ORTIZ, A; ROBLAS, R. F. Infecciones por micobacterias atípicas. **Medicine**, v. 9, p.3632-3638, 2006.

GARCÍA-AGUDO, L.; GARCÍA-MARTOSP. Clinical significance and antimicrobial susceptibility of rapidly growing Mycobacteria. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Méndez-Vilas (Ed.)2011.

FONSECA, T. L.; GROLL ,A. V.; LEITÃO, G. G.; SCAINI C. J.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoeense*. **Vittale**, v.20, p.65-71, 2008.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; REYN, C. F. V.; WALLACE, R. J. JR;

WINTHROP, K. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous Mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 367–416, 2007.

HONG, T.; BUTLER, W. R.; HOLLIS, F.; FLOYD, M. M.; TONEY, S. R.; TANG, Y. W.; STEELE, C.; LEGGIADRO, R. J. Characterization of a Novel Rapidly Growing *Mycobacterium* Species Associated with Sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5650–5653, 2003.

JADAUN, G. P. S.; AGARWAL, C.; SHARMA, H.; AHMED, Z.; UPADHYAY, P.; FAUJDAR, J.; GUPTA, A. K.; DAS, R.; GUPTA, P.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, V. D.; KATOCH, V. M. Determination of ethambutol MICs for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* isolates by resazurin microtitre assay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.152–155, 2007.

KOTHAVADE, R. J. ; DHURAT, R. S. ; MISHRA, S. N. ; KOTHAVADE, U. R. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, p. 161–188, 2013.

MIYATA, M.; PAVAN, F. R. ; SATO, D. N.; MARINO, L. B.; HIRATA, M. H.; CARDOSO, R. F.; MELO, F. A. F.; ZANELLI, C. F.; LEITE, C. Q. F. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 456–459, 2011.

PALOMINO, J.C.; PORTAELS, F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**. v.18, p. 380–383, 1999.

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, p. 529-533, 2009.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v.12, p. 12347-12360, 2012.

RENAUD, C. J.; SUBRAMANIAN, S.; TAMBYAH, P. ; LEE, E. J.C. The clinical course of rapidly growing nontuberculous mycobacterial peritoneal dialysis infections in Asians: A case series and literature review. **Nephrology**, v.16, p. 174–179, 2011.

RUIZ-ARAGÓN, J.; GARCÍA-AGUDO, L.; FLORES, S.; RODRÍGUEZ, M.J.; MARÍN, P.; GARCÍA-MARTOS, P. Sensibilidad a los antimicrobianos de micobacterias de crecimiento rápido. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 20, p.429-432, 2007.

SET, R; SHASTRI, J. Laboratory aspects of clinically significant rapidly growing mycobacteria. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, p. 343-352, 2011.

SWENSON, J. M.; WALLACE, R. J. Jr.; SILCOX, V. A., THORNSBERRY, C. Antimicrobial Susceptibility of Five Subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.28, p. 807-811, 1985.

TIBALLI ,R. N.; XIAOGANG, H. E.; ZARINS, L. T., REVANKAR, S. G.; KAUFFMAN, C. A. Use of a Colorimetric System for Yeast Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 915–917, 1995.

TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. **Clinical Microbiological Infections**, v.15. p.906–910, 2009.

VIDAL-AROCA, F.; A. MENG 2, MINZ, T.; PAGE, M. G.P.; DREIER, J. Use of resazurin to detect mefloquine as an efflux-pump inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v.79. p. 232–237, 2009.

CAPÍTULO II

Artigo: “*Resazurin* Microtiter Assay (REMA) modificado para detecção de resistência à ciprofloxacino e linezolida em micobactérias de crescimento rápido”

***Resazurin* Microtiter Assay (REMA) modificado para detecção de resistência à ciprofloxacino e linezolida em micobactérias de crescimento rápido**

Aline Lemes Castilho¹, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli¹, Vera Lucia Dias Siqueira¹, Regiane Bertin de Lima Scodro¹, Rosilene Fressatti Cardoso¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) pertencem ao grupo das micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e contêm espécies patogênicas, que causam infecções disseminadas e localizadas, especialmente em pele, ossos e articulações. Essas infecções estão, na maioria dos casos, associadas a pacientes imunocomprometidos e requerem tratamento prolongado. O teste de susceptibilidade preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para as espécies patogênicas desse grupo é realizado em microplacas e requer leitura visual o que o torna muito subjetivo. O *resazurin microtiter assay method* (REMA) vem sendo aplicado em pesquisas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fármacos antituberculosos por ser simples, de baixo custo e proporcionar resultados mais rápidos se comparado aos métodos tradicionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da modificação do REMA para determinação da CIM para ciprofloxacino e linezolida pelo cultivo do bacilo em meio contendo resazurina. Foram utilizados para o estudo cepas de *Mycobacterium chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* e um isolado de *M. fortuitum*. Os resultados foram comparados ao teste de susceptibilidade preconizado pelo CLSI e ao REMA. Não foi observada diferença na CIM para linezolida e ciprofloxacino quando se adiciona resazurina diretamente no meio de cultura para os isolados estudados. No método proposto por este trabalho, não há necessidade da placa ser reaberta, aumentando a biossegurança do teste. A modificação de REMA pela utilização de meio de cultivo contendo previamente a resazurina mostrou ser eficiente, reprodutível, rápido, de baixo custo, fácil execução e interpretação na detecção de resistência a linezolida e ciprofloxacino em MCR.

Palavras-chave: Ciprofloxacino. Linezolida. Micobactérias de crescimento rápido. REMA.

INTRODUÇÃO

As micobactérias não-tuberculosas (MNT) são amplamente distribuídas no ambiente, e a grande maioria não é patogênica para o homem, porém podem atuar como oportunistas e causar doenças na presença de fatores predisponentes (Griffith *et al.*, 2007). Entre as MNT, as micobactérias de crescimento rápido (MCR) afetam prevalentemente a pele, ossos e articulações (Tortoli *et al.*, 2009). Apesar de serem consideradas menos virulentas, são de difícil erradicação, por serem ambientais e apresentarem maior resistência aos antimicrobianos (Fonseca *et al.*, 2008).

O teste de susceptibilidade recomendado e preconizados para MCR, pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), é realizado em microplaca com antimicrobianos como a amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, sulfametoxazol, sulfametoxazol-trimetoprima e linezolida (CLSI, 2011). A concentração inibitória mínima (CIM) não representa um valor absoluto, pois a CIM real está entre a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano e a concentração mais próxima e inferior a esta. Mesmo em condições controladas, pode ser que não se encontre o mesmo valor da CIM em cada teste realizado. Geralmente, a reprodutibilidade é aceitável com diferença de uma diluição (CLSI, 2011).

A maior dificuldade para a realização destes testes está na interpretação dos resultados de crescimento micobacteriano. Este é realizado por leitura visual, que requer experiência do observador e por vezes pode deixar dúvidas sobre a CIM exata.

Palomino *et al.* (1999) propuseram um ensaio baseado na oxidação e redução da resazurina, o *resazurin microtiter assay method* (REMA), para fazer testes de sensibilidade com fármacos antituberculosos para isolados de *Mycobacterium tuberculosis*. Este é um ensaio simples, de baixo custo e proporciona resultados mais rápidos se comparado aos métodos tradicionais. Porém, uma desvantagem é que as placas têm que ser manuseadas mais de uma vez para a adição posterior da resazurina para revelar o crescimento bacteriano. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da modificação do REMA para determinação da CIM para ciprofloxacino e linezolida em MCR pelo cultivo do bacilo em meio contendo resazurina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Agentes antimicrobianos

As soluções estoques de ciprofloxacino (Sigma Aldrich, Streinheim, Alemanha, lote 0001396108) e linezolida (Zyvox, Pfizer, Brasil, lote Z-11) foram preparadas nas concentrações de 2.000 mg L⁻¹ cada e estocadas a -20°C até o momento de uso, quando foram diluídas em Mueller Hinton Broth (MHB) (Becton Dickinson, USA, lote 9106707) suplementado com soluções de cátions de cálcio e magnésio.

Cepa controle

Staphylococcus aureus ATCC 29213 foi utilizado como controle dos testes de acordo com CLSI (CLSI, 2011).

Preparo do inóculo

Cepas de *M. smegmatis*, *M. chelonae* *M. abscessuse* um isolado de *M. fortuitum* foram semeados em MHB suplementado com cátions a 30°C por três dias. O inóculo micobacteriano foi padronizado por comparação visual com a escala 0,5 de Mac Farland e diluído 1:100 (CLSI, 2011).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM de ciprofloxacino e linezolida foi utilizado o método REMA (Palomino *et al.*, 1999). Para cada MCR, foram confeccionadas cinco microplacas de 96 orifícios (Kartell, Milão, Itália) com as mesmas concentrações dos antimicrobianos. Inicialmente, foi realizado diluição seriada de ciprofloxacino (0,007 - 1 mg L⁻¹) e linezolida (0,5 - 64 mg L⁻¹) em MHB suplementado com cátions. Na placa 1, além dos antimicrobianos, foi adicionada resazurina (Acros, Morris Plains, NJ, USA) em solução a 0,02%.

Após, foi adicionado 100 µL do inóculo bacteriano padronizado e diluído em cada cavidade contendo as diluições dos fármacos nas placas 1 a 5. Todas as placas foram seladas e incubadas a 30°C por até 72 horas, com leitura para visualização do crescimento bacteriano com 24, 48 e 72 e 96 horas de incubação. Nas placas 2, 3, 4 foi adicionada 30 µL da solução de resazurina a 0,02 % recém preparada após 24, 48 e 72 horas de incubação respectivamente (Fig. 1). A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano (não mudança da cor azul para rosa). Para a placa 5, usada como

referência, foi realizada leitura visual de crescimento bacteriano (turbvação) após 72 hs de incubação de acordo com CLSI (2011).

Para cada MCR estudada foram utilizados orifícios contendo inoculo micobacteriano e meio de cultivo MHB suplementado como controle de crescimento e outros contendo apenas meio de cultivo como controle de esterilidade do meio de cultivo.

RESULTADOS

As CIMs de linezolida e ciprofloxacino para *S. aureus* ATCC 29213 foram 2 e 0,25 mg L⁻¹ respectivamente.

As CIMs de linezolida e ciprofloxacino para *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. abscessus* estão mostradas na Tabela 1 de acordo com a metodologia e o tempo de leitura.

Mesmo adicionando inicialmente a resazurina ao meio de cultivo, a visualização do crescimento bacteriano, bem como determinação da CIM só foi possível após 48 horas de incubação, entretanto.

O tempo de incubação e a adição da resazurina diretamente no meio não influenciaram no resultado da CIM para as quatro cepas de MCR estudadas, mantendo os mesmo valores ou diferença de uma diluição. Não foi observada diferença importante na CIM entre o método proposto pelo CLSI (2011) e o REMA modificado.

DISCUSSÃO

A técnica da microdiluição em caldo é amplamente utilizada para realizar testes de susceptibilidade a fármacos em isolados bacterianos, porém dificuldades ainda são encontradas na leitura dos testes, o que interfere no resultado da CIM incluindo micobactérias de crescimento rápido (Lee *et al.*, 2007). A interpretação visual é muito subjetiva, de difícil visualização, pela característica do crescimento micobacteriano. No presente estudo foram realizadas alterações na técnica de determinação de susceptibilidade em MCR preconizada pelo CLSI (2011). Estas alterações se pautaram no cultivo das MCR testadas em meio contendo resazurina e na leitura pela adição desta após o crescimento micobacteriano em tempos de incubação prévia diferentes.

O método REMA vem sendo usado para estudos de detecção de resistência em micobactérias e tem demonstrado uma boa correlação dos resultados quando comparado com o método das proporções (Franzblau *et al.*, 1998, Palomino *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2005.). O REMA utiliza a resazurina como agente revelador da atividade biológica. A resazurina, de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resofurina, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida; porém o mecanismo pelo qual este processo ocorre em micobactérias ainda não está bem esclarecido, o qual pode ocorrer por reações químicas em células viáveis. Além da facilidade de execução e custo menor quando da utilização da resazurina, este corante apresenta a vantagem de obter um resultado mais rápido quando comparado ao método das proporções (Palomino *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2005).

Jadaun *et al.* (2007) comparando REMA e o método das proporções (considerado padrão-ouro) para determinação de susceptibilidade ao etambutol em *M. avium* também observaram 98%, 96,7% e 100% de acurácia, sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Em nosso estudo observamos que apenas 24 horas de incubação para adição de resazurina e finalizando a leitura com 48 horas apresentou resultados comparáveis ao teste referência (CLSI, 2011) que necessita de 72 horas de incubação. Os resultados com 72 e 96 horas com a adição de resazurina não mostraram diferenças. Fato que foi relevante para a leitura do teste e determinação da CIM foi a facilidade da leitura pela utilização de um agente revelador quando comparado com a leitura visual do crescimento micobacteriano utilizada no teste referência padronizado pelo CLSI (2011).

A adição de resazurina diretamente no meio de cultura não interferiu no crescimento bacteriano e não resultou modificações nos valores da CIM para os isolados estudados com linezolida e ciprofloxacino quando comparamos com a técnica preconizada pelo CLSI (2011) considerando que a diferença de uma diluição na CIM não é importante, pois essa pode ser devida a erros de diluição.

Nosso resultados estão de acordo com Sarker *et al.* (2007) com micro-organismos não pertencentes ao gênero *Mycobacterium* onde a solução de resazurina foi incluída no meio de cultivo MHB suplementado previamente a incubação com o inóculo bacteriano. De acordo com os autores acima, que testaram a atividade de extratos de plantas observaram que a inclusão da resazurina ao meio previamente a incubação do teste corrige erros de diluição, especialmente em determinações de CIM, além de ter acurácia e ser de fácil reprodutibilidade.

Neste mesmo raciocínio, Coban *et al.* (2005), em estudo para rápida detecção de resistência a vancomicina em enterococo, também fizeram modificações pela adição de resazurina (0,01%) ao meio de cultivo após uma hora de incubação do teste. A CIM pôde ser determinada com maior rapidez (quatro horas de incubação) quando comparada ao método de referência que leva de 18 a 24 horas de incubação para o crescimento bacteriano.

Embora com pequeno número de cepas de MCR, o presente estudo mostra que a adição prévia de resazurina no meio de cultivo, para realização do teste de susceptibilidade à linezolida e ciprofloxacino apresenta concordância com o teste referência. Vale ressaltar as facilidades e condições de biossegurança do REMA modificado, uma vez que a placa não precisa ser reaberta para adição de resazurina o que minimiza a formação de aerossóis.

A modificação de REMA pela utilização de meio de cultivo contendo previamente a resazurina mostrou ser eficiente, reprodutível, rápido, de baixo custo, fácil execução e interpretação na detecção de resistência a linezolida e ciprofloxacino em MCR.

REFERÊNCIAS

Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard- Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, Pa. USA: CLS.

Coban, A.Y., Darka, O., Fisgin, N.T., Cihan, C.C., Bilgin, K., Akgunes, A., Guven, T. Dokuzoguz, B., Birinci, A, Durupinar, B. (2005). The Resazurin Microplate Method for Rapid Detection of Vancomycin Resistance in Enterococci. *J Chemot* **17**, 361-366.

Fonseca, T. L., Groll, A. V., Leitão, G. G., Scaini, C. J., Ramos, D. F., Silva, P. E. A. (2008). Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoense*. *Vitalle* **20**, 65-71.

Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, M., Gilman, R. H. (1998). Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay *J. Clin. Microbiol* **36**, 362-366.

Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K.; Ruoss, S.; Reyn, C. F. v.; Wallace, R. J. Jr; Winthrop, K. (2007).An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous Mycobacterial diseases. *Am J RespCrit Care Med***175**, 367–416.

Jadaun, G. P. S., Agarwal, C., Sharma, H., Ahmed, Z., Upadhyay, P., Faujdar, J., Gupta, A. K., Das, R., Gupta, P., Chauhan, D. S., Sharma, V. D., Katoch, V. M. (2007). Determination of ethambutol MICs for Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium isolates by resazurin microtitre assay. *J Antim Chem* **60**, 152–155.

Lee, S. M., Kim, J. M., Jeong, J., Park, Y. K., Bai, G. H., Lee, E. Y., Lee, M. K., Chang, C. L. (2007). Evaluation of the Broth Microdilution Method Using 2,3-Diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium Chloride for Rapidly Growing Mycobacteria Susceptibility Testing. *J Kor Med Sci* **22**, 784-790.

Martin, A., Morcillo, N., Lemus, D., Montoro, E., Telles, M. A.S., Simboli, N., Pontino, M., Porrás, T., León, C., Velasco, M., Chacon, L., Barrera, L., Ritacco, V., Portaels, F., Palomino, J. C. (2005). Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. *Int J Tuberc Lung Dis***9**, 901–906.

Palomino, J.C., Portaels, F. (1999) .Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J of Clinical. Microb Infect Dis***18**, 380–383.

Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* **42**, 321–324.

Tortoli, E. (2009). Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect***15**, 906–910.

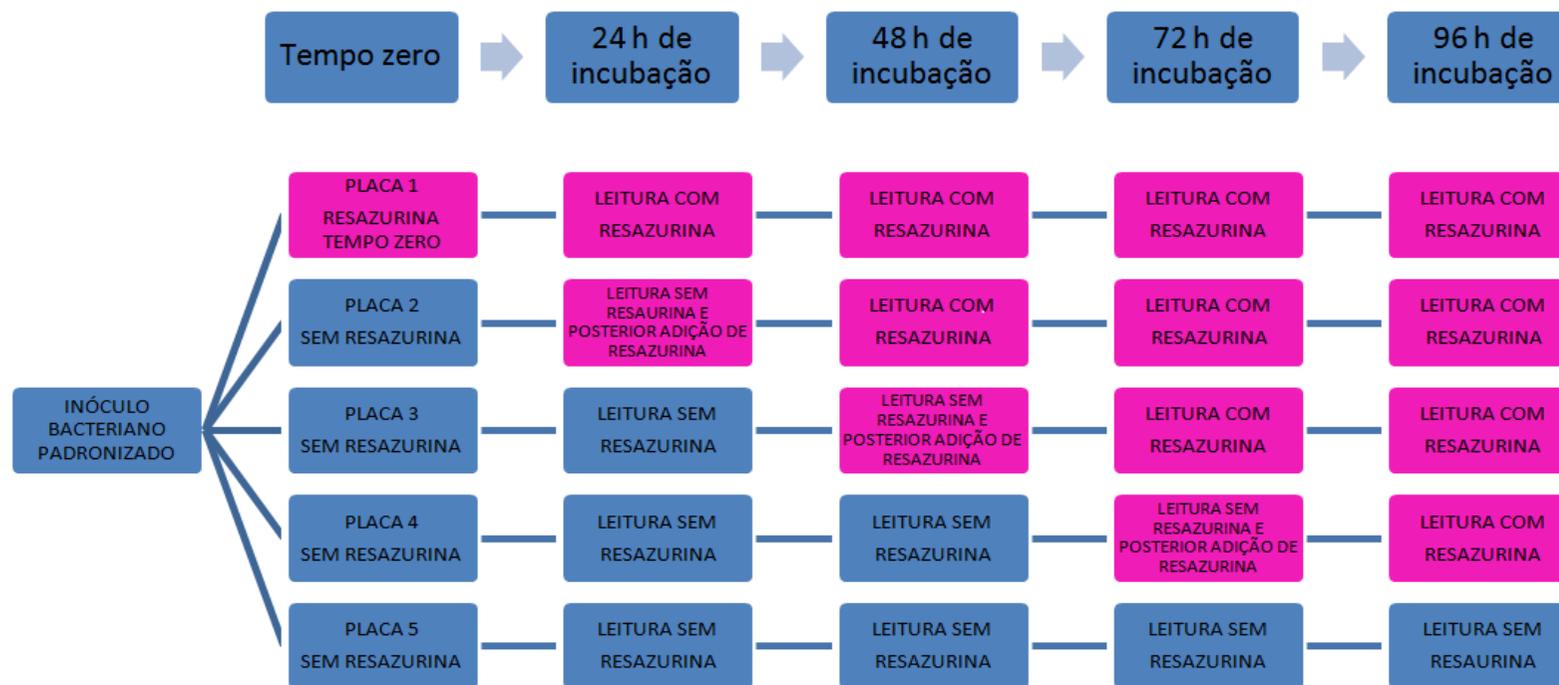


Figura 1. Esquema de leitura das microplacas (REMA) e do teste de referência para determinação da Concentração Inibitória Mínima de ciprofloxacino de linezolid para micobactérias de crescimento rápido. Quadros em rosa representam tempo de adição e placas com resazurina.

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas de linezolida e ciprofloxacino para micobactérias de crescimento rápido utilizando *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) e REMA modificado.

MCR	CIM mg L ⁻¹									
	CLSI		REMA mod.		REMA 48 hs		REMA 72 hs		REMA 96 hs	
	LINE	CIPRO	LINE	CIPRO	LINE	CIPRO	LINE	CIPRO	LINE	CIPRO
<i>M. smegmatis</i>	0,5	0,25	0,25	0,125	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25
<i>M. chelonae</i>	2	0,5	1	0,25	1	0,25	2	0,5	2	0,5
<i>M. fortuitum</i>	8	0,06	4	0,03	4	0,06	4	0,06	8	0,03
<i>M. abscessus</i>	8	0,25	8	0,25	8	0,25	8	0,25	8	0,25

CIM- concentração inibitória mínima; MCR – micobactéria de crescimento rápido; REMA- *resazurin microtiter assay method*; LINE – linezolida; CIPRO- ciprofloxacino; REMA mod. –*resazurin microtiter assay* modificado; CLSI –Clinical and Laboratory Standards Institute -

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Com os resultados preliminares obtidos conclui-se que a modificação introduzida no método REMA, para realização de teste de suscetibilidade à linezolida e ciprofloxacino em micobactérias de crescimento rápido (MCR) apresentou resultados semelhantes ao método preconizado pelo CLSI, sem alterar os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Modificações nas técnicas de susceptibilidade à fármacos vem sendo empregadas em vários campos da microbiologia. Considerando os resultados promissores quanto à modificação proposta no REMA, esta deve ser aplicada a isolados clínicos de micobactérias de crescimento rápido com outros antimicrobianos utilizados para o tratamento das micobacterioses e mesmo em outras espécies de micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Espera-se também que a modificação introduzida no método REMA possa ser aplicada em estudos com *M. tuberculosis*, a fim de facilitar a realização e interpretação do teste de susceptibilidade e proporcionar resultados rapidamente.