

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**TOLERÂNCIA INDUZIDA POR DROGAS: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO *in vitro* DE
ANTIMICROBIANOS EM *Stenotrophomonas maltophilia***

MARIANA ABOU MOURAD FERREIRA

VITÓRIA, ES

2019

MARIANA ABOU MOURAD FERREIRA

**TOLERÂNCIA INDUZIDA POR DROGAS: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO *in vitro* DE
ANTIMICROBIANOS EM *Stenotrophomonas maltophilia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kênia Valéria dos Santos

VITÓRIA, ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A155t Abou Mourad Ferreira, Mariana, 1991-
Tolerância induzida por drogas: efeito da associação in vitro de antimicrobianos em *Stenotrophomonas maltophilia* / Mariana Abou Mourad Ferreira. - 2019.
90 f. : il.

Orientadora: Kênia Valéria dos Santos.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Microbiologia. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. 4. Bactérias gram-negativas. I. dos Santos, Kênia Valéria. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615.1

Mariana Abou Mourad Ferreira

**TOLERÂNCIA INDUZIDA POR DROGAS: EFEITO DA
ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 22/02/2019 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Rodrigo Cayô da Silva / UNIFESP



Prof^ª. Dr^ª. Sarah Gonçalves Tavares / UFES



Prof^ª. Dr^ª. Kênia Valéria dos Santos (orientadora) / UFES

Vitória/ES

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar as condições necessárias para a elaboração deste trabalho.

A toda minha família, incluindo avós, tios e tias, por me incentivarem e contribuírem diretamente e ativamente na construção da minha educação.

Ao meu pai por ser meu porto seguro e meu maior incentivador. À minha mãe, irmãs e sobrinha por estarem sempre presentes. Ao Dyogo pelos tantos anos de apoio e compreensão. Aos meus amigos, pelos conselhos e por entenderem minha ausência.

Agradeço à Kênia, minha orientadora, por abrir as portas do laboratório e contribuir com meu aprendizado com muita paciência e dedicação. Serei sempre grata pelos ensinamentos e por estes anos de parceria.

Agradeço à Prof.^a Sarah Gonçalves e ao Prof. Rodrigo Cayô pela contribuição e pareceria nos testes moleculares realizados. Aos professores e demais servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo aprendizado.

Agradeço aos amigos do BioMA-lab pela convivência e colaboração; em especial à Maria Luíza, que foi meu braço direito na realização dos meus experimentos. Agradeço também aos técnicos e demais servidores do Departamento de Patologia pela disponibilidade em ajudar.

A minha banca examinadora pela contribuição e disponibilidade de tempo para avaliação deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço às agências financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), por fornecerem subsídios para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Introdução: A tolerância bacteriana caracteriza-se pela habilidade de uma população microbiana em sobreviver a altas concentrações de uma droga bactericida sem que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seja alterada. Ao término do tratamento antimicrobiano, as cepas tolerantes voltam a se multiplicar, podendo causar infecções recalcitrantes e facilitar a resistência. Muitos estudos relacionam a exposição a antimicrobianos com a indução de tolerância. Embora observada em diversas espécies bacterianas, a tolerância ainda não foi investigada para o bacilo oportunista *Stenotrophomonas maltophilia*, comumente exposto no cenário clínico a diversos antimicrobianos sem ação sobre este patógeno. Desta forma, nosso objetivo foi investigar se o uso prévio de determinados antimicrobianos não direcionados induz tolerância cruzada em *S. maltophilia*. **Materiais e métodos:** Para avaliar possíveis antimicrobianos indutores de tolerância foram feitos ensaios de triagem qualitativa e quantitativa. Nestes ensaios, expomos a cepa *S. maltophilia* ATCC® 13637™ às drogas daptomicina (DAP), vancomicina (VAN) e gentamicina (GEN) e avaliamos a ocorrência de tolerância cruzada frente às drogas específicas contra *S. maltophilia*: sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), ceftazidima (CAZ) e levofloxacina (LVX). Após a triagem, as cepas com características de tolerância induzida foram testadas quanto à similaridade genética por meio de ERIC-PCR. Para excluir a hipótese de contaminação e confirmar o gênero e a espécie das cepas, foi realizado o MALDI-TOF MS. Para avaliação da tolerância foram realizados os seguintes ensaios: determinação da razão Concentração Bactericida Mínima (CBM)/Concentração Inibitória Mínima (CIM) para LVX; teste de disco-difusão adaptado para SXT, CAZ, LVX, ticarcilina-clavulanato (TCC), cloranfenicol (CLO), minociclina (MIN) e polimixina B (PXB) e curva de tempo de morte para LVX, CAZ e ciprofloxacina (CIP). **Resultados:** Após indução da cepa parental ATCC® 13637™ à DAP e à VAN, três cepas potencialmente tolerantes (D25, V15,6 e V3,9) foram isoladas, cuja similaridade genética com a parental foi comprovada por ERIC-PCR (100% de similaridade). As cepas induzidas mantiveram o mesmo valor da CIM de LVX que a cepa parental (0,125 µg/mL), com a razão CBM/CIM variando de 2,64 a 3,04 entre as cepas induzidas. No teste de disco-difusão adaptado, a cepa D25 mostrou alta tolerância para LVX, CAZ e TCC. Nas curvas de tempo de morte em

fase estacionária frente à 50 vezes a CIM de LVX, a cepa D25 apresentou tempo mínimo para morte de 99,99% da população total ($MDK_{99,99}$) maior que o da parental. A taxa de sobrevivência também foi maior para a cepa D25 na presença de CAZ (50xCIM). De modo geral, a cepa D25 apresentou maior taxa de sobrevivência em todas as curvas de tempo de morte, exceto para CIP. **Conclusões:** Encontramos resultados consistentes de que a exposição prévia de *S. maltophilia* à daptomicina induz tolerância cruzada à levofloxacina, ceftazidima e ticarcilina-clavulanato. Assim, uma terapia empírica equivocada com daptomicina poderia levar à falha destes antimicrobianos em erradicar *S. maltophilia*, culminando em infecções crônicas ou óbito por uma subpopulação de microrganismos tolerantes.

Palavras-chave: *Stenotrophomonas maltophilia*. Tolerância. Persistência. Daptomicina.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial tolerance is characterized by the ability of a microbial population to survive the high concentrations of a bactericidal drug without alteration in the Minimum Inhibitory Concentration. At the end of the antimicrobial treatment, the tolerant strains multiply again, which may cause recalcitrant infections and facilitate resistance. Many studies relate antimicrobial exposure to tolerance induction. Although observed in several species, tolerance has not yet been investigated for the opportunistic bacillus *Stenotrophomonas maltophilia*, commonly exposed in the clinical scenario to antibiotics that have no action on this pathogen. Thus, our objective was to investigate whether the prior use of certain non-targeted antimicrobials induces cross-tolerance in *S. maltophilia*.

Materials and methods: Qualitative and quantitative screening tests were performed to evaluate possible tolerance-inducing antimicrobials. In these assays, we exposed the *S. maltophilia* ATCC® 13637™ to daptomycin (DAP), vancomycin (VAN) and gentamicin (GEN) and evaluated the occurrence of cross-tolerance to the following drugs targeting *S. maltophilia*: sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT), ceftazidime (CAZ) and levofloxacin (LVX). After the screening, strains with tolerance-induced characteristics were tested for genetic similarity by ERIC-PCR. To exclude the contamination hypothesis and confirm the genus and species of the strains, the MALDI-TOF MS was performed. To evaluate tolerance, the following tests were carried out: determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) / Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ratio for LVX; adapted disk-diffusion test for SXT, CAZ, LVX, ticarcillin-clavulanate (TCC), chloramphenicol (CLO), minocycline (MIN) and polymyxin B (PXB) and time-kill curve for LVX, CAZ and ciprofloxacin (CIP).

Results: After induction of the parental strain ATCC® 13637™ to DAP and VAN, three potentially tolerant strains (D25, V15.6 and V3.9) were isolated, whose genetic similarity to parental was confirmed by ERIC-PCR (100% similarity). The induced strains maintained the same MIC value of LVX as the parental strain (0.125 µg/mL), with the MBC/MIC ratio ranging from 2.64 to 3.04 among the induced strains. In the adapted disc-diffusion test, strain D25 showed high tolerance for LVX, CAZ and TCC. In the stationary phase time-kill curves against 50 times the MIC of LVX, strain D25 presented a minimum duration for killing 99,99% of all population (MDK_{99,99}) higher

than the parental. The survival rate was also higher for the D25 strain in the presence of CAZ (50xMIC). In general, strain D25 had a higher survival rate in all time-kill curves, except for CIP. **Conclusions:** Previous exposure of *S. maltophilia* to daptomycin induces cross-tolerance to levofloxacin, ceftazidime and ticarcillin-clavulanate. Thus, erroneous empirical therapy with daptomycin could lead to the failure of these antimicrobials to eradicate *S. maltophilia*, culminating in chronic infections or death by a subpopulation of tolerant microorganisms.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*. Tolerance. Persistence. Daptomycin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma para identificação de bactérias resistentes, sensíveis, tolerantes e persistentes	26
Figura 2 – Curvas de tempo de morte de bactérias sensíveis, tolerantes (A) e persistentes (B) na presença de antimicrobiano bactericida em altas concentrações..	29
Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental.....	34
Figura 4 - Esquema de diluição seriada e plaqueamento de microgota em ágar BHI para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.....	35
Figura 5 – Esquema de distribuição dos antimicrobianos indutores na microplaca de 96 poços para ensaio de indução de tolerância por drogas.....	37
Figura 6 - Adaptação do replicador bacteriano utilizando 96 pinos de aço acoplados em suporte para ponteiras (A). Placa com ágar Mueller-Hinton sem adição de antimicrobiano, mostrando o crescimento em <i>spot</i> do inóculo bacteriano após exposição aos antimicrobianos indutores (B).	38
Figura 7 – Esquema do ensaio de triagem qualitativa de tolerância induzida por antimicrobianos.....	38
Figura 8 – Esquema do ensaio de triagem quantitativa de tolerância induzida por antimicrobianos.....	40
Figura 9 - Esquema do ensaio de disco-difusão adaptado.....	46
Figura 10 – Curva de crescimento da cepa parental de <i>S. maltophilia</i> (ATCC 13637).	50
Figura 11 – Crescimento (24 h) em ágar Mueller-Hinton (MH) sem antimicrobiano da cepa <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> previamente exposta a daptomicina (DAP), vancomicina (VAN) e gentamicina (GEN) em diferentes concentrações por 180 min.	52
Figura 12 – Crescimento (92 h) em <i>spot</i> das cepas expostas a daptomicina (DAP), a vancomicina (VAN) e a gentamicina (GEN) em ágar Mueller-Hinton (MH) contendo os antimicrobianos alvo levofloxacina (LVX), ceftazidima (CAZ) e sulfametoxazol/trimetoprim (SXT).	53
Figura 13 - Crescimento de <i>S. maltophilia</i> na presença de levofloxacina (LVX) após exposição a daptomicina (DAP) e vancomicina (VAN).	54

Figura 14 - Dendrograma gerado pelo software “GelJ” das cepas parental e induzidas (V3,9; V15,6 e D25) de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> após ERIC-PCR .	55
Figura 15 - Subcultivo, em ágar BHI, do conteúdo dos poços da placa de microdiluição contendo 0,25 µg/mL de levofloxacina (LVX).	56
Figura 16 - Crescimento de colônias tolerantes após teste de disco-difusão adaptado em ágar Mueller-Hinton.	58
Figura 17 – Teste de disco-difusão adaptado de levofloxacina (LVX), ceftazidima (CAZ) e ticarcilina/clavulanato (TCC) para as cepas parental e induzida.	59
Figura 18 – Teste de disco-difusão adaptado de cloranfenicol (CLO), minociclina (MIN), polimixina B (PXB) e sulfametoxazol/trimetoprim (SXT) para as cepas parental e induzida D25.	59
Figura 19 – Diâmetro do halo de inibição das cepas <i>S. maltophilia</i> parental (ATCC 13637) e induzidas por vancomicina (V3,9 e V15,6) na primeira etapa do teste de disco-difusão adaptado (primeiras 24 h).	60
Figura 20 - Cinética de morte em presença de levofloxacina (LVX) (50 vezes a Concentração Inibitória Mínima [CIM] = 6,25 µg/mL) das cepas <i>S. maltophilia</i> parental (ATCC 13637) e induzida por 25 µg/mL de daptomicina (D25), com inóculo inicial em fase estacionária de crescimento.	62
Figura 21 – Cinética de morte em presença de 50 vezes a Concentração Inibitória Mínima (50xCIM = 6,25 µg/mL) (a) e 100xCIM (12,5 µg/mL) (b) de levofloxacina (LVX) das cepas <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> parental (ATCC 13637) e induzida por 25 µg/mL de daptomicina (D25), com inóculo inicial em fase exponencial (a) e estacionária (b) de crescimento	63
Figura 22 - Cinética de morte em presença de 50 vezes a Concentração Inibitória Mínima (50xCIM = 200 µg/mL) de ceftazidima (CAZ) (a) e 6,25 µg/mL de ciprofloxacina (CIP) (b) das cepas <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> parental (ATCC 13637) e induzida por 25 µg/mL de daptomicina (D25), com inóculo inicial na fase estacionária de crescimento.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Mistura de Reagentes para ERIC-PCR.	42
Quadro 2 – Condições de amplificação para o <i>fingerprinting</i> bacteriano por ERIC-PCR.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade testada de cada antimicrobiano nos discos do ensaio de disco-difusão adaptado.	47
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de levofloxacina para as cepas parental e induzidas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATM – Antimicrobiano

BHI – infusão de cérebro e coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)

BioMA-lab – Laboratório de Biologia dos Microrganismos e Antimicrobianos

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CAMHB – Mueller-Hinton ajustado com cátions

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAZ – Ceftazidima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CC – Controle de crescimento

CE – Controle de esterilidade

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLO – Cloranfenicol

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

D25 – Cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637) induzida a 25 µg/mL de daptomicina

DAP – Daptomicina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo

DO – Densidade Óptica

ERIC-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Sequências Repetitivas Enterobacterianas Intergênicas de Consenso

FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

GEN – Gentamicina

h – Hora

L – Litro

Log – Logaritmo

LVX – Levofloxacina

µg - micrograma

MALDI-TOF MS – Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz Tempo de voo (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*)

MDK – Tempo Mínimo para Morte (do inglês, *Minimum Duration for Killing*)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MH – Mueller-Hinton

μL – microlitro

μg – micrograma

mg – miligrama

mL – mililitro

mim – minutos

mm - milímetros

mM – milimolar

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

ng – nanograma

nm – nanômetros

p – Probabilidade de significância

P.A. – *Pro analyse* (puro para análise)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PXB – Polimixina B

p/v – Peso/Volume

q.s.p – Quantidade suficiente para

® – marca registrada

RNA: Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SXT – Sulfametoxazol/Trimetoprim

TBE – Tris borato EDTA

TCC – Tic arcilina/Clavulanato

TDtest – teste de detecção de tolerância (do inglês, *Tolerance Detection Test*)

™ – *Trade mark*

TSB – Caldo Tríptico de Soja (do inglês, *Tryptic Soy Broth*)

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

VAN – Vancomicina

V3,9 – Cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637) induzida por 3,9 µg/mL de vancomicina

V15,6 – Cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637) induzida por 15,6 µg/mL de vancomicina

x – vezes

°C – Graus *Celsius*

% – Por cento

> Maior

< Menor

≥ Maior que ou igual a

≤ Menor que ou igual a

= igual

~ aproximadamente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	TOLERÂNCIA BACTERIANA	18
1.1.1	Definição, classificação e importância clínica da tolerância bacteriana.	18
1.1.2	Tolerância bacteriana induzida por antimicrobianos	20
1.2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21
1.2.1	Caracterização e importância clínica	21
1.2.2	Tratamento de infecções causadas por <i>S. maltophilia</i> e tolerância induzida por drogas	23
1.3	MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DE TOLERANTES/PERSISTENTES	25
1.3.1	Razão CBM/CIM.....	26
1.3.2	<i>Tolerance Detection Test</i> (TDtest).....	27
1.3.3	MDK ₉₉ e MDK _{99.99}	28
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS E ANTIMICROBIANOS	32
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.3	PROCEDIMENTOS ESPECÍFICOS.....	34
4.3.1	Cinética de crescimento de <i>S. maltophilia</i>	34
4.3.2	Triagem de tolerância induzível	35
4.3.3	Caracterização molecular das amostras induzidas	40
4.3.4	Determinação da tolerância pela razão CBM/CIM	44
4.3.5	Determinação da tolerância pelo teste de disco-difusão adaptado	45
4.3.6	Determinação da tolerância pela curva de tempo de morte	47

4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS.....	50
5.1	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA CEPA PARENTAL DE <i>S. maltophilia</i>	50
5.2	TRIAGEM DE TOLERÂNCIA INDUZÍVEL.....	51
5.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS INDUZIDAS	54
5.4	DETERMINAÇÃO DO VALOR DA CIM E CBM	55
5.5	TESTE DE DISCO-DIFUSÃO ADAPTADO PARA DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA BACTERIANA	57
5.6	CURVA DE TEMPO DE MORTE	60
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÕES.....	73
8	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 TOLERÂNCIA BACTERIANA

1.1.1 Definição, classificação e importância clínica da tolerância bacteriana

A tolerância bacteriana caracteriza-se pela habilidade de uma população microbiana em sobreviver a altas concentrações de uma droga bactericida sem que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seja alterada (LI et al., 2017). Em outras palavras, o antimicrobiano bactericida passa a ter efeito bacteriostático, apenas impedindo o crescimento da população, sem exterminá-la por completo (KALDALU; HAURYLIUK; TENSON, 2016; LEWIS, 2007). A razão para isso é que os microrganismos tolerantes estão em estado temporário de crescimento lento e metabolismo reduzido, acarretando em baixa entrada da droga na célula ou inatividade de seus alvos (LEWIS; SHAN, 2017). A tolerância é uma variação fenotípica de uma população geneticamente idêntica e é causada por fatores estocásticos e/ou ambientais, aos quais os microrganismos detectam e reagem (EL MEOUCHE; SIU; DUNLOP, 2016; VOGWILL et al., 2016).

Quando a tolerância está presente em apenas uma subpopulação, geralmente menor que 1% do total, ela é denominada como “persistência” (BRAUNER et al., 2016). Ela é constatada através da característica bifásica da curva de tempo de morte na presença de um antimicrobiano bactericida, em que a maior parte da população morre rapidamente, enquanto que uma subpopulação clonal persiste por longos períodos (BRAUNER et al., 2016). Esta característica fenotípica já foi identificada em inúmeras espécies bacterianas de interesse clínico (BERGH; FAUVART; MICHIELS, 2017; COHEN; LOBRITZ; COLLINS, 2013; MICHIELS et al., 2016), incluindo as de prioridade crítica e alta para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Brauner e colaboradores (2016) propuseram a existência de dois tipos de tolerância bacteriana a antimicrobianos: por crescimento lento e por fase “lag”. O primeiro tipo é definido como um fenótipo de fase estacionária, no qual há uma queda no ritmo

total de crescimento, que pode ser herdado (p. ex. bactérias cujo crescimento lento é inerente, como a *Mycobacterium tuberculosis*) ou não (p. ex. condições externas, como crescimento em biofilme) (BRAUNER et al., 2016). A tolerância por fase *lag* é uma característica transitória de parada no crescimento ocasionada por uma adaptação a um novo ambiente (BRAUNER et al., 2016). Por outro lado, a persistência é classificada como tempo-dependente (persistência por crescimento lento e persistência por fase *lag*) e dose-dependente (BRAUNER et al., 2016; LI et al., 2017). Em termos moleculares, a persistência tempo-dependente é similar à tolerância, enquanto que a dose-dependente apresenta características de resistência, por exemplo pela superexpressão de sistemas de efluxo em uma subpopulação bacteriana (CABRAL; WURSTER; BELENKY, 2018).

Embora identificada e descrita há décadas (HANDWERGER; TOMASZ, 1985; HOBBY; MEYER; CHAFFEE, 1942; TOMASZ; ALBINO; ZANATI, 1970), a tolerância bacteriana é uma estratégia de sobrevivência negligenciada na rotina clínica, já que, por não existirem métodos adequados para sua identificação, as cepas tolerantes são classificadas como sensíveis nos métodos de susceptibilidade convencionais. Entretanto, nos últimos anos, a tolerância vem ganhando destaque, sendo implicada em falhas terapêuticas e como precursora da resistência bacteriana (BRAUNER et al., 2016). Dentre os fatores que tornam a tolerância um fenômeno de relevância clínica, destaca-se a capacidade destes microrganismos em sobreviver a terapia antimicrobiana e recrescer após seu término, causando infecções crônicas e recorrentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos (COHEN; LOBRITZ; COLLINS, 2013; HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016). Além disso, pesquisadores recentemente demonstraram que a evolução da tolerância pode levar a mutações que geram uma resistência parcial, elevando a ocorrência de uma resistência total (LEVIN-REISMAN et al., 2017). Ademais, o número de genes implicados na tolerância é substancialmente maior do que aqueles implicados com a resistência, o que sugere que a evolução da tolerância pode ocorrer mais rapidamente do que a evolução da resistência (COHEN; LOBRITZ; COLLINS, 2013; LEWIS; SHAN, 2017).

1.1.2 Tolerância bacteriana induzida por antimicrobianos

Existem muitos dados na literatura relacionando a exposição bacteriana a antimicrobianos com a aquisição de resistência (HUGHES; ANDERSSON, 2017; KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010; ONG et al., 2011); porém, pouco se sabe se esta exposição pode induzir também a tolerância. Por ser uma adaptação a ambientes estressantes, a tolerância pode surgir em resposta à pressão seletiva, incluindo a exposição intermitente a antimicrobianos (JOHNSON; LEVIN, 2013; VOGWILL et al., 2016).

Na última década, alguns estudos comprovaram a influência dos antimicrobianos no aumento da tolerância e persistência de populações bacterianas. Haaber e colaboradores (2015), estudando isolados de *Staphylococcus aureus*, afirmaram que a tolerância induzida por drogas é normalmente reversível, pois na ausência de antimicrobianos as cepas tolerantes recuperaram o estado metabolicamente ativo. Fridman e colaboradores (2014) constataram que cepas de *E. coli* expostas intermitentemente a altas concentrações de ampicilina aumentaram o tempo da sua fase *lag* de forma a corresponder ao intervalo entre as doses da droga, resultando na falha terapêutica. Os experimentos de Johnson e Levin (2013) mostraram que cepas de *S. aureus* pré-tratadas com concentrações subinibitórias de gentamicina, ciprofloxacina, oxacilina ou vancomicina tiveram um aumento no nível de persistência a pelo menos um destes antimicrobianos citados. Dörr, Lewis e Vulic (2009) mostraram que cepas *E. coli* previamente expostas a ciprofloxacina tiveram um aumento da persistência através da indução do sistema de reparo de DNA “SOS”. Nestes estudos, os autores excluem a hipótese de que este nível de persistência já estava presente antes da exposição aos antimicrobianos, portanto esta foi capaz de induzir e não só selecionar populações persistentes.

Entretanto, a tolerância induzida por drogas ainda não foi pesquisada para outras bactérias igualmente expostas a antimicrobianos rotineiramente. Além disso, pelo fato de a tolerância ser particularmente um problema em indivíduos com o sistema imunitário comprometido, é vital a pesquisa deste fenômeno em microrganismos oportunistas.

1.2 *Stenotrophomonas maltophilia*

1.2.1 Caracterização e importância clínica

Stenotrophomonas maltophilia (anteriormente classificada como *Xanthomonas* e *Pseudomonas maltophilia*) é um bacilo gram-negativo aeróbio, possui flagelo polar, não fermenta açúcares e é capaz de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas (CHANG et al., 2015; MUKHERJEE; ROY, 2016). Embora seu *habitat* natural seja o meio ambiente (p. ex. solo, raízes de plantas, rios e lagos), este patógeno oportunista vem sendo cada vez mais isolado de infecções nosocomiais, sendo responsável por uma elevada mortalidade, principalmente em pacientes com comorbidades (ALMEIDA, 2005; CHANG et al., 2015).

S. maltophilia é a única espécie do gênero causadora de infecções em humanos, sendo associada principalmente a infecções pulmonares e bacteremias (BROOKE, 2012; RYAN et al., 2009). Os principais fatores de risco para infecções por este patógeno são imunidade baixa do hospedeiro, fibrose cística, uso de ventilação mecânica e cateteres vasculares e uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro (AL-ANAZI; AL-JASSER, 2014; BROOKE, 2012). Sua patogênese ocorre preferencialmente por colonização acompanhada de invasão tecidual (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017). Este microrganismo já foi encontrado colonizando o trato gastrointestinal (JUHÁSZ et al., 2014; KERR; CORPS; HAWKEY, 1991), o trato respiratório, o trato urinário, os olhos, feridas na pele e nariz (JUHÁSZ et al., 2014).

Suas rotas de transmissão envolvem contato com material hospitalar contaminado, como torneiras, pias, respiradores e cateteres, e, em menor proporção, a contaminação de pessoa-a-pessoa, como contato com mãos de profissionais de saúde contaminadas (DENTON; KERR, 1998; GUYOT; TURTON; GARNER, 2013). A capacidade de formação de biofilme é um fator fundamental para sua colonização em dispositivos médicos invasivos, tais como cateteres e válvulas, e aparelhos usados na ventilação mecânica (RYAN et al., 2009). Além disso, devido a sua preferência por ambientes úmidos, *S. maltophilia* pode contaminar a água usada na diálise, liberando pirógenos que não são retidos pelo filtro das máquinas e podendo

causar reações de choque nos pacientes (DENTON; KERR, 1998). No caso dos pacientes com fibrose cística, o acúmulo de muco nos pulmões fornece um ambiente nutritivo ideal para o crescimento e formação de biofilme por este bacilo, além de servir como uma barreira contra a entrada de antimicrobianos e células do sistema imunitário (BROOKE, 2012).

Entre 2008 e 2010, *S. maltophilia* foi classificada como uma das dez bactérias mais frequentes em casos de pneumonia em centros médicos de quatro países da América Latina, incluindo o Brasil (GALES et al., 2012). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou este patógeno como uma das principais bactérias resistentes a antimicrobianos encontradas no hospital (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). *S. maltophilia* é um patógeno negligenciado nas unidades de hemodiálise, causando principalmente infecções relacionadas ao cateter (DE MAURI et al., 2014). Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, este foi o bacilo gram-negativo mais isolado de bacteremias (13%, n=29) de pacientes em tratamento hemodialítico de três clínicas da Grande Vitória, ES, entre 2012 a 2014 (VITÓRIA, 2015).

As taxas de mortalidade de pacientes com bacteremia por este microrganismo nos estudos encontrados variaram de 33 a 66% (ARAOKA; BABA; YONEYAMA, 2010; DE MAURI et al., 2014; LAI et al., 2004). No estudo observacional realizado entre 1998-2001 em hospital na França, a taxa de mortalidade entre os 30 pacientes com infecção por *S. maltophilia* em unidade de tratamento intensivo foi de 70% (n=21), sendo que 80% (n=24) do total de pacientes apresentaram colonização por este bacilo antes de adquirirem infecção (NSEIR et al., 2006). O estudo retrospectivo de Garcia Paez e colaboradores (2008), por sua vez, mostrou resultados ainda mais alarmantes, com 75% (n=45) de mortalidade para pacientes com bacteremia ou pneumonia infectados por *S. maltophilia*. Apesar do mencionado ressaltar a relevância deste microrganismo como patógeno hospitalar, *S. maltophilia* continua sendo negligenciado na rotina clínica, seja por falta de políticas para prevenção ou escolha de um tratamento adequado para infecções por este bacilo.

1.2.2 Tratamento de infecções causadas por *S. maltophilia* e tolerância induzida por drogas

As infecções por *S. maltophilia* são de difícil tratamento devido a sua resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos, comum em bactérias ambientais em consequência de uma alta pressão seletiva (RYAN et al., 2009). Seus fatores inerentes de resistência são: membrana relativamente impermeável típica de bactérias gram-negativas, presença de β -lactamases, bombas de efluxo e enzimas modificadoras de drogas (BROOKE, 2012; PEREZ; ADACHI; BONOMO, 2014).

Os antimicrobianos indicados pelo CLSI (2018) para os testes de susceptibilidade de *S. maltophilia* são, nesta ordem de prioridade: sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), ceftazidima (CAZ), levofloxacina (LVX), minociclina (MIN) e cloranfenicol (CLO). Polimixina B (PXB) e ticarcilina/clavulanato (TCC), embora não constem nesta lista, são opções de fármacos testados em alguns estudos (FALAGAS et al., 2008; MALINOWSKI et al., 2017). A partir do final dos anos 90, os programas mundiais de vigilância e estudos multicêntricos começaram a fornecer informações mais abrangentes sobre a patogenicidade e a susceptibilidade de *S. maltophilia* aos antimicrobianos, sendo os mais conhecidos o Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY, iniciado em 1997, e o Estudo de Monitoramento de Tendências de Resistência Antimicrobiana (SMART), iniciado em 2002 (CHANG et al., 2015). Apesar de relatos de resistência (PEREZ; ADACHI; BONOMO, 2014), *S. maltophilia* continua altamente suscetível a SXT que permanece sendo a droga de escolha para o tratamento de infecções por este microrganismo (GALLO et al., 2016; ISMAIL et al., 2017; WANG et al., 2014). No contexto mundial, a maioria dos isolados é suscetível à levofloxacina e cloranfenicol (GALLO et al., 2016; NICODEMO, 2004). Por outro lado, a ceftazidima, que historicamente apresentava bons resultados contra *S. maltophilia*, mostra tendência alarmante de resistência, com taxas superiores a 50% (CHANG et al., 2015; GALES et al., 2001).

Em pacientes críticos com sinais e sintomas de infecção, a terapia inicial é normalmente empírica, ou seja, a escolha dos antimicrobianos é baseada na apresentação clínica do paciente e nos dados locais de susceptibilidade a antimicrobianos (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011). Esta terapia, iniciada

imediatamente após a coleta de espécime biológica para diagnóstico, consiste no uso de agentes de amplo espectro de ação, sendo usualmente uma associação de uma droga contra bactérias gram-positivas e outra contra gram-negativas (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011). Episódios de bacteremias são frequentes em pacientes em tratamento hemodialítico, principalmente quando o acesso vascular via cateter se torna colonizado. Nesta população, a terapia empírica consiste em usar vancomicina para cobrir bactérias gram-positivas e um aminoglicosídeo (gentamicina) ou cefalosporina de terceira geração (ceftazidima) para cobrir as gram-negativas (ALLON, 2009; MERMEL et al., 2009). Considerando a terapia empírica padrão preconizada, temos uma situação de não cobertura deste microrganismo, dada a elevada frequência de resistência à ceftazidima e resistência intrínseca à gentamicina.

Estudos *in vitro* relatam que a terapia combinada é mais efetiva que a monoterapia contra *S. maltophilia*, apesar da ausência de ensaios clínicos sobre este sinergismo (LOONEY; NARITA; MÜHLEMANN, 2009). Conforme a susceptibilidade de *S. maltophilia*, a terapia prolongada (2-4 semanas) com, pelo menos, dois antimicrobianos sistêmicos (aminoglicosídeo mais LVX, CAZ ou SXT) e bloqueio do cateter por instilação com gentamicina ou ceftazidima pode resolver a infecção e salvar o cateter no paciente em tratamento hemodialítico (DE MAURI et al., 2014).

Além da terapia empírica inadequada, outra situação na qual *S. maltophilia* pode ser exposta a antimicrobianos aos quais é intrinsecamente resistente é no tratamento de infecções polimicrobianas. As bacteremias, especialmente aquelas relacionadas ao cateter, são tipos de infecções frequentemente polimicrobianas, nas quais mais de um microrganismo é responsável pela enfermidade (LOONEY; NARITA; MÜHLEMANN, 2009). De fato, *S. maltophilia* pode não ser o único patógeno envolvido na infecção, sendo frequentemente acompanhada por gram-positivos, principalmente *Enterococcus faecalis* (DE MAURI et al., 2014). Nestes casos, há uma maior dificuldade em se isolar os patógenos, seja pela difícil distinção entre microrganismos contaminantes e colonizadores, ou pelo fato das colônias, como as de *S. maltophilia*, serem pequenas e de crescimento lento (BROOKE, 2012; LOONEY; NARITA; MÜHLEMANN, 2009). Um estudo retrospectivo de 84 casos de

bacteremia por *S. maltophilia* entre 1999 e 2003 de um hospital em Taiwan mostrou que 27% (n=23) destas infecções eram polimicrobianas, sendo que a maioria dos pacientes estudados fazia uso de cateter (83%, n= 70) (LAI et al., 2004). Já no estudo realizado entre 2009 e 2011 em um Laboratório na Hungria, do total de 160 isolados *S. maltophilia* investigados, provenientes de casos de infecção e colonização, mais da metade (68%, n=109) foi isolado junto a outro microrganismo (JUHÁSZ et al., 2014).

S. maltophilia também é um patógeno emergente nas infecções respiratórias de pacientes com fibrose cística. Nesta condição, é comum a ocorrência de infecções crônicas recidivantes. Esta cronicidade é atribuída, pelo menos em parte, ao crescimento lento dos microrganismos dentro de biofilmes, caracterizando a tolerância bacteriana (ESPOSITO et al., 2017). Recidivas também são comuns nas bacteremias de pacientes em tratamento hemodialítico e a sobrevivência de microrganismos tolerantes pode igualmente ser um fator predisponente para a reativação das infecções, especialmente no paciente imunossuprimido.

Ainda não foi investigado se a exposição de *S. maltophilia* a antimicrobianos aos quais é intrinsecamente resistente, seja na terapia empírica inadequada ou na terapia de infecções polimicrobianas, pode levar ao fenômeno de tolerância induzida por drogas, como já relatado para outros grupos de microrganismos (DÖRR; LEWIS; VULIĆ, 2009; FRIDMAN et al., 2014; HAABER et al., 2015; JOHNSON; LEVIN, 2013).

1.3 MÉTODOS *IN VITRO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE TOLERANTES/PERSISTENTES

Atualmente, nenhum método utilizado na rotina clínica é capaz de identificar uma bactéria tolerante. Pelo contrário, os métodos de susceptibilidade a antimicrobianos por disco-difusão e microdiluição em caldo erroneamente as identificam como sensíveis. Brauner e colaboradores (2016) propuseram um fluxograma de experimentos a fim de identificar uma cepa quanto a resistência, sensibilidade e os tipos de tolerância e persistência (Figura 1).

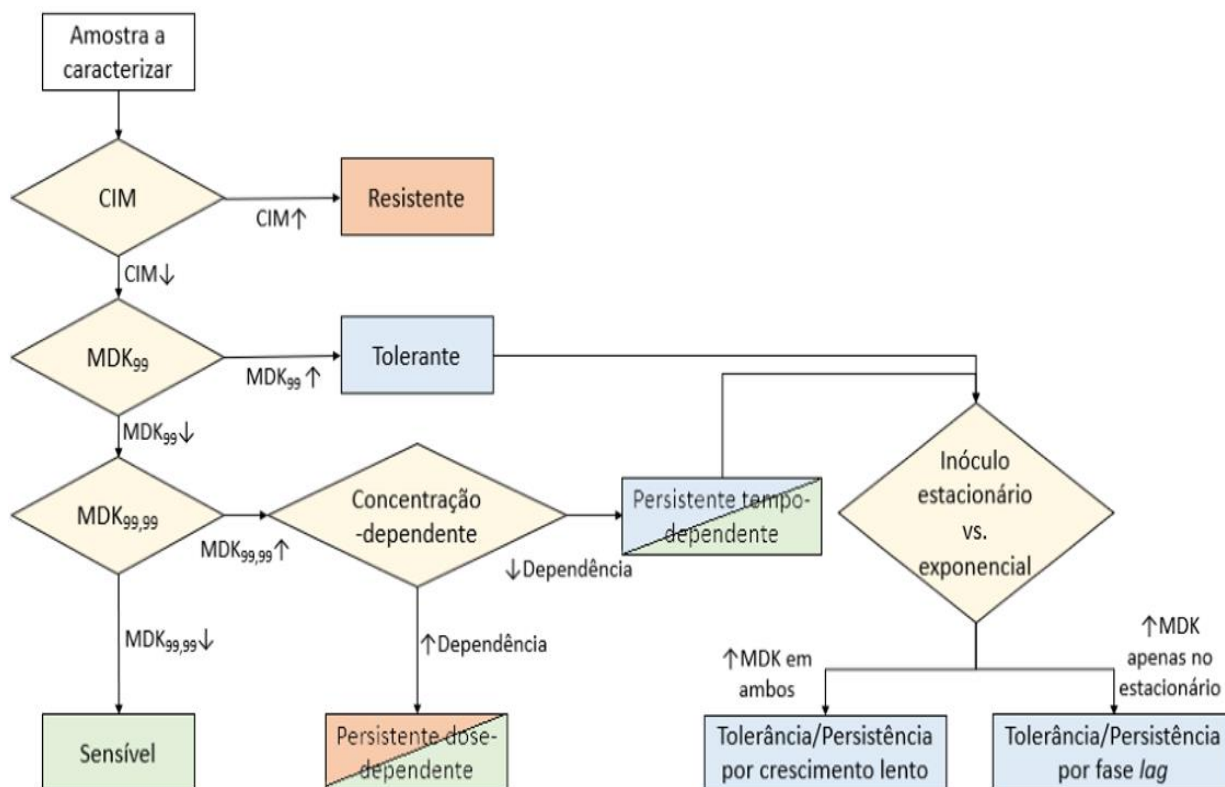


Figura 1 – Fluxograma para identificação de tolerantes e persistentes. O primeiro teste é o de susceptibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo, realizado tanto na amostra de interesse quanto na cepa sensível de referência. Caso a amostra apresente Concentração Inibitória Mínima (CIM) substancialmente maior que a cepa de referência, ela é resistente. Caso apresente CIM igual a cepa de referência, é realizado o teste de curva de tempo de morte. Se a amostra testada apresentar Tempo Mínimo para Morte de 99% da população (MDK_{99}) maior que o da cepa de referência, ela é classificada como tolerante. Entretanto, se o MDK_{99} for igual, mas o $MDK_{99,99}$ da amostra for maior que o da cepa de referência, ela é então classificada como persistente. Caso a amostra apresente dependência entre a concentração e o tempo de morte, ela é classificada como persistente do tipo dose-dependente. Para classificar as tolerantes e a persistente tempo-dependente, é realizada curva de morte para o inóculo em fase estacionária e inóculo em fase exponencial. Se o MDK for alto em ambas as curvas, a tolerância/persistência é do tipo crescimento lento; se o MDK for alto apenas na curva de inóculo estacionário, a tolerância/persistência é por fase lag.

Fonte: Adaptado de Brauner e colaboradores (2016).

1.3.1 Razão CBM/CIM

A CIM de cepas tolerantes é similar às cepas sensíveis, entretanto, sua Concentração Bactericida Mínima (CBM) tende a ser alta; sendo assim, quando a razão CBM/CIM de um antimicrobiano for maior ou igual a 32, a cepa é classificada como tolerante (BARRY et al., 1999; TUOMANEN; DURACK; TOMASZ, 1986). De acordo com Brauner e colaboradores, esta medida é normalmente utilizada para

avaliar a tolerância tipo droga-induzida, sendo pouco relacionada a outros tipos de tolerância (2016). Entretanto, esse método é considerado pouco sensível e reprodutível, apresentando inúmeras vieses, como produção de falsos tolerantes (quando o teste é feito com amostras na fase estacionária ou no caso de subpopulações resistentes) e por não informar a taxa de morte bacteriana nas 24 horas antecedentes ao teste da CBM (HANDWERGER; TOMASZ, 1985). Além disso, estudos antigos já questionavam a relevância clínica da CBM devido à arbitrariedade com que seu ponto de corte foi definido (MEYLAN; FRANCIOLI; GLAUSER, 1986; WASHINGTON, 1988).

1.3.2 *Tolerance Detection Test (TDtest)*

O TDtest é um método recentemente descrito (GEFEN et al., 2017) consistindo em uma adaptação do teste de susceptibilidade por disco-difusão tradicional (BAUER et al., 1966) e tendo como objetivo detectar cepas tolerantes. Após período de incubação proposto pelo método de disco-difusão, os discos de antimicrobianos são substituídos por discos contendo solução nutriente de glicose a 40%. Portanto, devido a difusão do antimicrobiano no meio e queda de sua concentração para níveis subinibitórios, pode ocorrer o crescimento de bactérias sobreviventes (tolerantes) dentro da zona de inibição, estimuladas pela solução nutriente (GEFEN et al., 2017).

O TDtest tem como vantagens a detecção de níveis diferentes de tolerância (baixa, média e alta), a identificação de antimicrobianos eficazes contra cepas tolerantes e a adequação do melhor regime de tratamento para cada paciente (GEFEN et al., 2017). Em contrapartida, existem algumas limitações da técnica, como a falta de dados sobre a eficácia do teste em bactérias gram-positivas, a necessidade de padronizar as concentrações de antimicrobianos nos discos, visto que os discos comercializados apresentam concentrações muito altas para que caiam para níveis subinibitórios após 24 h, e o fato deste teste não discriminar bactérias tolerantes de persistentes. Outro fator limitante é que este ensaio não fornece informações sobre o tempo de morte do isolado testado.

1.3.3 MDK₉₉ e MDK_{99,99}

Tendo em vista a dificuldade em se identificar microrganismos tolerantes, Brauner e colaboradores (2016) propuseram um indicador quantitativo de tolerância, o MDK (do inglês, *Minimum Duration for Killing*). O MDK significa a duração mínima para morte de determinada fração da população bacteriana. Este indicador é obtido a partir da curva de tempo de morte de bactérias expostas a concentrações que excedem a CIM de um antimicrobiano bactericida (LI et al., 2017). As cepas tolerantes requerem um maior tempo de exposição ao antimicrobiano para serem eliminadas em comparação com cepas sensíveis, portanto apresentam MDK mais elevado que as últimas (BRAUNER et al., 2016).

O MDK₉₉ (duração mínima do tratamento que é requerido para matar 99% de uma população bacteriana [redução em 2 log]) é o utilizado para identificação de bactérias tolerantes (Figura 2A), pois este percentil é alto o suficiente para avaliar a dinâmica de morte e baixo o suficiente para excluir resultados de uma população heterogênea (BRAUNER et al., 2016). Por outro lado, as cepas persistentes apresentam MDK₉₉ similar às sensíveis, já que normalmente representam menos que 1% da população total. Sendo assim, sua identificação se dá pelo MDK_{99,99} (Figura 2B) (BRAUNER et al., 2016).

Desse modo, o MDK determina a extensão da dormência de determinada população bacteriana, permitindo o ajuste do tratamento quanto à seleção do antimicrobiano ideal e o período necessário para a eliminação da infecção.

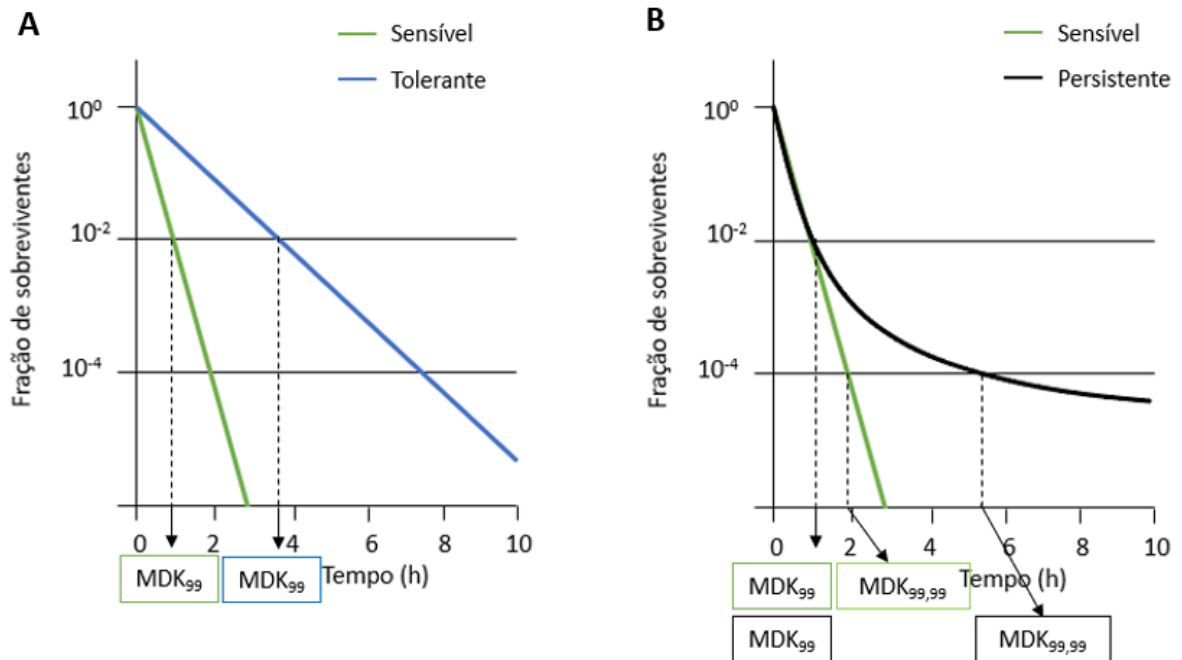


Figura 2 – Curvas de tempo de morte de bactérias sensíveis, tolerantes (A) e persistentes (B) na presença de antimicrobiano bactericida em altas concentrações. (A) O tempo mínimo para morte de 99% da população (redução de dois *logs*) (MDK₉₉) da cepa tolerante (em azul) é maior do que o MDK₉₉ da cepa sensível (em verde). (B) O MDK₉₉ da cepa sensível e persistente (em preto) é o mesmo, porém a persistente apresenta uma curva bimodal, na qual a maior parte da população é sensível e morre rapidamente enquanto que uma subpopulação persistente sobrevive a longos períodos. Neste caso, a diferenciação entre as sensíveis se dá pelo MDK_{99,99}, que é maior para as persistentes.

Fonte: Adaptado de Brauner e colaboradores (2016).

2 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de mecanismos de sobrevivência microbiana frente a várias classes de antimicrobianos vem aumentando, conquanto que o número de antimicrobianos novos disponíveis no mercado vem decrescendo. Em vista disso, é essencial conhecer, identificar e prevenir tais eventos. A tolerância bacteriana destaca-se pela sobrevivência de cepas frente a altas doses de um antimicrobiano bactericida, podendo causar infecções recorrentes ou crônicas e induzir a resistência. Um dos fatores que geram tolerância pode ser a exposição prévia a drogas. *S. maltophilia* é um microrganismo de origem ambiental que apresenta resistência intrínseca a uma gama de antimicrobianos. Como patógeno oportunista emergente, *S. maltophilia* tem participação significativa em infecções de corrente sanguínea e do sistema respiratório de pacientes imunossuprimidos. Em condições clínicas, como o paciente em tratamento hemodialítico ou o paciente com fibrose cística, é comum a ocorrência de infecções crônicas recidivantes que são, em parte, atribuídas ao estado de dormência do microrganismo, caracterizando a tolerância bacteriana. Na rotina clínica, *S. maltophilia* é comumente exposto a terapias com drogas às quais é intrinsecamente resistente, seja na terapia empírica inadequada ou na terapia de infecções polimicrobianas. Ainda não foi investigado se esta pressão seletiva sobre *S. maltophilia* pode levar ao fenômeno de tolerância induzida por drogas, como já relatado para outros microrganismos, sendo este o propósito deste trabalho. Acreditamos que a identificação de antimicrobianos que induzem tolerância cruzada em *S. maltophilia* poderá fornecer dados importantes para a elaboração de diretrizes para prevenir a tolerância, evitando gastos futuros com o agrave e recorrência de infecções, e evitando também a evolução de resistência bacteriana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar se a exposição *in vitro* de *S. maltophilia* a antimicrobianos aos quais é intrinsecamente resistente induz tolerância fenotípica cruzada aos antimicrobianos indicados para seu controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se daptomicina, vancomicina e gentamicina são capazes de estimular o crescimento *in vitro* de *S. maltophilia* em concentrações inibitórias de levofloxacina, ceftazidima e sulfametoxazol/trimetoprim em ensaio de triagem.
- Aplicar a razão CBM/CIM para avaliar a tolerância aos antimicrobianos selecionados na triagem.
- Avaliar a indução de tolerância cruzada em *S. maltophilia* em teste de disco-difusão adaptado.
- Classificar o tipo de tolerância ou persistência de *S. maltophilia* encontrada em ensaio de cinética de morte na presença dos antimicrobianos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS E ANTIMICROBIANOS

Os ensaios foram realizados com a cepa de referência *S. maltophilia* ATCC® 13637™ (parental), obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). Após submetê-la aos ensaios de indução da tolerância, três amostras induzidas, identificadas como D25 (exposta a 25 µg/mL de daptomicina), V15.6 (exposta a 15,6 µg/mL de vancomicina) e V3.9 (exposta a 3,9 µg/mL de vancomicina), foram isoladas e incluídas nos demais ensaios. As condições ideais para o crescimento de *S. maltophilia* foram repique em caldo ou ágar nutriente em atmosfera aeróbica e temperatura de 37 °C. As amostras utilizadas neste trabalho fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos (BioMA-lab), sendo armazenadas em solução crio-preservante (ANEXO A) em freezer a -20 °C. Como controle para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por microdiluição, foram utilizadas as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC® 25922™ e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™, sugeridas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Os antimicrobianos utilizados para indução da tolerância foram daptomicina (DAP), gentamicina (GEN) e vancomicina (VAN), chamados de “antimicrobianos indutores” no decorrer do texto. Os antimicrobianos preconizados pelo CLSI (2018) para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* serão chamados de “antimicrobianos alvo”, por serem possíveis alvos da tolerância cruzada. Os antimicrobianos alvo testados foram ceftazidima (CAZ), cloranfenicol (CLO), levofloxacina (LVX), minociclina (MIN), polimixina B (PXB), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), ticarcilina/clavulanato (TCC) e ciprofloxacina (CIP). A MIN (Cefar, São Paulo, Brasil), PXB (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos da América) e TCC (Bio-Rad) foram adquiridos na forma de discos para antibiograma, enquanto que os demais antimicrobianos foram adquiridos na forma liofilizada (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América). O preparo das soluções estoque dos antimicrobianos seguiu o manual de referência do CLSI (2015) e está descrito no ANEXO B.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo tem como variável independente e dependente, a exposição prévia *in vitro* aos antimicrobianos e a indução de tolerância bacteriana, respectivamente. Exceto quando mencionado de outra forma, todos os ensaios foram realizados com 3 réplicas técnicas e repetidos em 3 ocasiões diferentes. Os passos estratégicos da pesquisa estão demonstrados na Figura 3. Inicialmente, expusemos a cepa *S. maltophilia* ATCC 13637 aos antimicrobianos aos quais é intrinsecamente resistente (antimicrobianos indutores) a fim de induzir a tolerância cruzada aos antimicrobianos anti-*S. maltophilia* (antimicrobianos alvo). Após esta exposição, cultivamos a cepa na presença dos antimicrobianos alvo. As cepas que mostraram crescimento maior que o controle (sem exposição aos antimicrobianos indutores) foram selecionadas para os ensaios de tolerância. Simultaneamente, as cepas tolerantes foram re-identificadas/caracterizadas no âmbito molecular para confirmação da similaridade genética frente a cepa parental e exclusão da hipótese de contaminação por outro microrganismo ou a presença de outra linhagem da mesma espécie.

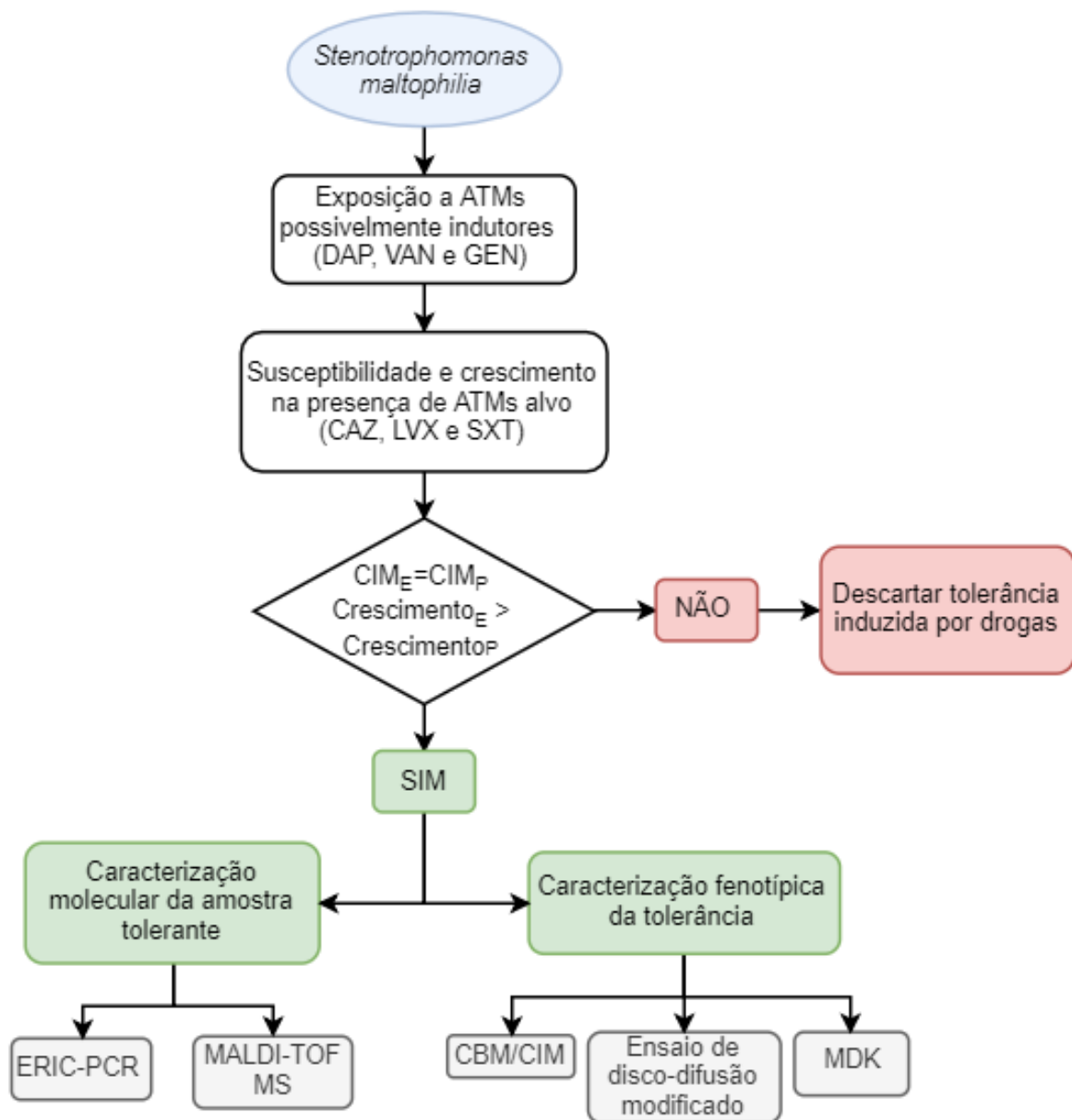


Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental.

ATMs – Antimicrobianos; DAP – daptomicina; VAN – vancomicina; GEN – gentamicina; CAZ – ceftazidima; LVX – levofloxacina; SXT – sulfametoxazol/trimetoprim; CBM - Concentração Bactericida Mínima; CIM – Concentração Inibitória Mínima (CIM_E: CIM da cepa exposta; CIM_P: CIM da cepa parental); MDK – Tempo Mínimo para morte de determinada porcentagem da população; ERIC-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Sequências Repetitivas Enterobacterianas Intergênicas de Consenso ; MALDI-TOF MS - Espectrometria de massa de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz.

4.3 PROCEDIMENTOS ESPECÍFICOS

4.3.1 Cinética de crescimento de *S. maltophilia*

A princípio, colônias de *S. maltophilia* ATCC® 13637™, cultivadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) a 37 °C por 24 h, foram suspensas em caldo BHI (Fluka, Missouri, Estados Unidos da América) até densidade óptica (DO) de 0,260, em comprimento de onda de 600nm, equivalente a $1-2 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. Esta suspensão foi diluída para obtenção de inóculo de $1-2 \times 10^6$ UFC/mL e incubada a 37°C sob agitação de 130 rpm (*Shaker/incubator* - Agimaxx). A cada 30 min, uma alíquota de 3 mL foi retirada para leitura da DO_{600nm} no espectrofotômetro e 100 μ L para diluição seriada em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% e plaqueamento em microgota (10 μ L) de cada diluição em ágar BHI (Figura 4). A técnica da microgota foi adaptada de Romeiro (Acesso em 03 de set. de 2018), na qual alíquotas de 10 μ L das diluições 10^{-1} até 10^{-6} foram semeadas em ágar BHI, em triplicata. O experimento foi finalizado quando a DO atingiu um platô representativo da fase estacionária de crescimento bacteriano. Após 24 h de incubação das placas, a 37°C, o cálculo do número de UFC/mL foi feito da seguinte maneira: UFC/mL = (média da contagem de colônias nas 3 microgotas / diluição da microgota) x 100. Estes valores foram plotados no gráfico UFC/mL *versus* tempo de crescimento.

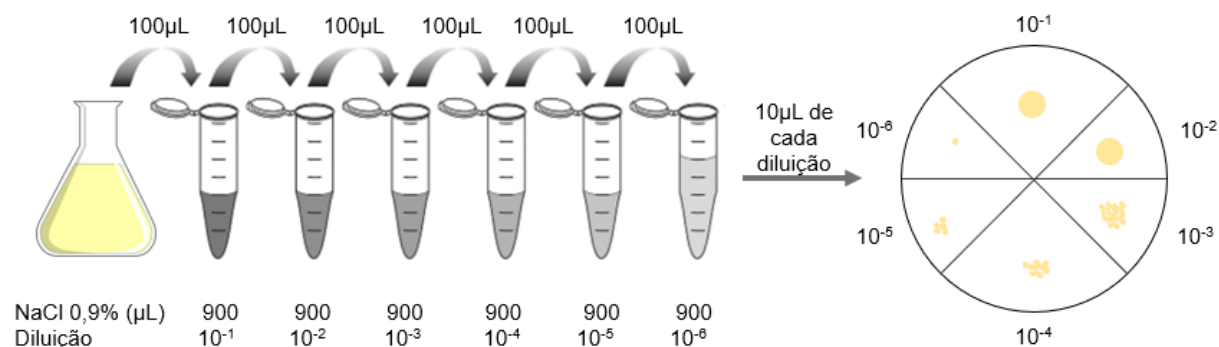


Figura 4 - Esquema de diluição seriada e plaqueamento de microgota em ágar BHI para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A cada 30 min de incubação da cepa bacteriana, uma alíquota de 100 μ L da suspensão foi retirada, diluída 10x até 10^{-6} , em salina 0,9% e 10 μ L de cada diluição foram inoculados em ágar para contagem de colônias, após 24h de incubação a 37°C.

4.3.2 Triagem de tolerância induzível

A triagem qualitativa teve como objetivo selecionar as cepas que, após exposição aos antimicrobianos indutores em diferentes concentrações, apresentassem maior crescimento que a cepa controle (sem exposição) em ágar contendo o antimicrobiano alvo. As cepas que apresentaram características de tolerância nos ensaios de triagem foram estocadas em solução crio-preservante em freezer a -20 °C até realização dos demais testes.

4.3.2.1 Indução da tolerância

A indução foi realizada a partir de uma adaptação do protocolo utilizado por Haaber e colaboradores (2015). A cepa de referência *S. maltophilia* ATCC® 13637™ foi semeada em ágar BHI e incubada por 24 h a 37 °C. Após este período, colônias foram suspensas em caldo BHI até DO_{600nm} de 0,26, equivalente a $1-2 \times 10^8$ (UFC)/mL. A suspensão foi diluída 100x em caldo BHI e incubada a 37° C por 210 min sob agitação de 130 rpm, a fim de atingir a fase exponencial de crescimento, tempo previamente determinado por curva de crescimento. Em seguida, alíquotas de 100 µL desta suspensão foram adicionadas aos poços da microplaca contendo 100 µL dos antimicrobianos indutores, conforme ilustrado pela Figura 5. As diluições duplas dos antimicrobianos foram realizadas em caldo Mueller Hinton ajustado com cátions (CAMHB, do inglês *Cation-adjusted Mueller Hinton Broth*) conforme protocolo do CLSI (2018) (ANEXO C). A solução estoque de DAP foi diluída em CAMHB suplementado com cálcio (CLSI, 2015) (ANEXO A). A microplaca foi incubada a 37°C em agitação de 180 rpm por 180 min. Após este período de indução, os testes de triagem foram realizados.

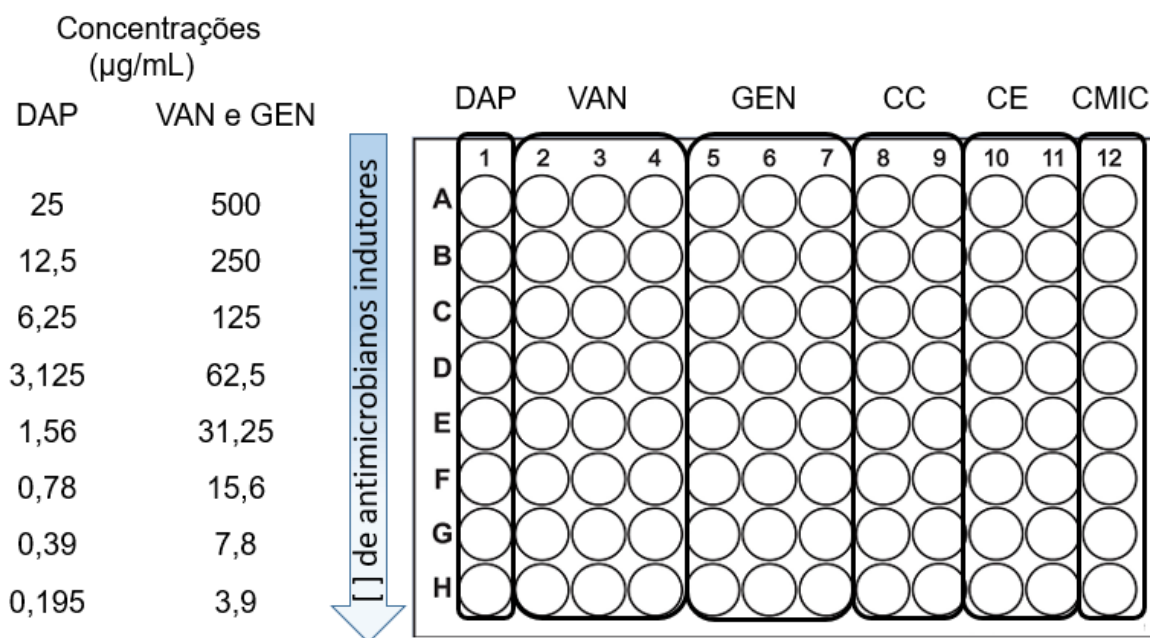


Figura 5 – Esquema de distribuição dos antimicrobianos indutores na microplaca de 96 poços para ensaio de indução de tolerância por drogas. À esquerda encontram-se as concentrações utilizadas dos antimicrobianos indutores, presentes em ordem decrescente nos poços A-H. DAP – daptomicina; VAN – vancomicina; GEN – gentamicina; CC – controle de crescimento (cepa ATCC® 13637™ sem a presença de antimicrobianos); CE – controle de esterilidade (poços contendo apenas meio de cultura); CMIC (controle de qualidade do teste, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ para LVX e CAZ, e *Escherichia coli* ATCC® 25922™ para SXT). Com exceção da daptomicina, que foi testada com apenas uma réplica para cada concentração, os demais antimicrobianos (vancomicina e gentamicina) tiveram 3 réplicas técnicas.

4.3.2.2 Triagem qualitativa

Após ensaio de indução de tolerância previamente descrito, o conteúdo da microplaca (Figura 5) foi “carimbado” (2-3 μL), com auxílio de um replicador estéril de 96 pinos, em placas de petri descartáveis (150x10mm) contendo ágar Mueller Hinton (MH) acrescido dos antimicrobianos alvo: LVX (0,03125 – 2 $\mu\text{g/mL}$), SXT (0,0625/1,1875 – 1/19 $\mu\text{g/mL}$) e CAZ (1 – 8 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 6 e 7). A placa do controle de crescimento (ágar MH sem antimicrobiano alvo) foi inoculada primeiro, seguida das placas com antimicrobiano alvo (da menor concentração para a maior). Por fim, foram incubadas a 37 °C por 24h, quando se procedeu a leitura da CIM. Considerando que cepas tolerantes podem ter crescimento lento, após a leitura da CIM, as placas foram novamente incubadas por mais 68h (Figura 7).

Este ensaio foi repetido 3 vezes para LVX, e 2 vezes para CAZ e SXT. As cepas expostas aos antimicrobianos indutores com crescimento bacteriano maior que a cepa parental foram selecionadas para o teste da triagem quantitativa.

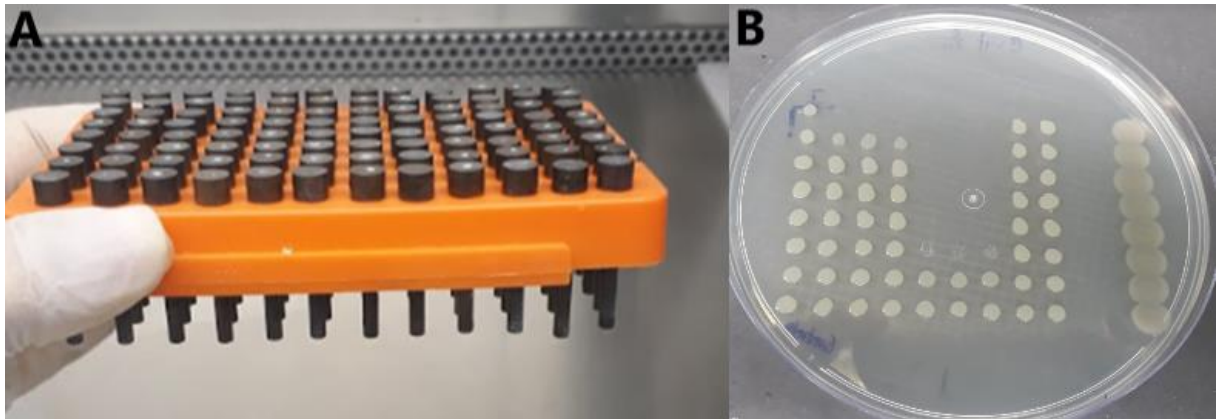


Figura 6 - Adaptação do replicador bacteriano utilizando 96 pinos de aço acoplados em suporte para ponteiras (A). Placa com ágar Mueller-Hinton sem adição de antimicrobiano, mostrando o crescimento em spot do inóculo bacteriano após exposição aos antimicrobianos indutores (B).

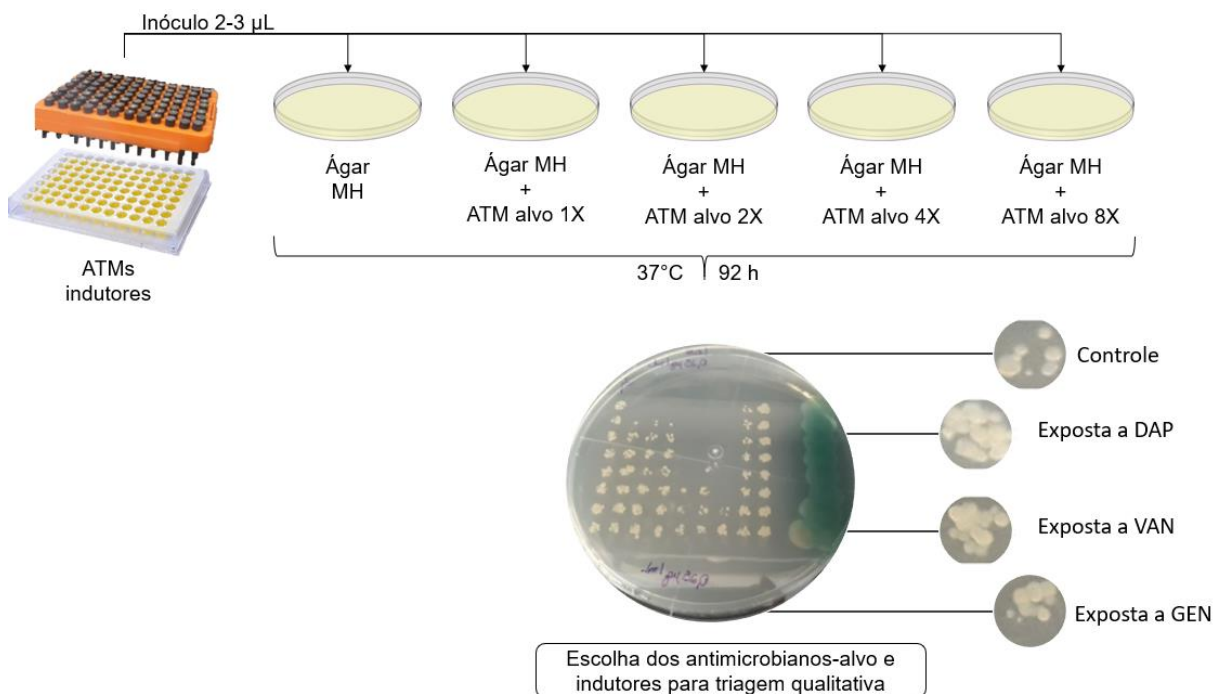


Figura 7 – Esquema do ensaio de triagem qualitativa de tolerância induzida por antimicrobianos. As placas de ágar MH (Mueller Hinton) contendo o antimicrobiano alvo foram “carimbadas” com replicador contendo como inóculo a cepa *S. maltophilia* exposta aos antimicrobianos indutores em diferentes concentrações. Em seguida, as placas foram incubadas até 24h para observação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e mais 68h para visualização do crescimento nos spots. ATM – Antimicrobiano; DAP – daptomicina; VAN – vancomicina; GEN – gentamicina.

4.3.2.3 Triagem quantitativa

Para mensurar o aumento do crescimento das amostras induzidas por DAP e VAN na placa contendo o antimicrobiano alvo LVX (triagem qualitativa), realizamos novo ensaio em meio líquido (caldo BHI) com intuito de quantificar o crescimento bacteriano pela turvação (triagem quantitativa). Assim, após novo ensaio de indução, o conteúdo da microplaca foi inoculado (2-3 μL) em outras microplacas contendo LVX diluída em CAMHB (200 μL por poço) nas concentrações 0,0625 - 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). Imediatamente após (tempo zero), foi feita a leitura da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ em espectrofotômetro de microplacas Epoch™2 (BioTek, Vermont, Estados Unidos da América). Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37 °C e, após aproximadamente 44h (tempo necessário para garantir crescimento de bactérias com metabolismo lento), foi feita nova leitura de $\text{DO}_{600\text{nm}}$. Por limitação técnica, apenas alguns poços das microplacas foram plaqueados para contagem de UFC/mL. Para isso, primeiramente foi escolhida a microplaca que mostrasse os maiores valores de absorbância das cepas induzidas em relação a parental. Logo após, foi realizada uma comparação entre as médias dos valores de absorbância para cada concentração do antimicrobiano indutor testada. As três concentrações de maior absorbância foram plaqueadas em microgota, após diluição seriada (10^{-1} - 10^{-6}), para contagem de UFC/mL. A média da contagem de UFC/mL de três experimentos diferentes foi plotada em gráfico e a análise estatística (teste *t* de *Student*) foi feita para comparação do crescimento entre as induzidas e a parental.

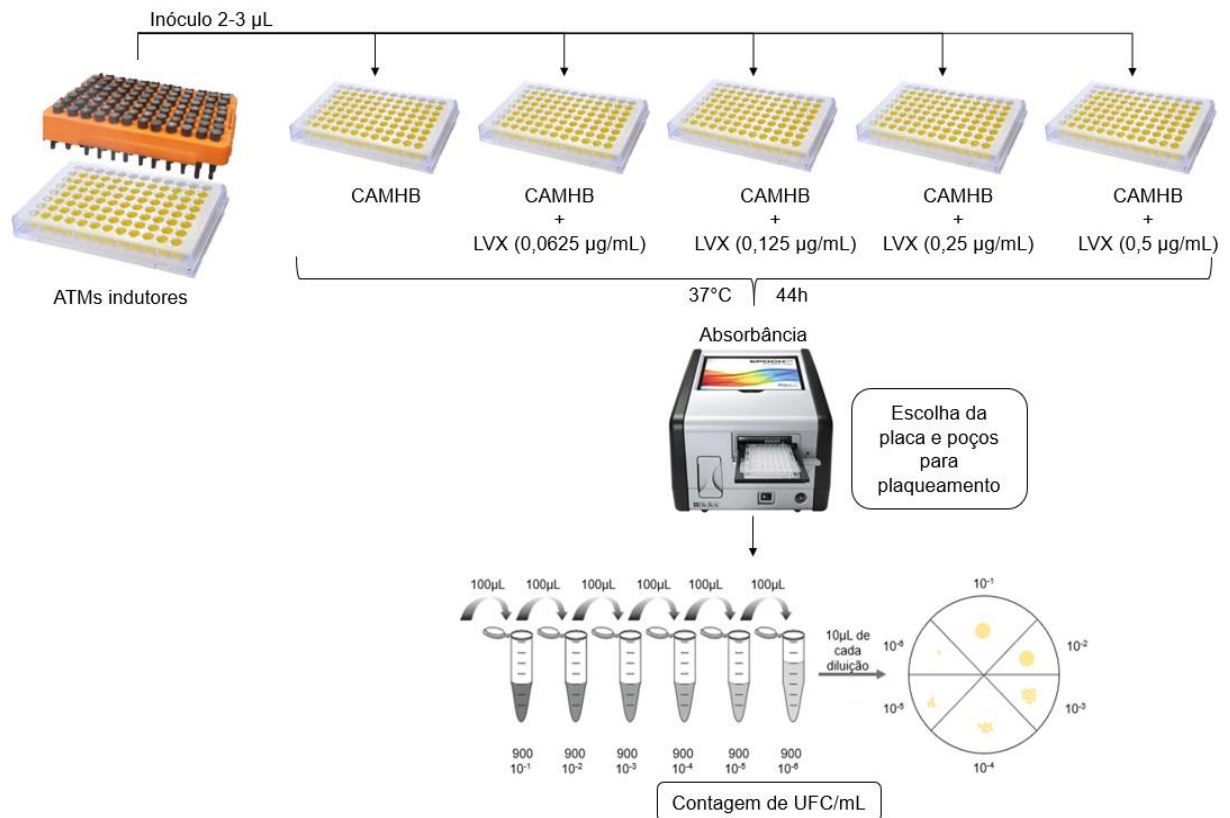


Figura 8 – Esquema do ensaio de triagem quantitativa de tolerância induzida por antimicrobianos. As microplacas contendo LVX foram inoculadas com cepas induzidas por antimicrobianos (daptomicina e vancomicina, indução por 180 min). Os poços que mostraram maior valor da razão absorbância da cepa induzida/parental foram plaqueados em microgota após diluição seriada para contagem de UFC/mL. CAMHB - Caldo Mueller Hinton ajustado com cátions (do inglês Mueller-Hinton *Cation-adjusted Broth*); LVX – levofloxacina.

4.3.3 Caracterização molecular das amostras induzidas

A caracterização molecular das amostras induzidas isoladas foi realizada para se determinar sua similaridade em relação a cepa parental (ERIC-PCR) e para excluir a hipótese de contaminação por outro microrganismo (MALDI-TOF MS). O ensaio MALDI-TOF MS foi realizado no Laboratório Alerta da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob supervisão do Prof. Dr. Rodrigo Cayô da Silva.

4.3.3.1 *Fingerprinting* bacteriano utilizando *primers* ERIC (ERIC-PCR)

A ERIC-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Sequências Repetitivas Enterobacterianas Intergênicas de Consenso) foi realizada para a cepa parental e

induzidas D25, V15,6 e V3,9, com o intuito de observar se a mudança fenotípica das induzidas em relação à tolerância antimicrobiana se deve a alguma variação genética. Esta é uma técnica simples e econômica para discriminar diferentes linhagens pertencentes a uma mesma espécie e já foi utilizada em diversos estudos para tipagem genética de isolados *S. maltophilia* (ANDERSON et al., 2007; CHATELUT et al., 1995; GALLO et al., 2016; RANJBAR et al., 2017). Para a extração de DNA bacteriano, seguimos protocolo de Nunvar e colaboradores (2012), no qual cerca de 10 colônias de cada amostra foram transferidas para microtubos contendo 100 µL de água Mili-Q® estéril e seu conteúdo foi homogeneizado em vórtex e aquecido em banho-maria a 98-100°C por 15 minutos. Após este período, os microtubos foram centrifugados a 15000g durante 5 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados, dispensados em novos microtubos estéreis e estocados em freezer a -20 °C. A análise da concentração e pureza do DNA extraído foi feita através do espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América). Segundo fornecido pelo aparelho (“T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers”, acesso em 03 de set. de 2018), as razões das absorbâncias a 260 e 280nm, utilizadas para determinação de pureza de DNA e RNA, devem estar ~1,8 e 2,0, respectivamente. Razões fora do estabelecido foram excluídas e novas extrações foram realizadas. Para a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), o DNA extraído foi diluído até concentração de 40 ng/µL.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad), utilizando 2 µL do DNA extraído (40 ng/µL) adicionados a 23 µL da mistura de reação para PCR (Quadro 1), seguindo as condições de amplificação descritas no Quadro 2 (GALLO et al., 2016; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). A preparação dos reagentes da PCR foi realizada em recipiente com gelo. Após a amplificação, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1x, corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizados em luz ultravioleta pelo sistema de documentação de géis MiniBIS® Pro (BioAmérica Biotech, Florida, Estados Unidos da América). Por fim, a imagem obtida do gel foi analisada pelo *software* “GelJ” (HERAS et al., 2015). Este ensaio foi repetido em dois dias diferentes.

Quadro 1 – Reação de ERIC-PCR.

Reagentes (marca)	Concentração Inicial	Volume (μL)	Concentração final
Água ultrapura (Sigma-Aldrich)	-	16,6	-
Tampão de reação (Sinapse Inc)	10x	2,5	1x
dNTP mix (Sinapse Inc)	10mM	0,5	0,2mM
MgCl ₂ (Sinapse Inc)	25mM	1	1mM
Primer sense ¹ (Invitrogen)	100mM	1	4mM
Primer antisense ² (Invitrogen)	100mM	1	4mM
Taq polimerase (Sinapse Inc)	5U/ μL	0,4	0,08U/ μL
DNA	40 ng/ μL	2	3,2 ng/ μL

¹ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'); ²ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3').

Quadro 2 – Condições de amplificação para o *fingerprintig* bacteriano por ERIC-PCR.

Etapa	Temperatura/Tempo
Desnaturação inicial	95 °C/7 min
(30 ciclos)	
Desnaturação	95 °C/30 s
Elongação	48 °C/30 s
Extensão	72 °C/2 min
Extensão final	72 °C/10 min
Manutenção	12 °C/ ∞

Adaptado de Versalovic, Koeuth e Lupski (1991).

4.3.3.2 Identificação de gênero e espécie pelo ensaio “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*” (MALDI-TOF MS)

A cepa parental e a induzida D25 tiveram sua identificação confirmada pela metodologia MALDI-TOF MS, utilizando o espectrômetro de massa Microflex LT e o software MALDI Biotyper 3.3 (Bruker Daltonics, Massachusetts, Estados Unidos da América). Esta técnica é utilizada na identificação bacteriana através da análise de proteínas ribossomais (2-20 Quilodalton), gerando um perfil proteico que é lançado em uma base de dados, permitindo um resultado rápido e mais econômico que outros métodos comumente utilizados (BIZZINI et al., 2010; SAFFERT et al., 2011; SINGHAL et al., 2015).

A extração das proteínas totais foi realizada de acordo com as seguintes recomendações do fabricante (Bruker Daltonics): uma alça de 1 µL contendo colônias bacterianas, foi diluída em 300 µL de água destilada estéril e, em seguida, foi adicionado 900 µL de etanol absoluto (Carlo Erba Reagents, Arese, Itália). Esta mistura foi cuidadosamente agitada e centrifugada a 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensado com 50 µL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich) e misturado com 50 µL de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich). Esta solução foi centrifugada a 13.000 rpm durante 2 minutos e 30 µL do sobrenadante foi armazenado a -20°C, para posterior análise pelo aparelho.

Para a identificação das amostras, 1 µL do extrato proteico foi pipetado em triplicata, numa placa de aço inoxidável contendo 96 *spots*, fornecida pelo fabricante. O inóculo foi deixado à temperatura ambiente para secagem e, posteriormente, adicionado 1 µL da matriz [500 mg/mL de ácido alfa-4-ciano-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics)] diluída em uma solução de ácido trifluoroacético a 2,5% (Acetonitrila 50%, água 50% e ácido trifluoroacético 2,5%), e novamente deixado à temperatura ambiente para secagem. Como calibrante, foi utilizado o extrato proteico da cepa *Escherichia coli* DH5α. Após o processamento das amostras e do calibrante, a placa foi colocada no equipamento para realização da identificação bacteriana.

A identificação pela técnica do MALDI-TOF MS foi baseada de acordo com o valor de “score” liberado pelo aparelho. Um valor $\geq 2,3$ indica que a identificação do

gênero e da espécie é confiável; entre 2,0 a 2,29 indica que a identificação do gênero é confiável e da espécie é provável; e entre 1,7 a 1,9 indica que a identificação do gênero é provável. Quando os valores de “score” são inferiores a 1,69 o aparelho reporta como micro-organismo não identificado. Somente foi considerada a identificação com score $\geq 2,0$ para o presente estudo.

4.3.4 Determinação da tolerância pela razão CBM/CIM

A CIM e a CBM do antimicrobiano LVX foram realizadas para as amostras parental e induzidas D25, V15,6 e V3,9. Neste ensaio, a cepa é considerada tolerante quando apresenta razão CBM/CIM maior ou igual a 32 (TUOMANEN; DURACK; TOMASZ, 1986). Estes ensaios foram repetidos em duas ocasiões diferentes.

4.3.4.1 Determinação da CIM

O valor da CIM foi determinado através do método de microdiluição (CLSI, 2015). Inicialmente, foi realizada a diluição da solução estoque de levofloxacina (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em CAMHB (ANEXO C) de modo a obter concentrações duplas finais na faixa de 0,063 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nas fileiras A-H da microplaca de 96 poços. Logo após, foi feito o ajuste de inóculo bacteriano, diluindo a suspensão bacteriana incubada *overnight* em caldo BHI até $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,26, equivalente a $1-2 \times 10^8$ (UFC)/mL. Em seguida, este inóculo foi diluído novamente, em CAMHB, e 100 μL adicionados em cada poço da microplaca já contendo 100 μL de solução de LVX, obtendo inóculo final de 10^5 UFC/mL. Para a contagem de UFC/mL, o inóculo foi diluído de 10^{-1} a 10^{-3} , e uma microgota de 10 μL de cada diluição foi inoculada em ágar BHI, em triplicata, e incubada a 37 °C por 24 h. Após 24 horas de incubação da microplaca em 37 °C, a CIM foi determinada por inspeção visual da turbidez do meio de cultura, sendo considerada a menor concentração do antimicrobiano que inibiu a turvação do meio (ANDREWS, 2001).

Seguindo o manual de referência CLSI (2018), foi considerada sensível a cepa com valor da CIM de levofloxacina $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$, intermediária aquela com valor da CIM = 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e resistente aquela com valor da CIM $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$. A cepa *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC® 27853™ foi utilizada como controle de qualidade da CIM de LVX, devendo sua CIM estar dentro da faixa de 0,5 – 4 µg/mL para validação do experimento (CLSI, 2018).

4.3.4.2 Determinação da CBM

Para determinação da CBM, retiramos alíquotas de 180 µl dos poços sem turbidez e inoculamos em tapete, com auxílio de alças de Drigalski, em placas contendo ágar BHI. Após 24 h de incubação a 37 °C, realizamos a contagem de UFC em cada placa. A CBM foi considerada a concentração de LVX capaz de reduzir 99,9% do inóculo inicial (BARRY et al., 1999).

4.3.5 Determinação da tolerância pelo teste de disco-difusão adaptado

A primeira etapa deste ensaio segue o protocolo de disco-difusão proposto por Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). O ajuste do inóculo bacteriano foi feito a partir de culturas de 24h em ágar BHI. Colônias isoladas foram diluídas em NaCl 0,9% até DO_{600nm} de 0,26 (equivalente a 1-2 x 10⁸ UFC/mL). Em seguida, um swab estéril foi embebido na suspensão bacteriana e semeado em forma de tapete na placa de Petri contendo ágar MH. Após secagem da placa, os discos de antimicrobianos foram dispostos no ágar com um espaço entre seus centros de, no mínimo, 24mm. A manipulação dos discos foi feita com auxílio de uma pinça de inox estéril, cuja ponta foi flambada após cada disco. Dentro do período de incubação de 24h, os antimicrobianos se difundiram no meio (Figura 9A), permitindo a formação de halos de inibição. Os diâmetros dos halos foram medidos e as imagens das placas foram obtidas através de scanner (Multifuncional Samsung SCX-4833). Em seguida, os discos foram retirados e as placas incubadas por mais 24h a 37 °C (Figura 9B). Por fim, os diâmetros dos halos foram novamente medidos e as placas escaneadas. As amostras foram avaliadas quanto a tolerância através do número de colônias que cresceram dentro dos halos de inibição após a retirada dos discos (Figura 9C): baixa tolerância (0-10 colônias), média tolerância (10-centenas) e alta tolerância

(crescimento em tapete) (GEFEN et al., 2017). Este ensaio foi repetido em três ocasiões diferentes.

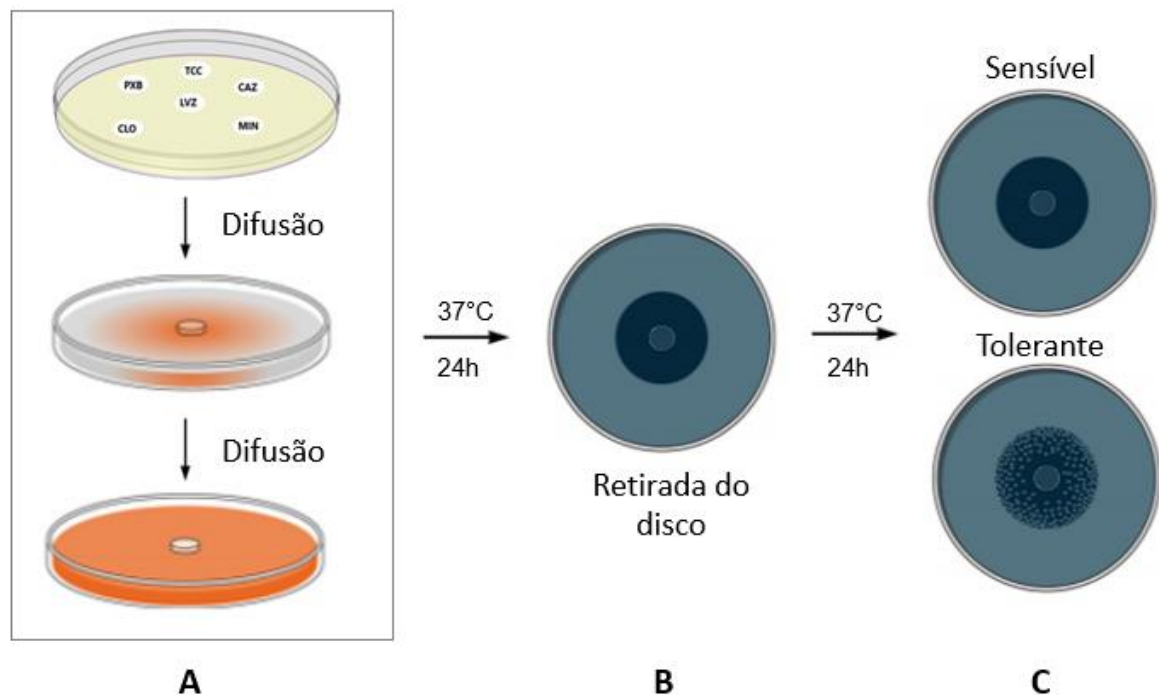


Figura 9 - Esquema do ensaio de disco-difusão adaptado. Logo após a adição dos discos, os antimicrobianos passam a se difundir no ágar (A). Após 24h de incubação, o diâmetro do halo de inibição formado ao redor do disco é medido e o disco é retirado (B). Com mais 24h de incubação, é possível observar crescimento de colônias tolerantes dentro do halo de inibição (C).

Fonte: adaptado de Trastoy e colaboradores (2018).

Os antimicrobianos testados e suas respectivas quantidades presentes nos discos estão descritas na Tabela 1. Para padronização do teste, avaliamos diferentes quantidades de LVX no disco (0,25 µg; 0,5 µg; 1 µg; 5 µg e 10 µg). Discos de 1 µg/mL mostraram halos mais visíveis após 24h de incubação, portanto, foram escolhidos para os demais testes. Os discos comerciais foram cortados em 1/8, 1/6 e 1/4 partes, já que a concentração presente no disco inteiro é alta demais para que caia para níveis sub-CIM após 24h de incubação. O corte do disco em 1/4 foi o bastante para formação de halo de inibição e baixa o suficiente para seus níveis caírem para sub-CIM. Por fim, testamos a substituição dos discos de antimicrobianos por discos contendo 5 µL de solução de glicose estéril (40%) conforme realizado por Gefen e colaboradores (2017) no "TDtest".

Os antimicrobianos CAZ, MIN, PXB e TCC estavam disponíveis na forma de discos comerciais para antibiograma. Os demais antimicrobianos estavam disponíveis na forma liofilizada, sendo diluídos até concentração desejada e 5 µL dispensados em discos de papel filtro estéril (6mm de diâmetro).

Tabela 1 - Quantidade testada de cada antimicrobiano nos discos do ensaio de disco-difusão adaptado.

Antimicrobianos	CAZ	CLO	CIP*	LVX	MIN	PXB	TCC	SXT**
Quantidade por disco (µg)	7,5	10	1	1	7,5	12,5	18,75/2,5	0,95/18,05

CAZ – Ceftazidima; CLO – Cloranfenicol; LVX – Levofloxacina; MIN – Minociclina; PXB – Polimixina B; TCC – Ticarcilina/clavulanato; SXT – Sulfametoxazol/trimetoprim. *Testado apenas nas cepas parental, V15,6 e V3,9. **Testado apenas nas cepas parental e D25.

4.3.6 Determinação da tolerância pela curva de tempo de morte

Para a curva de tempo de morte em fase estacionária, os inóculos das amostras parental e induzida foram ajustados até DO_{600nm} de 0,26 (equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL), a partir de culturas *overnight* em caldo BHI, e diluídos em tubos contendo 10 mL de caldo BHI até concentração de $1-2 \times 10^6$ UFC/mL. Para a curva de tempo de morte em fase exponencial, incubamos os tubos ajustados conforme mencionado acima a 37 °C e agitação de 130 rpm por 210 minutos.

Imediatamente antes da adição do antimicrobiano (LVX, CAZ, CIP) (Tempo 0), uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada tubo, diluída em séries de 1:10 até 10^{-3} , e cada diluição foi espalhada em tapete em ágar BHI, com auxílio de alças de Drigalski estéreis. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24h. O antimicrobiano foi então adicionado em cada tubo nas concentrações de 50 vezes a CIM ou 100 vezes a CIM (para a curva dose-dependente) e os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação de 130 rpm. A cada 2h, repetiu-se a retirada da alíquota da suspensão de cada tubo para plaqueamento em tapete. Após 24h de incubação das placas, foi feita a contagem de colônias em cada tempo e os dados de todos os experimentos foram plotados no Excel como média \pm desvio-padrão do

log de UFC/mL *versus* tempo (horas) para montagem da curva de tempo de morte de cada cepa.

Para o cálculo do tempo mínimo para morte de 99% (MDK₉₉) e 99,99% (MDK_{99,99}) da população inicial, foi considerada a média do *log* de UFC/mL no tempo 0 como sendo 100% da população. Através deste valor, encontramos o *log* de UFC/mL de 1% e 0,01% da população e, plotando na curva, conseguimos estimar o MDK₉₉ e MDK_{99,99}, respectivamente.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Prism 8* (*GraphPad*, California, EUA). O grau de significância estatística considerado foi de 95% ($p < 0,05$).

Os métodos de análise empregados para cada ensaio estão descritos a seguir:

- A comparação do crescimento em *spot* após triagem qualitativa da tolerância foi apresentada de maneira descritiva.
- Para comparar os valores de UFC/mL obtidos na triagem quantitativa de tolerância entre a parental e as induzidas, foi realizado teste *t* de *Student* para dados paramétricos. Havendo necessidade, realizamos a transformação dos dados para que atendessem ao critério de distribuição normal. Caso contrário, o teste não paramétrico seria utilizado.
- Para o cálculo da CIM e CBM, foram feitas médias geométricas dos valores obtidos em cada experimento. A média geométrica é utilizada para valores que variam exponencialmente por permitir resultados mais discriminantes e próximos aos reais (DAVIES, 1990; MANIKANDAN, 2011).
- As diferenças entre o tamanho dos halos após teste de disco-difusão adaptado foram analisadas por teste *t* de *Student* para os pares parental/induzida para cada antimicrobiano testado.

- As curvas de crescimento e de morte foram expressas como média \pm desvio-padrão.

5 RESULTADOS

5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA CEPA PARENTAL DE *S. maltophilia*

Os resultados da cinética de crescimento de *S. maltophilia* ATCC 13637, obtidos após dois experimentos independentes, estão ilustrados na Figura 10. De 0 a 30 min, a cepa estudada apresentou fase *lag* de crescimento e seu crescimento exponencial começou a partir do minuto 30 até 270 min de incubação. Em 270 min, o número de colônias alcançou um pico e, após esse período, a cepa entrou na fase estacionária de crescimento. Para a realização da indução de tolerância por antimicrobianos, é necessário que estes estejam em contato com a bactéria em fase de crescimento exponencial. Portanto, após construção da curva de crescimento da cepa parental de *S. maltophilia*, escolhemos realizar a indução após 210 minutos de crescimento bacteriano nas mesmas condições de incubação do ensaio da curva de crescimento.

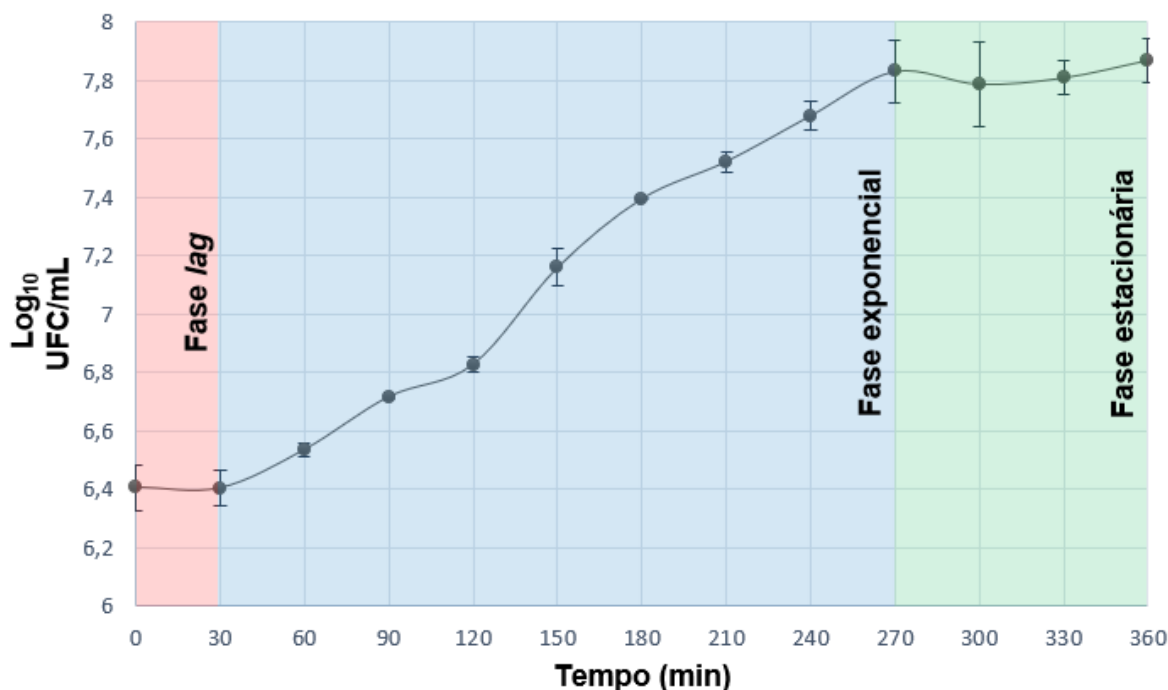


Figura 10 – Curva de crescimento da cepa parental de *S. maltophilia* (ATCC 13637). A cinética de crescimento da bactéria foi monitorada durante 360 min de incubação em caldo BHI a 37 °C e agitação de 130 rpm. Os dados [logaritmo de base 10 (\log_{10}) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL versus tempo] foram plotados como média e desvio-padrão de dois experimentos independentes. Vermelho – fase lag; Azul – fase exponencial; Verde – fase estacionária.

5.2 TRIAGEM DE TOLERÂNCIA INDUZÍVEL

A exposição aos antimicrobianos indutores DAP, VAN e GEN não alterou o perfil de susceptibilidade das cepas, cujas CIMs para LVX, CAZ e SXT foram 0,125 µg/mL, 4 µg/mL e 1/19 µg/mL, respectivamente. Todas as cepas de controle de qualidade tiveram a CIM dentro da faixa preconizada pelo CLSI (2018).

Após exposição aos antimicrobianos indutores DAP, VAN e GEN, e repique em ágar BHI sem a presença de antimicrobianos, observamos que as exposições à GEN em concentrações maiores que 15,6 µg/mL inibiram o crescimento de *S. maltophilia* (Figura 11). Além disso, as concentrações de GEN \leq 15,6 µg/mL não alteraram o crescimento da bactéria em relação a sua parental (CC, sem exposição) (Figura 12). Assim, como nosso agente indutor não deve ter atividade inibitória contra *S. maltophilia*, e considerando que mesmo em concentrações baixas a exposição à GEN não alterou o crescimento bacteriano em relação ao controle não induzido, GEN foi excluído dos demais ensaios.

Também na Figura 11, observamos que a VAN, nas concentrações de 500 e 250 µg/mL, inibiu parcialmente o crescimento da bactéria quando comparada ao controle de crescimento (CC, sem indução a antimicrobianos). Por outro lado, nenhuma concentração testada de DAP foi capaz de inibir o crescimento de *S. maltophilia*.

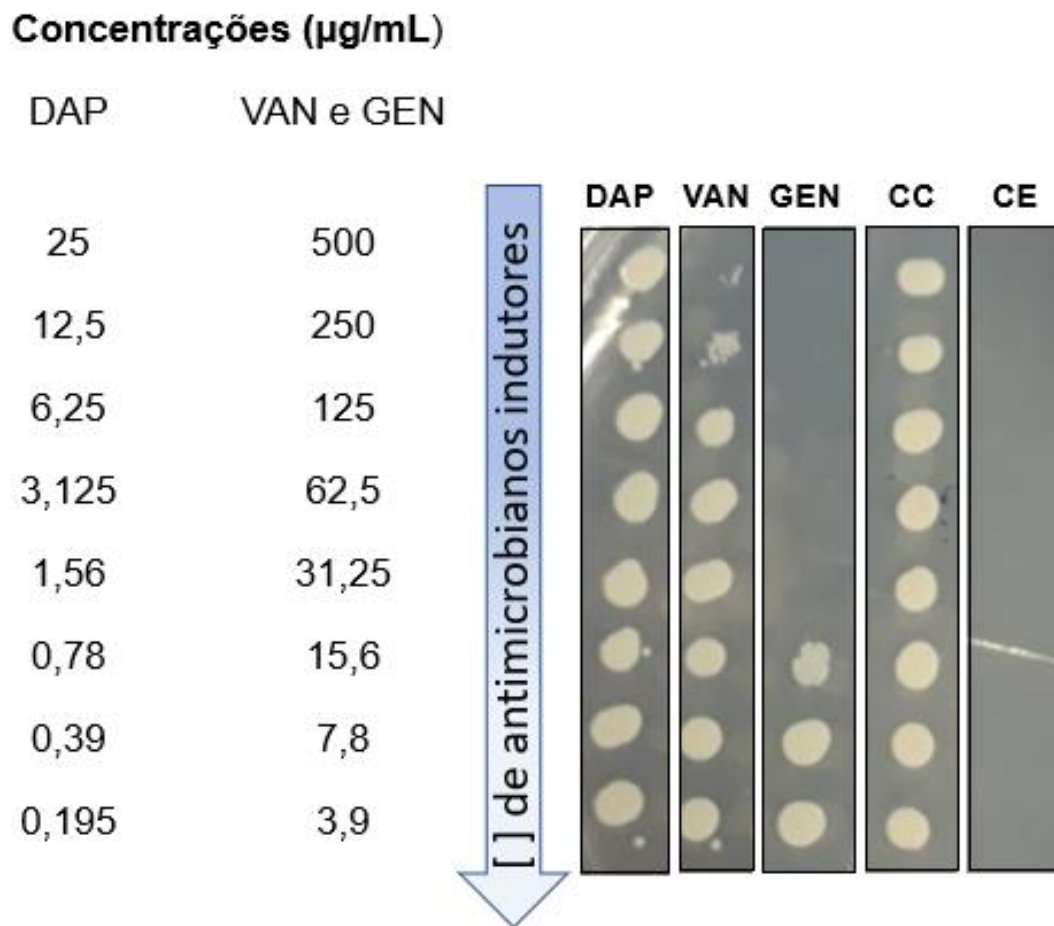


Figura 11 – Crescimento (24 h) em ágar Mueller-Hinton sem antimicrobiano da cepa *Stenotrophomonas maltophilia* previamente exposta a daptomicina (DAP), vancomicina (VAN) e gentamicina (GEN) em diferentes concentrações por 180 min. CC – controle de crescimento sem exposição prévia a antimicrobianos; CE – controle de esterilidade.

Após “carimbar” as placas de ágar contendo o antimicrobiano alvo, os *spots* de crescimento das cepas expostas foram comparados aos da cepa controle (sem exposição aos indutores) (Figura 12). Apenas as combinações de indutor/alvo DAP/LVX e VAN/LVX mostraram crescimento visivelmente maior quando comparado a cepa controle. Assim, a triagem quantitativa foi realizada apenas para estes antimicrobianos.






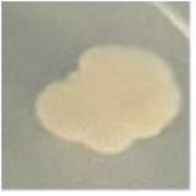





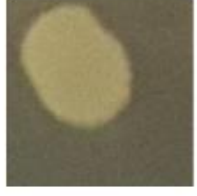
	Controle (sem exposição)	Exposição a DAP ¹	Exposição a VAN ²	Exposição a GEN ²
LVX (0,25 µg/mL)				
CAZ (2 µg/mL)				
SXT (0,25/4,75 µg/mL)				

Figura 12 – Crescimento (92 h) em *spot* das cepas expostas a daptomicina (DAP), a vancomicina (VAN) e a gentamicina (GEN) em ágar Mueller-Hinton contendo os antimicrobianos alvo levofloxacina (LVX), ceftazidima (CAZ) e sulfametoxazol/trimetoprim (SXT). Nota-se crescimento visivelmente maior das cepas expostas a DAP e VAN (identificadas por setas vermelhas) em relação ao controle, em meio contendo LVX.

¹Exposição a concentração de 25 µg/mL.

²Exposição a concentração de 3,9 µg/mL.

Na triagem qualitativa observamos um maior crescimento de colônias nas amostras expostas a DAP e VAN em ágar MH contendo 0,25 µg/mL de LVX, após 92h de incubação (Fig. 13a). Na triagem quantitativa, os valores da média e mediana de UFC/mL das amostras induzidas foram maiores que o controle, entretanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos após teste *t* de *Student* dos pares parental/induzida (Fig. 13b).

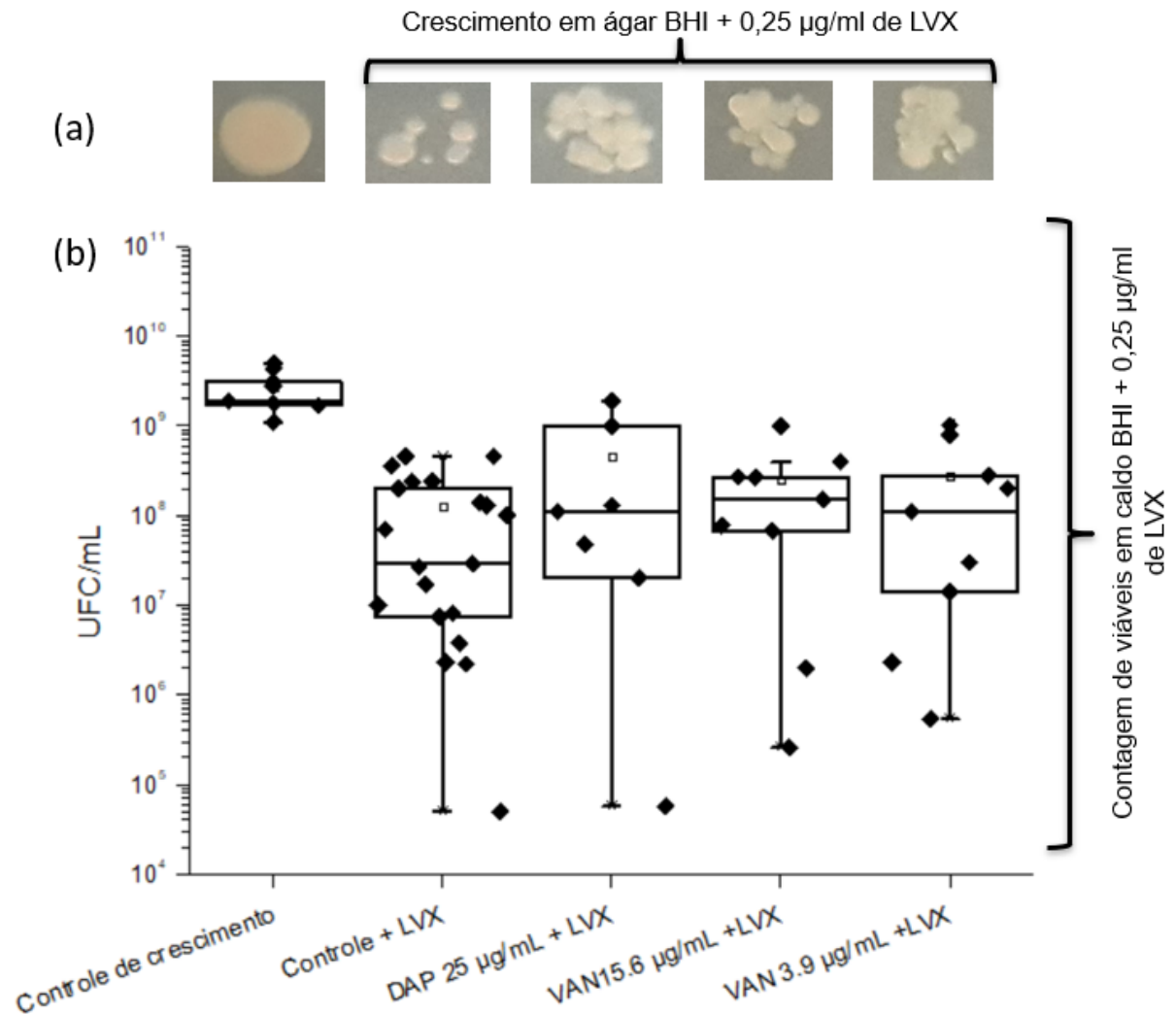


Figura 13 - Crescimento de *S. maltophilia* na presença de levofloxacina (LVX) após exposição a daptomicina (DAP) e vancomicina (VAN). Na triagem qualitativa (a), a bactéria foi exposta à DAP (25 µg/mL) e VAN (15,6 e 3,9 µg/mL) por 180 min e inoculada em ágar BHI contendo LVX (0,25 µg/mL). Após 92h de incubação, foi observado crescimento ligeiramente maior nas amostras expostas a DAP e VAN (a) em relação ao controle (Controle +LVX). Para quantificar o maior crescimento observado, o experimento foi repetido em meio líquido em placas de 96 poços e realizada contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL (b). O gráfico ilustra os dados obtidos em três experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (teste *t* de Student).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS INDUZIDAS

Para excluir a hipótese de contaminação por outro microrganismo e determinar a similaridade genética entre as cepas induzidas D25, V15,6 e V3,9, e a parental, foi empregada a técnica ERIC-PCR que mostrou 100% de similaridade entre as cepas (Figura 14). Além disso, também confirmamos a identificação como

Stenotrophomonas maltophilia das cepas parental e induzida D25 por meio da técnica MALDI-TOF MS, com scores de 2,415 e 2,431, respectivamente.

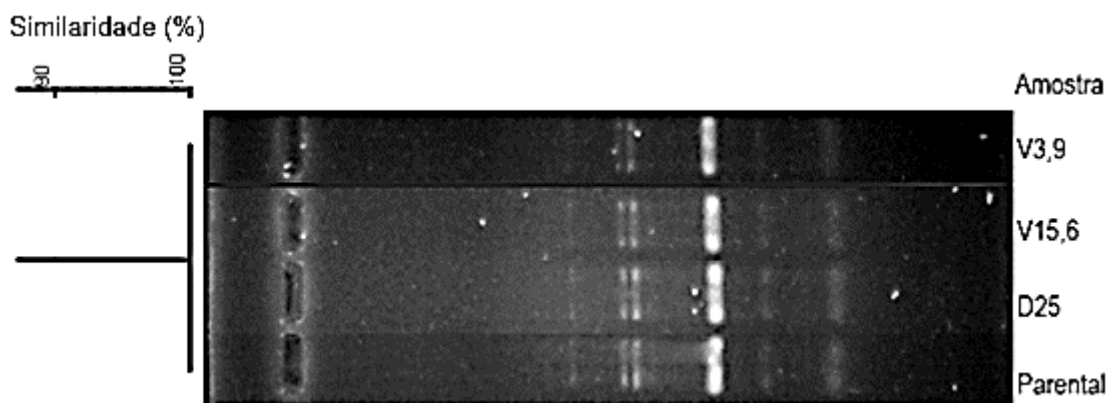


Figura 14 - Dendrograma gerado pelo software “GelJ” das cepas parental e induzidas (V3,9; V15,6 e D25) de *Stenotrophomonas maltophilia* após ERIC-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Sequências Repetitivas Enterobacterianas Intergênicas de Consenso). Todas as cepas apresentam 100% de similaridade entre as bandas encontradas. Nível de tolerância de 5% para correspondência entre as bandas; coeficiente Jaccard para determinação de similaridade entre os padrões de bandas e UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) para análise de agrupamento.

5.4 DETERMINAÇÃO DO VALOR DA CIM E CBM

O valor da CIM de LVX para as amostras induzidas e parental foi o mesmo e, de acordo com o manual de referência do CLSI (2018), estão dentro da faixa de sensibilidade, comprovando que a indução não gerou resistência nas amostras. A razão CBM/CIM das amostras induzidas e parental foi <32, ainda que os valores das amostras induzidas tenham se mostrado ligeiramente maiores que o da cepa parental (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de levofloxacina para as cepas parental e induzidas de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Amostra	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(CBM/CIM)
Parental	0,125	0,3	2,4
D25	0,125	0,35	2,8
V15,6	0,125	0,38	3,04
V3,9	0,125	0,33	2,64

D25 - Cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637) induzida a 25 µg/mL de daptomicina; V15,6 - Cepa *S. maltophilia* (ATCC 13637) induzida a 15,6 µg/mL de vancomicina; V3,9 - Cepa *S. maltophilia* (ATCC 13637) induzida a 3,9 µg/mL de vancomicina.

Dados obtidos de dois experimentos independentes e apresentados como média geométrica.

A CBM permite crescimento de até 0,1% da população inicial (BARRY et al., 1999). Para um dos experimentos realizados, nosso inóculo inicial foi de $5,8 \times 10^6$ UFC/mL, de forma que a CBM foi considerada a concentração de LVX capaz de reduzir a contagem para até $5,8 \times 10^3$ UFC/mL (equivalente a 1044 colônias nos 180 µL inoculados nas placas). A população residual ilustrada na figura 15 é, desta forma, negligenciada, e pode representar a subpopulação persistente. Assim, apesar da cepa induzida D25 apresentar uma subpopulação evidentemente maior do que a parental crescendo em 0,25 µg/mL de LVX, a CBM foi a mesma para ambas (CBM = 0,25 µg/mL).

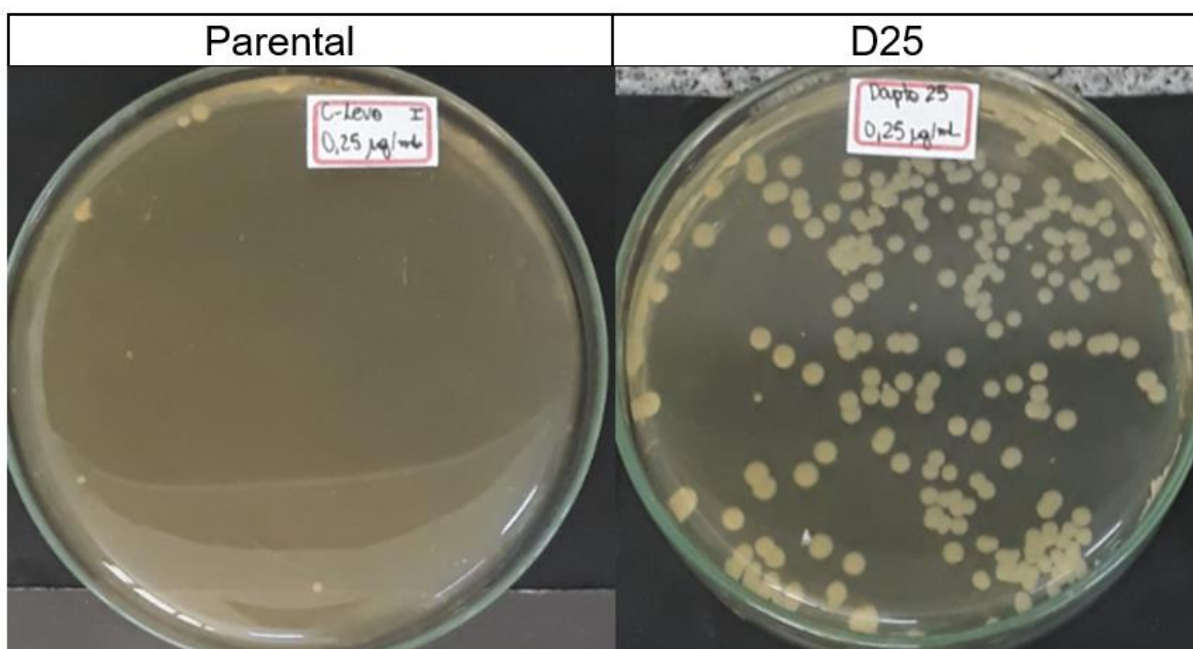


Figura 15 - Subcultivo, em ágar BHI, do conteúdo dos poços da placa de microdiluição contendo 0,25 µg/mL de levofloxacina (LVX). Como o inóculo inicial foi de $5,8 \times 10^6$ UFC/mL, a CBM foi considerada a concentração de LVX capaz de reduzir a contagem para até $5,8 \times 10^3$ UFC/mL (até 1044 colônias nos 180 µL inoculados nas placas), ou seja, reduzir $\geq 99,9\%$ do inóculo inicial. Assim, apesar da cepa induzida D25 apresentar uma subpopulação evidentemente maior do que a parental crescendo em 0,25 µg/mL de LVX, a CBM foi a mesma para ambas (CBM=0,25 µg/mL).

5.5 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO ADAPTADO PARA DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA BACTERIANA

Nos ensaios realizados no par parental/induzida D25, observamos recrescimento significativamente maior da cepa D25 quando retirados os discos de LVX, CAZ e TCC (Figura 16 e 17). De acordo com os critérios de avaliação qualitativa de tolerância através do TDtest propostos por Gefen e colaboradores (2017), a cepa D25 apresentou alta tolerância/persistência a estes antimicrobianos. Entretanto, para os demais antimicrobianos testados (CLO, MIN, PXB e SXT), não houve diferença no recrescimento entre a parental e a induzida (Figura 18).

A fim de se descartar a hipótese de os resultados serem ocasionados por resistência bacteriana, a CIM de LVX foi novamente determinada para as cepas D25 e sua parental. O resultado foi de CIM igual a 0,125 µg/mL para ambas, confirmando que as amostras são igualmente sensíveis e que as alterações fenotípicas observadas são típicas de tolerância ou persistência.

Para o par parental/V3,9, não houve diferença significativa entre o crescimento em relação à parental em nenhum antimicrobiano testado, antes ou após a retirada dos discos (Figura 19 e ANEXO D). A induzida V15,6, por outro lado, apresentou halo de inibição menor que a parental para a LVX, CAZ e CIP nas primeiras 24 h de incubação (Figura 19 e ANEXO D), sugerindo diminuição de susceptibilidade, ao invés de tolerância. Dessa forma, estas cepas foram excluídas dos demais testes.

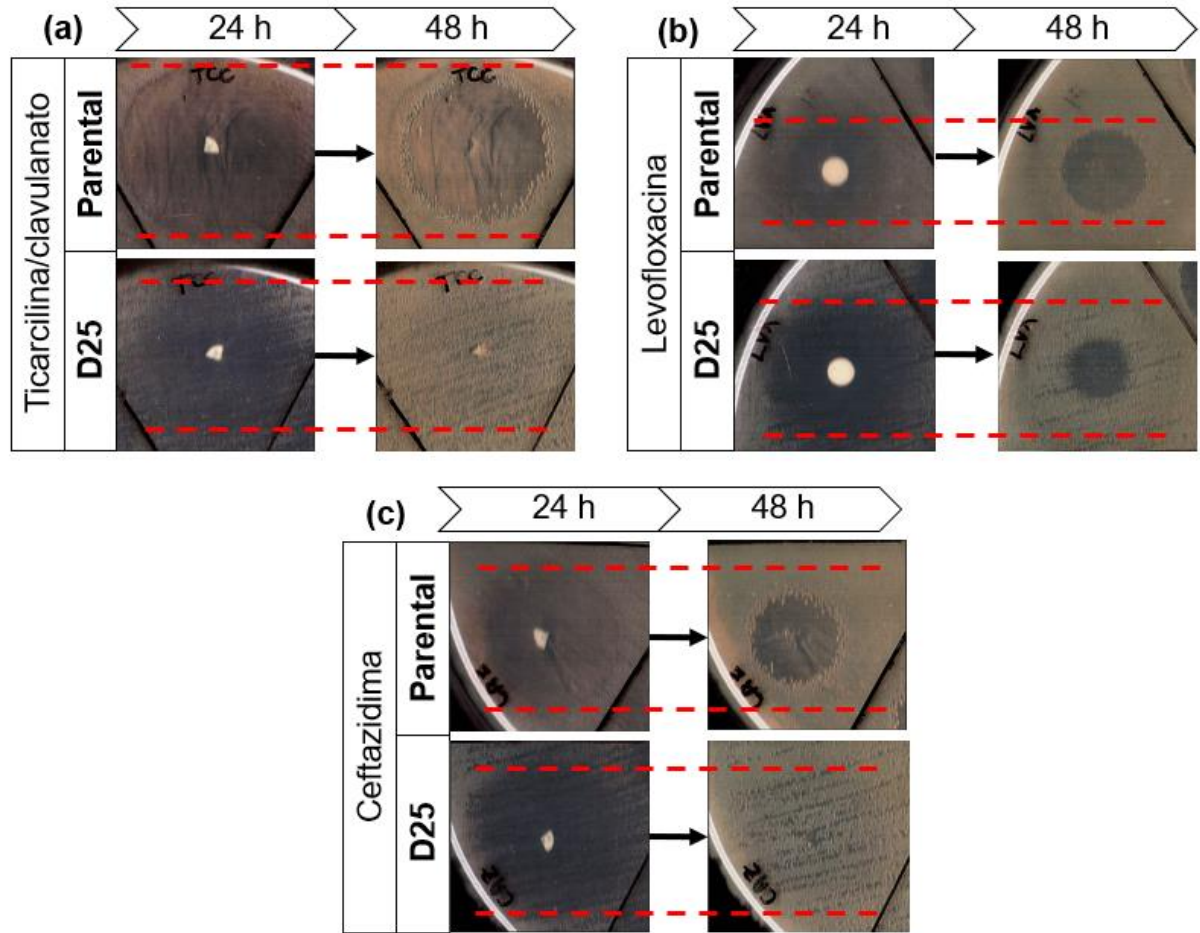


Figura 16 - Crescimento de colônias tolerantes após teste de disco-difusão adaptado em ágar Mueller-Hinton. As linhas pontilhadas delimitam o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano nas primeiras 24 h. Após a retirada do disco de antimicrobiano e mais 24 h de incubação (totalizando 48 h), observa-se o crescimento da cepa tolerante D25 dentro do halo de inibição de (a) ticarcilina/clavulanato, (b) levofloxacina e (c) ceftazidima. A seta preta indica a retirada do disco de antimicrobiano.

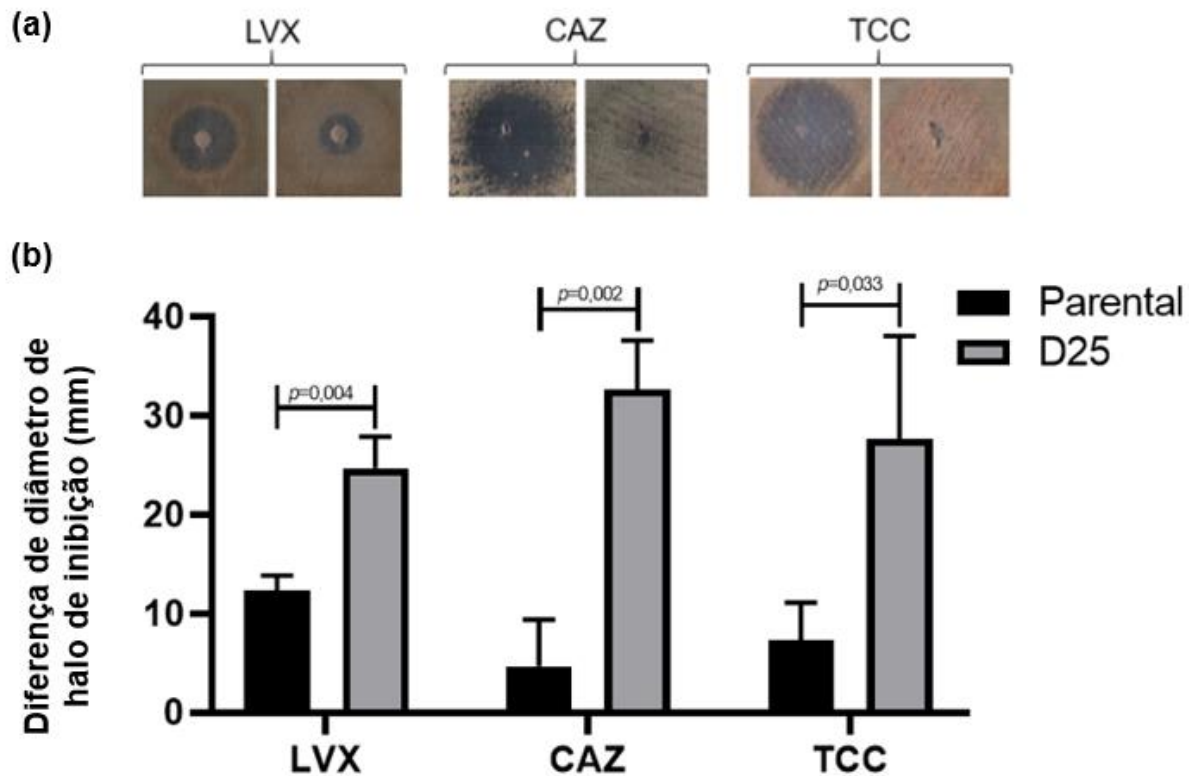


Figura 17 – Teste de disco-difusão adaptado de levofloxacina (LVX), ceftazidima (CAZ) e ticarcilina/clavulanato (TCC) para as cepas parental e induzida. (a) Nota-se visível diminuição do halo de inibição (recrescimento) da cepa induzida D25 em relação à parental. (b) Diferença do diâmetro de halo antes e depois da retirada do disco de antimicrobiano em três experimentos independentes. Teste *t* de *Student* foi realizado nos pares parental/D25 para cada antimicrobiano, com diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os casos.

	CLO	MIN	PXB	SXT
PARENTAL				
D25				

Figura 18 – Teste de disco-difusão adaptado de cloranfenicol (CLO), minociclina (MIN), polimixina B (PXB) e sulfametoxazol/trimetoprim (SXT) para as cepas parental e induzida D25. Nota-se

semelhança entre o diâmetro dos halos de inibição da cepa induzida D25 e sua parental após a retirada dos discos de antimicrobianos.

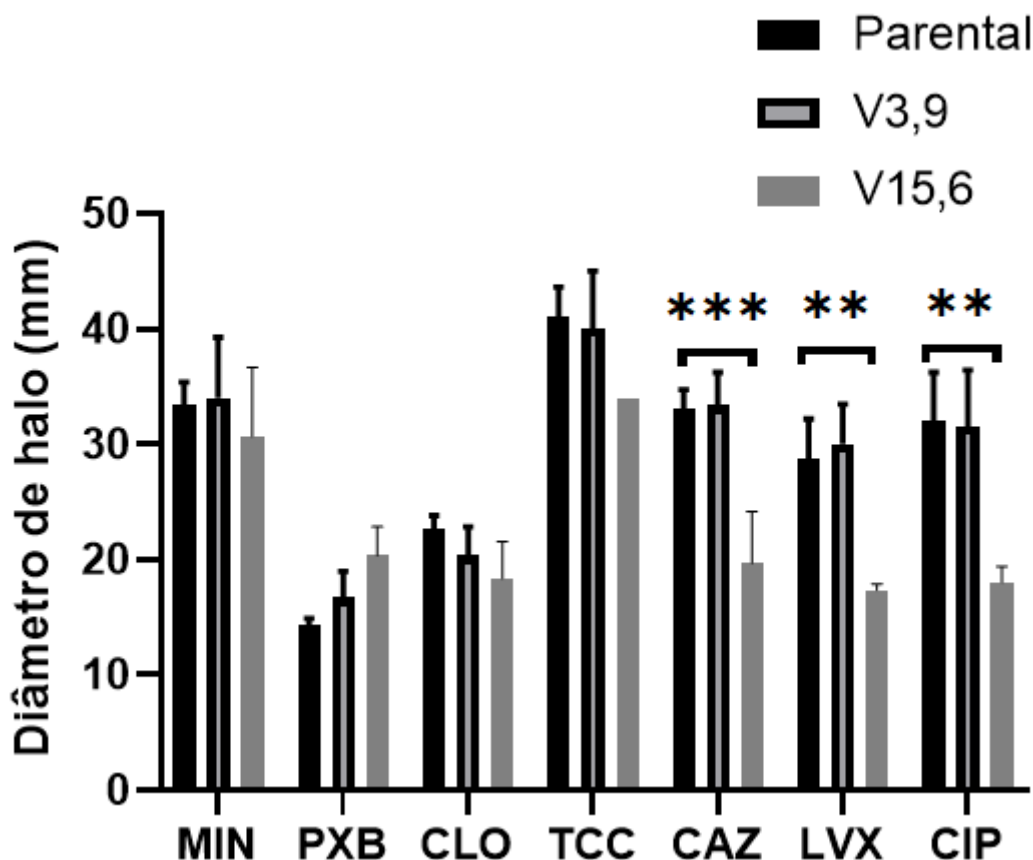


Figura 19 – Diâmetro do halo de inibição das cepas *S. maltophilia* parental (ATCC 13637) e induzidas por vancomicina (V3,9 e V15,6) na primeira etapa do teste de disco-difusão adaptado (primeiras 24 h). Nota-se diferença do halo para a V15,6 e sua parental nos antimicrobianos CAZ, LVX e CIP, indicando menor susceptibilidade da V15,6 a estes antimicrobianos. Teste *t* de *Student* foi realizado nos pares parental/induzida para cada antimicrobiano (MIN – minociclina; PXB – polimixina B; CLO – cloranfenicol; TCC – ticarcilina/clavulanato; CAZ – ceftazidima; LVX – levofloxacina; CIP – ciprofloxacina). *** ($p=0,000081$), ** ($p=0,000516$).

5.6 CURVA DE TEMPO DE MORTE

A cinética de morte da cepa parental e induzida D25, de inóculo inicial em fase estacionária, na presença de 50 vezes a CIM de levofloxacina (6,25 µg/mL) nos mostra a sobrevivência prolongada de uma subpopulação da amostra D25 (<1%) em relação à parental (Figura 20). Embora o tempo mínimo para morte de 99% da população (MDK₉₉) tenha sido próximo para ambas as cepas (~48 min), o tempo

mínimo para morte de 99,99% da população ($MDK_{99,99}$) foi cerca de 1,6x maior para a cepa D25 (~213 min) que para a cepa parental (~135 min). Entretanto, não houve diferença estatística significativa em nenhum dos pontos testados.

A fim de classificar a população como persistente do tipo tempo-dependente e persistente do tipo dose-dependente, realizamos a cinética de morte frente à LVX mostradas pelas curvas da Figura 21(a) e 21(b), respectivamente. A figura 21(a) mostra um $MDK_{99,99}$ cerca de 1,16x maior para a amostra D25 (~111 min) que para a cepa parental (~96 min). A figura 21(b) mostra um MDK_{99} de ~75 min e ~39 min e $MDK_{99,99}$ de ~239 min e ~213 min para a cepa D25 e para a parental, respectivamente. O MDK_{99} e $MDK_{99,99}$ da cepa D25 foi 1,9 e 1,1x maior que o da cepa parental, nesta condição. Entretanto, estas diferenças entre o crescimento de colônias não foram estatisticamente significativas, impedindo a classificação acurada do tipo de persistência.

A Figura 22(a) mostra a cinética de morte frente à CAZ, outro antimicrobiano que mostrou tolerância após teste de disco-difusão modificado. A curva ilustrada por essa figura mostra que o crescimento de colônias da amostra D25 foi maior que a parental, principalmente nos tempos de 24 e 48h; porém, não permitiu a observação do $MDK_{99,99}$ nos intervalos de tempo testados. Além disso, houve recrescimento tanto da amostra D25 quanto da parental após 8h de incubação frente à CAZ. A figura 22(b) mostra que a cinética de morte da cepa D25 foi similar à parental quando expostas à CIP.

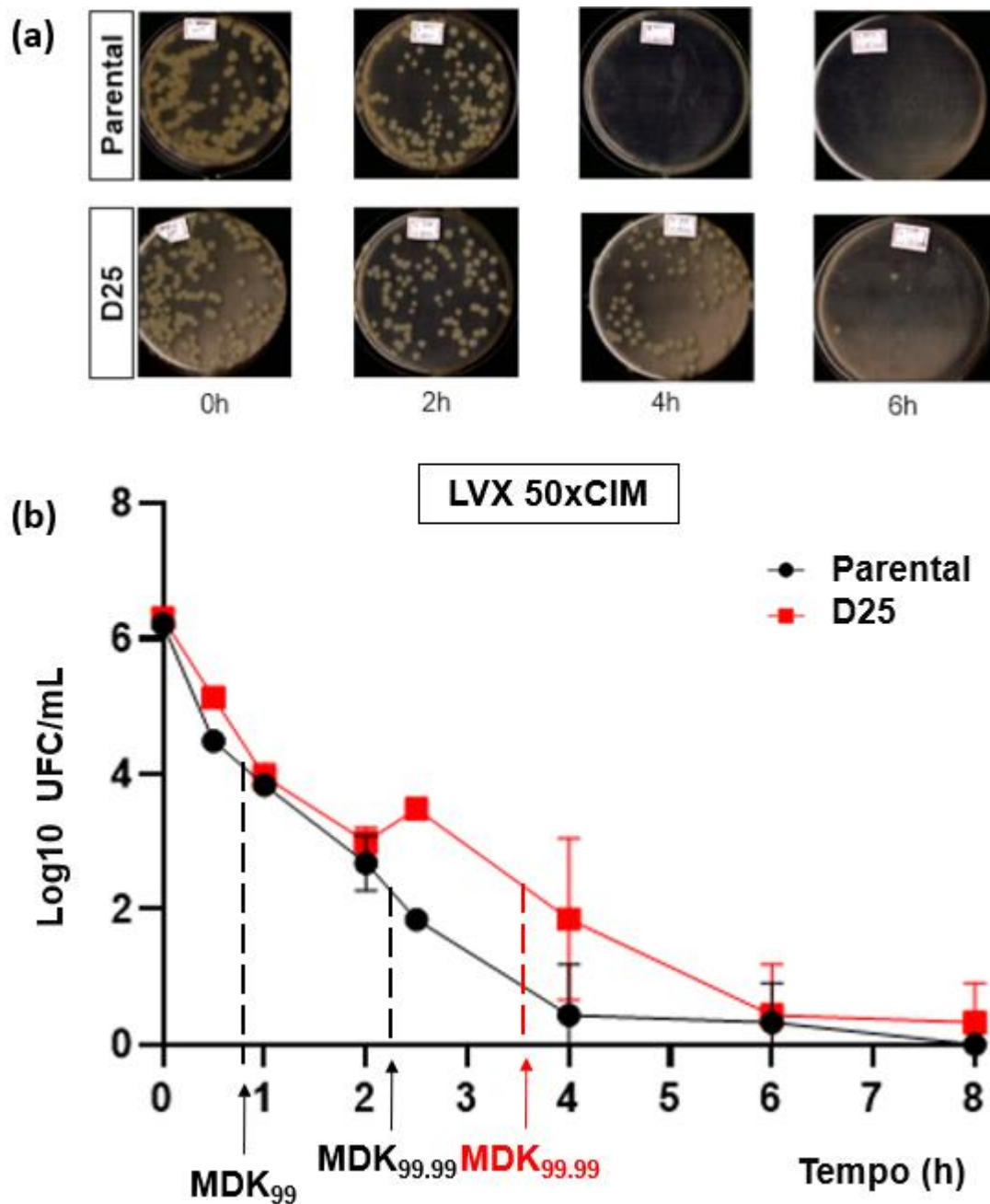


Figura 20 - Cinética de morte em presença de levofloxacina (LVX) (50 vezes a Concentração Inibitória Mínima [CIM] = 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das cepas *S. maltophilia* parental (ATCC 13637) e induzida por 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de daptomicina (D25), com inóculo inicial em fase estacionária de crescimento. (a) Contagem de colônias viáveis da amostra parental e induzida D25 nos tempos de 0-6 horas após adição de LVX. (b) Curva de morte das cepas parental e induzida gerada a partir de três experimentos independentes. O MDK_{99} foi o mesmo para ambas as amostras (~48 min). O $\text{MDK}_{99,99}$ (em vermelho) da cepa D25 (~213 min) foi maior em relação ao da parental (~135 min). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o crescimento de colônias das amostras em nenhum dos tempos testados. MDK_{99} e $\text{MDK}_{99,99}$ representam o tempo mínimo para morte de 99% e 99,99% da população bacteriana, respectivamente.

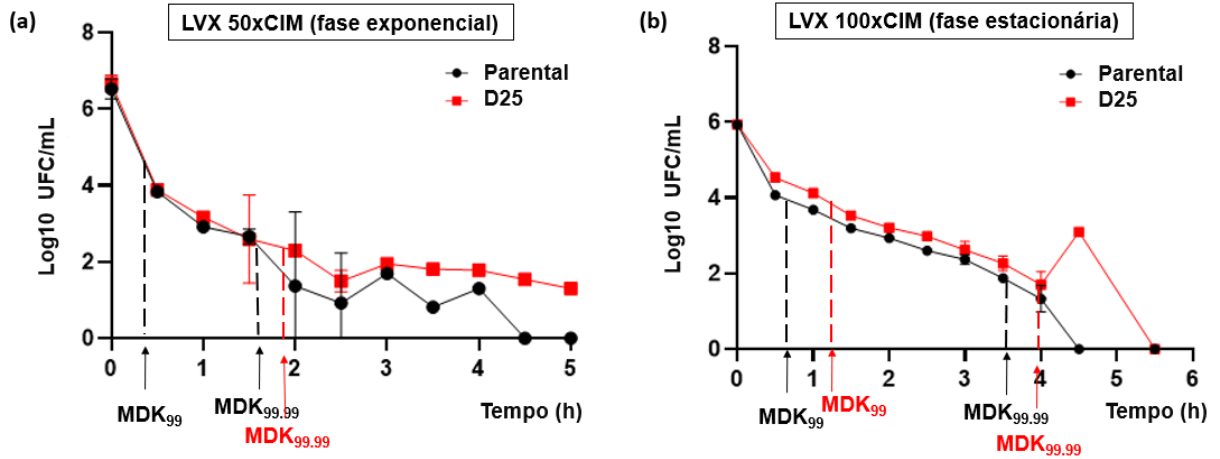


Figura 21 – Cinética de morte em presença de 50 vezes a Concentração Inibitória Mínima (50xCIM = 6,25 µg/mL) (a) e 100xCIM (12,5 µg/mL) (b) de levofloxacina (LVX) das cepas *Stenotrophomonas maltophilia* parental (ATCC 13637) e induzida por 25 µg/mL de daptomicina (D25), com inóculo inicial em fase exponencial (a) e estacionária (b) de crescimento. A curva (a) mostra os dados de dois experimentos independentes e a (b) de apenas um experimento. MDK₉₉ e MDK_{99.99} representam o tempo mínimo para morte de 99% e 99,99% da população bacteriana, respectivamente.

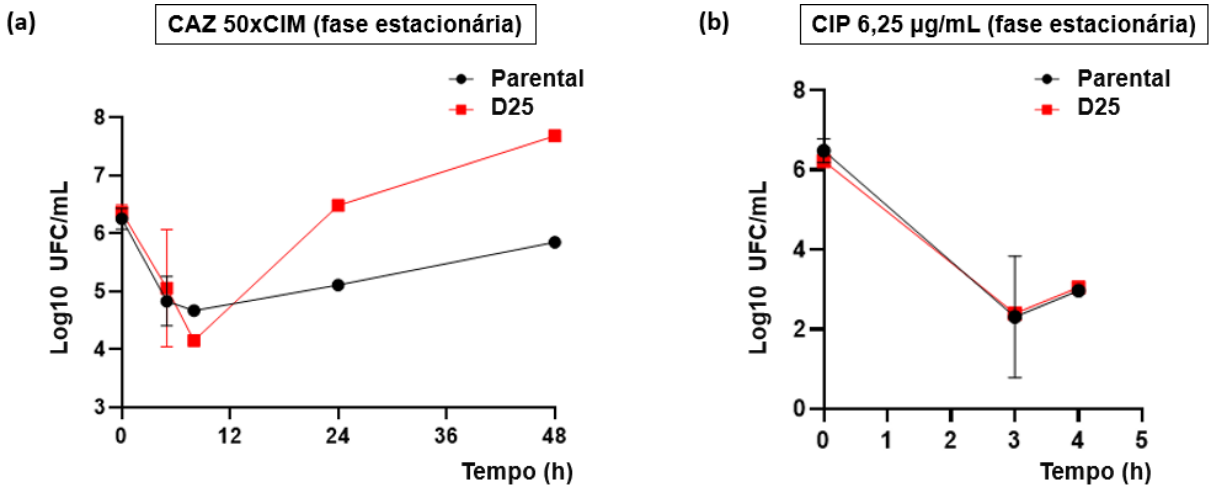


Figura 22 - Cinética de morte em presença de 50 vezes a Concentração Inibitória Mínima (50xCIM = 200 µg/mL) de ceftazidima (CAZ) (a) e 6,25 µg/mL de ciprofloxacina (CIP) (b) das cepas *Stenotrophomonas maltophilia* parental (ATCC 13637) e induzida por 25 µg/mL de daptomicina (D25), com inóculo inicial na fase estacionária de crescimento. Na curva (a), os dois primeiros tempos (0 e 5h) representam três experimentos independentes e os três últimos tempos (8, 24 e 48 h) apenas um. A curva (b) mostra resultados de dois experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

S. maltophilia é um bacilo gram-negativo cada vez mais isolado de infecções hospitalares no mundo todo, principalmente as de corrente sanguínea e pulmonares de pacientes imunocomprometidos ou que utilizam dispositivos médicos invasivos, como o cateter vascular (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017; BROOKE, 2012). Frequentemente, as infecções por *S. maltophilia* são acompanhadas de outros microrganismos, como nos casos de coinfeção ou infecções polimicrobianas (DE MAURI et al., 2014); portanto, o tratamento antimicrobiano de escolha deve ser apropriado para cada patógeno. Além disso, este bacilo é constantemente exposto a drogas em terapias empíricas, que são utilizadas quando o paciente infectado está em estado grave e imunossuprimido e precisa de tratamento imediato (HANES et al., 2002). Devido ao limitado arsenal de drogas voltadas para o tratamento de infecções por *S. maltophilia*, que é naturalmente multirresistente, a maioria das terapias empíricas não é adequada para este microrganismo (HANES et al., 2002; YILMAZ et al., 2010).

Os pacientes renais crônicos que fazem tratamento hemodialítico são grupo de risco para infecções por *S. maltophilia* visto que apresentam imunidade baixa, comorbidades e uso de acessos artificiais, como cateteres venosos ou peritoneais (DE MAURI et al., 2014; GOKHAN GOZEL; CELIK; ELALDI, 2015). No Brasil, o tratamento antimicrobiano empírico para bacteremias em pacientes hemodialíticos geralmente consiste na administração de vancomicina, um glicopeptídeo que cobre bactérias gram-positivas, e gentamicina, um aminoglicosídeo de amplo espectro (PENEDO DA VITÓRIA et al., 2018). Em situações em que os dados epidemiológicos sugerem elevado número de bactérias resistentes ou de susceptibilidade reduzida à vancomicina, pode ocorrer a substituição desta por daptomicina, um antimicrobiano lipopeptídeo usado para tratar infecções por bactérias gram-positivas (DIOLEZ et al., 2017). Nenhuma destas drogas citadas é indicada pelo CLSI (2018) contra *S. maltophilia*, portanto, nosso objetivo foi investigar se o uso prévio das mesmas induz tolerância cruzada *in vitro* frente às drogas de escolha para o tratamento deste bacilo.

A indução da tolerância foi realizada com base no protocolo de Haaber e colaboradores (2015), que fizeram a exposição *in vitro* de *Staphylococcus aureus* à colistina, antimicrobiano polipeptídico cíclico utilizado para tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, que frequentemente acompanham *S. aureus* em coinfeções. Neste estudo, os autores relataram a presença de tolerância reversível à vancomicina nas cepas *S. aureus* pré-expostas à colistina. Portanto, seguindo a ideia dos autores, realizamos uma triagem de antimicrobianos potencialmente indutores de tolerância. Expomos a cepa *S. maltophilia*, em fase exponencial de crescimento, aos três antimicrobianos frequentemente utilizados na terapia empírica de infecções de corrente sanguínea de pacientes em hemodiálise, que são a vancomicina, gentamicina e daptomicina.

Inicialmente analisamos o efeito da pré-exposição a estes antimicrobianos sobre a viabilidade de *S. maltophilia*. Nossos achados mostraram que gentamicina exerceu efeito dose dependente contra *S. maltophilia* (Figura 11), eliminando toda a população bacteriana nas concentrações acima de 15,6 µg/mL testadas. Apesar da resistência intrínseca de *S. maltophilia* aos aminoglicosídeos, alguns estudos comprovam a eficácia da gentamicina para tratamento de infecções por este bacilo, principalmente quando associada a outros antimicrobianos (LIBANORE et al., 2004; LOONEY; NARITA; MÜHLEMANN, 2009; VAIDYANATHAN et al., 2005). Como nosso objetivo foi testar a indução de tolerância por drogas às quais *S. maltophilia* é, de fato, resistente, eliminamos a gentamicina dos demais ensaios.

Vancomicina apresentou efeito parcial contra *S. maltophilia* apenas na concentração mais alta utilizada neste estudo (500 µg/mL) (Figura 11). A inatividade da vancomicina frente à *S. maltophilia* se deve à resistência intrínseca de bactérias gram-negativas a esta droga, devido à impermeabilidade da membrana externa a moléculas grandes como a vancomicina (FERNANDES et al., 2017). Nossa hipótese para explicar esta atividade parcial de vancomicina a 500 µg/mL sobre *S. maltophilia* é a de que, assim como sugerido por Zhou e colaboradores (2015), uma pequena quantidade do antimicrobiano pode ser capaz de penetrar a membrana externa e exercer efeito significativo. Contudo, a concentração de 500 µg/mL é muito superior

à dose terapêutica (15-20 µg/mL) (RYBAK et al., 2009), de forma que não se aplica ao contexto clínico.

Como esperado, a exposição à daptomicina não afetou o crescimento de *S. maltophilia* (Figura 11) devido à resistência intrínseca de bactérias gram-negativas conferida pela impermeabilidade da membrana externa e pela baixa disponibilidade de alvos, os fosfolípidios aniônicos na membrana citoplasmática (RANDALL et al., 2013; SCHRIEVER et al., 2005). Não há ensaios clínicos que definam a concentração plasmática efetiva de daptomicina para os diferentes tipos de infecção (REIBER et al., 2015). De modo geral, daptomicina exhibe grande variabilidade de concentrações séricas mínimas entre pacientes (2,0 - 68,0 µg/mL), refletindo as variações na dosagem e na função renal (FALCONE et al., 2012; RECALDE et al., 2017; REIBER et al., 2015). Assim, a concentração máxima de daptomicina (25 µg/mL) testada por nós é um alvo provável no contexto clínico.

Feita a exclusão de gentamicina dos ensaios, pelas razões colocadas, a análise do efeito da pré-exposição de *S. maltophilia* à vancomicina e daptomicina revelou um aumento no crescimento do microrganismo na presença de levofloxacina, sugerindo indução de colônias tolerantes nos ensaios de triagem. Entretanto, a análise quantitativa deste incremento no número de colônias não mostrou diferenças estatísticas significativas. Isto pode ser justificado pelo fato de cepas persistentes corresponderem a uma subpopulação muito pequena (menor que 1% da população total), não detectável com este protocolo, o que não exclui sua relevância do ponto de vista clínico.

Ainda revelando a dificuldade no estudo da tolerância e persistência, o parâmetro CBM/CIM ≥ 32 como indicativo de tolerância bacteriana (SHERRIS, 1986) não se mostrou útil. Nossos achados, em concordância com Taylor e colaboradores (1983), refletem a ineficácia desta técnica em identificar cepas persistentes que correspondem a menos que 0,1% da população total. Neste ensaio, observamos um maior crescimento da cepa induzida D25 em relação a sua parental na presença de concentração bactericida de levofloxacina, corroborando com a hipótese de tolerância desta amostra. Porém, para o ponto de corte da CBM (menor concentração de antimicrobiano que reduz 99,9% do inóculo bacteriano inicial após

incubação de 24 h), a população bacteriana residual foi desconsiderada, visto que foi menor que 0,1% da população bacteriana inicial. Embora vários estudos concordem sobre a arbitrariedade do ponto de corte para CBM (PETERSON; SHANHOLTZER, 1992; SHANHOLTZER et al., 1984), esta medida ainda é referência para avaliação da atividade bactericida de antimicrobianos (OMARA; ZAWRAH; SAMY, 2017; THWAITES et al., 2018). Como sugerido por Eagle e Musselman (1948), o ponto de corte para a CBM deve se ajustar ao inóculo inicial. Eles explicam que o ponto de corte padrão (redução de $3 \log_{10}$) foi obtido em referência a um inóculo bacteriano de 10^3 UFC/mL; portanto, se o inóculo for de 10^6 UFC/mL, o ponto de corte deve ser de 99,9999%. Em suma, podemos concluir que uma razão CBM/CIM <32 não deve ser usada para excluir a tolerância; para isto, outros ensaios devem ser utilizados.

O teste de disco-difusão utilizado neste trabalho foi adaptado do TDtest proposto por Gefen e colaboradores (2017). O teste original faz a substituição dos discos de antimicrobiano por discos contendo solução nutriente; entretanto, após ensaios piloto, observamos que não houve necessidade de substituição, já que o crescimento de tolerantes ocorreu com ou sem a troca dos discos. Provavelmente, por utilizarmos ágar MH, cuja composição apresenta mais nutrientes que o ágar Luria-Bertani utilizado pelos autores (GEFEN et al., 2017), as colônias tolerantes não necessitaram da suplementação de nutrientes.

Nossos achados com este ensaio mostraram que a exposição prévia à daptomicina induziu tolerância cruzada à levofloxacina, ceftazidima e ticarcilina-clavulanato em *S. maltophilia* (cepa D25). Embora bactérias gram-negativas não apresentem alvo para daptomicina (RANDALL et al., 2013), de alguma forma esta droga alterou o metabolismo bacteriano, levando à tolerância cruzada. Contudo, não houve formação de tolerantes para os antimicrobianos minociclina, cloranfenicol e polimixina B. Para antimicrobianos bacteriostáticos, este crescimento após retirada do antimicrobiano seria um fenômeno natural, como o resultado obtido para sulfametoxazol/trimetoprim. A permanência do halo de inibição (embora similares para a parental e a tolerante D25) após a retirada dos antimicrobianos bacteriostáticos minociclina e cloranfenicol pode ser explicada pela concentração

dos fármacos ainda estarem na faixa inibitória para *S. maltophilia*. A ausência de tolerância da cepa D25 para o antimicrobiano bactericida polimixina B, sugere que este fármaco possa ser uma boa opção para se evitar falha terapêutica devido à tolerância em situações clínicas de uso prévio de daptomicina em infecções onde *S. maltophilia* possa estar presente. Polimixinas são ativas contra *S. maltophilia in vitro*, especialmente, em combinação com outras drogas como tetraciclina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim (BETTS et al., 2014; GALES; JONES; SADER, 2006; GIAMARELLOS-BOURBOULIS; KARNESIS; GIAMARELLOU, 2002; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; SAMONIS et al., 2012). Entretanto, a monoterapia com colistina (Polimixina E) deve ser evitada devido à capacidade de adaptação de *S. maltophilia* ao fármaco, um fenômeno chamado por Martínez-Servat e colaboradores (2018) como “resistência adaptativa”, cuja definição se confunde com aquela que utilizamos para tolerância. Além disso, o CLSI e o EUCAST retiraram a polimixina B de seus manuais de referência para teste de disco-difusão devido à baixa difusão deste antimicrobiano em ágar, tornando o resultado observado para este antimicrobiano não confiável (VASOO, 2017).

Outros estudos mostram o efeito da exposição a um antimicrobiano sobre a tolerância bacteriana a antimicrobianos de diferentes classes (tolerância cruzada) (CHUNG et al., 2018; HAABER et al., 2015; JOHNSON; LEVIN, 2013; LECHNER et al., 2012; MICHIELS et al., 2016; WIUFF et al., 2005). Os achados de Wiuff e colaboradores (2005) sugerem que os mecanismos por trás deste fenômeno não são comuns a todas as classes de antimicrobianos. Neste estudo, ao expor a cepa *E. coli* a 5 antimicrobianos separadamente (ciprofloxacina, ampicilina, rifampicina, estreptomicina e tetraciclina), foi observada tolerância a eles mesmos e tolerância cruzada a 3 ou 4 classes. Assim como nosso estudo, a droga mais susceptível à tolerância cruzada pertencia à classe dos beta-lactâmicos (ampicilina) (WIUFF et al., 2005). Já Michiels e colaboradores (2016) discutem que a persistência pode ser uma estratégia genérica que confere tolerância a vários antimicrobianos, o que limita o arsenal de drogas após seleção de persistentes em tratamentos prévios malsucedidos. Michiels e colaboradores (2016) expuseram cepas gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Acinetobacter baumannii*) a ciclos de tratamento com ampicilina, e observaram

elevado índice de tolerância aos antimicrobianos testados (amicacina, ciprofloxacina, meropenem e colistina), principalmente aos beta-lactâmicos amicacina e meropenem. Em relação à cepa *P. aeruginosa*, com exceção da colistina, houve tolerância cruzada a todos os antimicrobianos testados. Lechner e colaboradores (2012) afirmam que a tolerância aos antimicrobianos é o produto de dois fatores: a presença de persistentes antes da exposição ao antimicrobiano e a resposta bacteriana adaptativa a essa exposição. Neste estudo, os autores expuseram a bactéria *S. aureus* a daptomicina, tobramicina e ciprofloxacina por determinados períodos e depois reexpuseram aos mesmo antimicrobianos. Seus achados mostram que a tolerância cruzada foi raramente observada, com exceção da exposição inicial a tobramicina e reexposição à ciprofloxacina, sugerindo que a ordem de exposição e, conseqüentemente a resposta adaptativa frente a este antimicrobiano é crucial para a formação de persistentes (LECHNER et al., 2012). Recentemente, Chung e colaboradores (2018), ao exporem ciclicamente *S. aureus* a altas concentrações de oxacilina, selecionaram cepas tolerantes que tiveram uma redução na mortalidade em comparação com a cepa parental quando expostas a concentrações de 15 vezes a CIM de vancomicina e D-cicloserina. Apesar da crescente importância clínica e dificuldade de controle de *S. maltophilia*, este é o primeiro estudo sobre a indução de tolerância cruzada neste bacilo oportunista. À exceção de polimixina B, observamos tolerância cruzada induzida por daptomicina (cepa D25) para todos os antimicrobianos bactericidas testados, de forma que maior atenção deve ser dada à terapia empírica ou à terapia de infecções polimicrobianas onde este microrganismo possa estar presente, no sentido de evitar falhas terapêuticas em decorrência da indução de tolerância por daptomicina.

A exposição prévia à vancomicina não induziu tolerância a nenhum dos antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão modificado, porém, na concentração de 15,6 µg/mL, diminuiu a susceptibilidade de *S. maltophilia* a ceftazidima, levofloxacina e ciprofloxacina. Não seria a primeira vez que a exposição a antimicrobianos induz ou seleciona cepas resistentes (HUGHES; ANDERSSON, 2017; KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010; ONG et al., 2011). Considerando que a concentração de vancomicina testada está dentro da faixa terapêutica (RYBAK et al., 2009), nosso achado se mostra alarmante, uma vez que esta

exposição pode levar ao estabelecimento de resistência bacteriana, complicando sobremaneira o tratamento de infecções por *S. maltophilia*. Como o foco do nosso estudo foi a investigação de tolerância e não resistência, estes achados serão investigados futuramente.

Considerando que uma cepa fenotipicamente tolerante, apresenta morte mais lenta que as cepas sensíveis na presença de antimicrobianos, os ensaios de curva de tempo de morte são úteis na investigação deste fenômeno. Entretanto, devido à dificuldade de interpretação dos dados obtidos de laboratórios que utilizam protocolos diferentes, Brauner e colaboradores (2016) propuseram a padronização do MDK (tempo mínimo para morte de determinada fração da população bacteriana total) como medida para diferenciar cepas sensíveis, tolerantes ($MDK_{99,9}$) e persistentes ($MDK_{99,99}$). A cepa D25 mostrou $MDK_{99,99}$ 1,6 vezes maior que a cepa parental no ensaio em fase estacionária, sugerindo apresentar o fenômeno de persistência. Contudo, não existem parâmetros que determinem se esta diferença é suficiente para caracterizar D25 como persistente. Os ensaios realizados em fase estacionária com concentração elevada do fármaco e em fase exponencial de crescimento permitem diferenciar o tipo de persistência, se concentração ou tempo dependente (*lag* ou crescimento lento), respectivamente (BRAUNER et al., 2016). Nestes ensaios D25 mostrou maior sobrevivência que a parental na presença de levofloxacina, mas as pequenas diferenças no $MDK_{99,99}$ não nos permitiram concluir sobre o tipo da aparente persistência. Ademais, os ensaios eram pouco reprodutíveis, o que pode ser atribuído ao crescimento aleatório da subpopulação persistente. De fato, para Brauner e colaboradores (2017), os resultados obtidos entre os experimentos de curva de tempo de morte são dificilmente comparáveis, uma vez que a taxa de morte é raramente exponencial e é influenciada por uma variedade de fatores ambientais e estado metabólico bacteriano. Segundo Johnson e Levin (2013), esta população de persistentes geneticamente susceptíveis, mas fenotipicamente resistentes é gerada aleatoriamente a partir da população total. Utilizando modelos matemáticos e experimentais, estes mesmos autores mostraram em *S. aureus* que o nível de persistência varia entre drogas, concentrações e culturas independentes. Estes autores acreditam que a persistência é o produto de diferentes tipos de erros na replicação celular que resultam em um período

transiente de não replicação e/ou metabolismo lento de células individuais em uma população em crescimento. Por isso a ubiquidade do fenômeno (JOHNSON; LEVIN, 2013).

Ademais, através da curva de tempo de morte, podemos constatar a alta atividade bactericida *in vitro* de levofloxacina contra as cepas *S. maltophilia*. Em contrapartida, os experimentos realizados por Grillon e colaboradores (2016) para 5 isolados clínicos de *S. maltophilia*, mostraram atividade bacteriostática de levofloxacina para 4 destes isolados. A discrepância de resultados pode ser justificada pela falta de padronização entre as técnicas, como diferença de concentração e fase de crescimento do inóculo.

Em relação à cinética de morte na presença de ciprofloxacina, apesar de ter sido realizado apenas um experimento independente, os resultados foram similares entre as amostras parental e D25, sugerindo que a tolerância da cepa D25 frente à levofloxacina pode não estar associada à classe do antimicrobianos.

O MDK_{99,99} não pôde ser extraído da curva de tempo de morte em ceftazidima, mas também observamos maior crescimento da cepa D25 nos tempos de 24 e 48 h em relação à cepa parental. O recrescimento observado após 24h de incubação em ambas as cepas, superando o inóculo inicial da D25, foi consistente com o estudo de Garrison e colaboradores (1996), que reportou recrescimento de cepas *S. maltophilia* frente à ceftazidima. Segundo Peterson e Shanholtzer (1992), quando inóculos em fase estacionária de crescimento são utilizados, o número de bactérias sobreviventes tende a crescer após 24 h de incubação. Outra hipótese para o recrescimento celular é o decaimento do antimicrobiano, permitindo o crescimento tanto da população remanescente sensível quanto da tolerante (LEVIN; UDEKWU, 2010).

Em conclusão, nossos achados mostram, pela primeira vez, que a exposição *in vitro* da cepa *S. maltophilia* à daptomicina é capaz de induzir tolerância cruzada a importantes antimicrobianos bactericidas indicados para seu controle. Neste sentido, maior atenção deve ser dada à terapia empírica ou à terapia de infecções mistas onde este microrganismo possa estar presente, a fim de se evitar falhas terapêuticas

em decorrência da indução de tolerância por daptomicina. Os mecanismos desta indução de tolerância, bem como sua ocorrência *in vivo* e relevância clínica merecem ser investigados futuramente.

7 CONCLUSÕES

- A exposição prévia à daptomicina e vancomicina aumentou o crescimento de *S. maltophilia* na presença de levofloxacina, sugerindo indução de colônias tolerantes.
- O parâmetro CBM/CIM ≥ 32 como indicativo de tolerância bacteriana desconsidera as cepas persistentes que representam menos de 0,1% da população bacteriana total, não sendo adequado para pesquisa de persistência.
- A exposição prévia à daptomicina induziu tolerância cruzada à levofloxacina, ceftazidima e ticarcilina/clavulanato, detectada pelo método de disco-difusão modificado.
- A exposição prévia à vancomicina não induziu tolerância a nenhum dos antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão modificado, porém, na concentração de 15,6 $\mu\text{g/mL}$, diminuiu a susceptibilidade de *S. maltophilia* a ceftazidima, levofloxacina e ciprofloxacina.
- A cepa D25 pode ser classificada como persistente à levofloxacina no ensaio de curva de morte em fase estacionária, entretanto não foi possível determinar o tipo de persistência, se tempo ou dose-dependente, devido à baixa reprodutibilidade dos ensaios.
- De modo geral, a cepa tolerante D25 apresentou maior sobrevivência em todos os ensaios de curva de morte com levofloxacina e ceftazidima, apesar da baixa reprodutibilidade do método.

8 REFERÊNCIAS

ADEGOKE, A. A.; STENSTRÖM, T. A.; OKOH, A. I. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 4 SUPPL. 2, p. 627–631, 30 nov. 2017.

AL-ANAZI, K. A.; AL-JASSER, A. M. Infections Caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. August, p. 1–11, 2014.

ALLON, M. Treatment Guidelines for Dialysis Catheter–Related Bacteremia: An Update. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, n. 1, p. 13–17, jul. 2009.

ALMEIDA, M. Infecções hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. **Arquivos de ciências da saúde**, v. 12, n. 3, p. 141–145, 2005.

ANDERSON, S. W. et al. Characterization of Small-Colony-Variant *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from the Sputum Specimens of Five Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 529–535, 1 fev. 2007.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5–16, 2001.

ARAOKA, H.; BABA, M.; YONEYAMA, A. Risk factors for mortality among patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in Tokyo, Japan, 1996–2009. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 605–608, 23 maio 2010.

BARRY, A. L. et al. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. [s.l.] Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999. v. 19

BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, 1966.

BERGH, B. VAN DEN; FAUVART, M.; MICHIELS, J. Formation , physiology , ecology , evolution and clinical importance of bacterial persisters. n. February, p. 219–251, 2017.

BETTS, J. W. et al. Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1565–1572, 30 set. 2014.

BIZZINI, A. et al. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1549–1554, 1 maio 2010.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320–330, 2016.

BRAUNER, A. et al. An Experimental Framework for Quantifying Bacterial Tolerance. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 12, p. 2664–2671, 2017.

BROOKE, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 2–41, 2012.

CABRAL, D.; WURSTER, J.; BELENKY, P. Antibiotic Persistence as a Metabolic Adaptation: Stress, Metabolism, the Host, and New Directions. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 14, 2018.

CHANG, Y.-T. et al. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. September, p. 1–20, 2015.

CHATELUT, M. et al. **Epidemiological Typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by PCR**JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228066/pdf/330912.pdf>>. Acesso

em: 22 jan. 2019.

CHUNG, M. et al. Phenotypic signatures and genetic determinants of oxacillin tolerance in a laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0199707, 3 jul. 2018.

CLSI. **M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 10th. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. v. 35

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COHEN, N. R.; LOBRITZ, M. A.; COLLINS, J. J. Microbial Persistence and the Road to Drug Resistance. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 6, p. 632–642, jun. 2013.

DAVIES, B. I. The importance of the geometric mean MIC. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, n. 3, p. 471–472, 1990.

DE MAURI, A. et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging pathogen in dialysis units. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. Pt_11, p. 1407–1410, 1 nov. 2014.

DENTON, M.; KERR, K. G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 57–80, 1998.

DIOLEZ, J. et al. Pilot Pharmacokinetic Study of High-Dose Daptomycin in Hemodialysis Patients With Infected Medical Devices. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 70, n. 5, p. 732–734, nov. 2017.

DÖRR, T.; LEWIS, K.; VULIĆ, M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 12, 2009.

EAGLE, H.; MUSSELMAN, A. D. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. **J. Exp. Med**, 1948.

EL MEOUCHE, I.; SIU, Y.; DUNLOP, M. J. Stochastic expression of a multiple antibiotic resistance activator confers transient resistance in single cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19538, 13 maio 2016.

ESPOSITO, A. et al. Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis Lung over Chronic Infection: A Genomic and Phenotypic Population Study. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1590, 28 ago. 2017.

FALAGAS, M. E. et al. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 889–894, nov. 2008.

FALCONE, M. et al. Daptomycin serum levels in critical patients undergoing continuous renal replacement. **Journal of Chemotherapy**, v. 24, n. 5, p. 253–256, 12 out. 2012.

FERNANDES, M. M. et al. Nanotransformation of Vancomycin Overcomes the Intrinsic Resistance of Gram-Negative Bacteria. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 17, p. 15022–15030, 3 maio 2017.

FRIDMAN, O. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. **Nature**, v. 513, n. 7518, p. 418–421, 2014.

GALES, A. C. et al. Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. s2, p. S104–S113, 15 maio 2001.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n.

4, p. 354–360, 2012.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 4, p. 315–321, abr. 2006.

GALLO, S. W. et al. Isolation and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 8, p. 688–695, dez. 2016.

GARCIA PAEZ, J. I. et al. Factors associated with mortality in patients with bloodstream infection and pneumonia due to *Stenotrophomonas maltophilia*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 10, p. 901–906, 16 out. 2008.

GARRISON, M. W. et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: emergence of multidrug-resistant strains during therapy and in an in vitro pharmacodynamic chamber model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2859–2864, dez. 1996.

GEFEN, O. et al. TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. **Scientific Reports**, v. 7, n. July 2016, p. 1–9, 2017.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; KARNESIS, L.; GIAMARELLOU, H. Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 3, p. 259–263, 1 nov. 2002.

GOKHAN GOZEL, M.; CELIK, C.; ELALDI, N. *Stenotrophomonas maltophilia* Infections in Adults: Primary Bacteremia and Pneumonia. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 23569, 22 ago. 2015.

GRILLON, A. et al. Comparative Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Assessed by Minimum Inhibitory Concentrations and

Time-Kill Studies. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156690, 3 jun. 2016.

GUYOT, A.; TURTON, J. F.; GARNER, D. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* on an intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 85, n. 4, p. 303–307, dez. 2013.

HAABER, J. et al. Reversible Antibiotic Tolerance Induced in *Staphylococcus aureus* by Concurrent Drug Exposure. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2015.

HANDWERGER, S.; TOMASZ, A. Antibiotic Tolerance Among Clinical Isolates of Bacteria. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 349–380, abr. 1985.

HANES, S. D. et al. Risk Factors for Late-Onset Nosocomial Pneumonia Caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in Critically Ill Trauma Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 228–235, 1 ago. 2002.

HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, n. 6318, p. aaf4268, 16 dez. 2016.

HERAS, J. et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 270, 26 dez. 2015.

HOBBY, G. L.; MEYER, K.; CHAFFEE, E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 50, n. 2, p. 281–285, 1 jun. 1942.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 374–391, 1 maio 2017.

ISMAIL, N. et al. A Combination of Trimethoprim-sulfamethoxazole and Ceftazidime Showed Good In Vitro Activity against *Stenotrophomonas maltophilia*. **The Malaysian journal of medical sciences : MJMS**, v. 24, n. 2, p. 21–27, mar. 2017.

JOHNSON, P. J. T.; LEVIN, B. R. Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003123, 3 jan. 2013.

JUHÁSZ, E. et al. Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 333, 31 dez. 2014.

KALDALU, N.; HAURYLIUK, V.; TENSON, T. Persisters—as elusive as ever. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6545–6553, 4 ago. 2016.

KERR, K. G.; CORPS, C. M.; HAWKEY, P. M. Infections Due to *Xanthomonas maltophilia* in Patients with Hematologic Malignancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 762–762, 1 jul. 1991.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 311–320, fev. 2010.

LAI, C.-H. et al. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 37, n. 6, p. 350–358, 2004.

LECHNER, S. et al. Interplay between Population Dynamics and Drug Tolerance of *Staphylococcus aureus* Persister Cells. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 381–391, 2012.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 2, p. 156–167, 2011.

LEVIN-REISMAN, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, v. 355, n. 6327, p. 826–830, 2017.

LEVIN, B. R.; UDEKWU, K. I. Population Dynamics of Antibiotic Treatment: a Mathematical Model and Hypotheses for Time-Kill and Continuous-Culture Experiments. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 54, n. 8, p. 3414–3426, 2010.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48–56, 4 jan. 2007.

LEWIS, K.; SHAN, Y. Why tolerance invites resistance. **Science**, v. 355, n. 6327, p. 796–796, 2017.

LI, J. et al. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. June, p. 1–11, 13 jun. 2017.

LIBANORE, M. et al. Community-acquired infection due to *Stenotrophomonas maltophilia*: a rare cause of meningitis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 317–319, 1 set. 2004.

LOONEY, W. J.; NARITA, M.; MÜHLEMANN, K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 312–323, 2009.

MALINOWSKI, A. M. et al. Polysorbate 80 and polymyxin B inhibit *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 2, p. 154–156, fev. 2017.

MANIKANDAN, S. Measures of central tendency: The mean. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 140, 2011.

MARTÍNEZ-SERVAT, S. et al. Heterogeneous Colistin-Resistance Phenotypes Coexisting in *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Influence Colistin Susceptibility Testing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2871, 22 nov. 2018.

MERMEL, L. A. et al. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases

Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. 1–45, jul. 2009.

MEYLAN, P. R.; FRANCIOLI, P.; GLAUSER, M. P. Discrepancies between MBC and actual killing of viridans group streptococci by cell-wall-active antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 418–423, 1 mar. 1986.

MICHIELS, J. E. et al. In vitro emergence of high persistence upon periodic aminoglycoside challenge in the ESKAPE pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4630–4637, 2016.

MUKHERJEE, P.; ROY, P. Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–14, 2016.

NICODEMO, A. C. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 604–608, 25 fev. 2004.

NSEIR, S. et al. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. **Critical Care**, v. 10, n. 5, p. R143, 2006.

NUNVAR, J.; DREVINEK, P.; LICHA, I. DNA profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* by PCR targeted to its species-specific repetitive palindromic sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 59–66, jan. 2012.

OMARA, S. T.; ZAWRAH, M. F.; SAMY, A. A. Minimum bactericidal concentration of chemically synthesized silver nanoparticles against pathogenic *Salmonella* and *Shigella* strains isolated from layer poultry farms. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 08, p. 214–221, 2017.

ONG, D. S. Y. et al. Antibiotic exposure and resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species in intensive care units*. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 11, p. 2458–2463, nov. 2011.

PENEDO DA VITÓRIA, M. et al. Low serum trough concentrations and high

vancomycin MIC in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* from hemodialysis patients in Brazil. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 41, n. 1, p. 1, 1 dez. 2018.

PEREZ, F.; ADACHI, J.; BONOMO, R. A. Antibiotic-resistant gram-negative bacterial infections in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. Suppl 5, p. S335–S339, 2014.

PETERSON, L. R.; SHANHOLTZER, C. J. Tests for Bactericidal Effects of Antimicrobial Agents: Technical Performance and Clinical Relevance. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 5, p. 420–432, 1992.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 8 abr. 2017.

RANDALL, C. P. et al. The Target of Daptomycin Is Absent from *Escherichia coli* and Other Gram-Negative Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637–639, jan. 2013.

RANJBAR, R. et al. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens. **Iranian journal of pathology**, v. 12, n. 1, p. 25–34, 2017.

RECALDE, A. G. et al. **Daptomycin through serum levels : are they useful in a general hospital ?** Vienna: 27th ECCMID, 2017

REIBER, C. et al. Therapeutic Drug Monitoring of Daptomycin. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, n. 5, p. 634–640, out. 2015.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão.** Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 3 set. 2018.

RYAN, R. P. et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus

Stenotrophomonas. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 514–525, 2009.

RYBAK, M. et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 1, p. 82–98, 2009.

SAFFERT, R. T. et al. Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 887–892, 1 mar. 2011.

SAMONIS, G. et al. Stenotrophomonas maltophilia Infections in a General Hospital: Patient Characteristics, Antimicrobial Susceptibility, and Treatment Outcome. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37375, 18 maio 2012.

SCHRIEVER, C. A. et al. Daptomycin: A novel cyclic lipopeptide antimicrobial. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 11, p. 1145–1158, 2005.

SHANHOLTZER, C. J. et al. **MBCs for Staphylococcus aureus as Determined by Macrodilution and Microdilution Techniques**. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC284123/pdf/aac00380-0096.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

SHERRIS, J. C. Problems in In Vitro Determination of Antibiotic Tolerance in Clinical Isolates. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 7, n. 5, p. 63, 1986.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 73–82, 5 ago. 2015.

T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. Disponível em: <www.nanodrop.com>. Acesso em: 3 set. 2018.

TAYLOR, P. C. et al. **Determination of Minimum Bactericidal Concentrations of Oxacillin for Staphylococcus aureus: Influence and Significance of Technical Factors** **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184632/pdf/aac00202-0158.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

THWAITES, M. et al. Evaluation of the Bactericidal Activity of Plazomicin and Comparators against Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, 4 jun. 2018.

TOMASZ, A.; ALBINO, A.; ZANATI, E. Multiple Antibiotic Resistance in a Bacterium with Suppressed Autolytic System. **Nature**, v. 227, n. 5254, p. 138–140, 11 jul. 1970.

TRASTOY, R. et al. Mechanisms of Bacterial Tolerance and Persistence in the Gastrointestinal and Respiratory Environments. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–46, 1 ago. 2018.

TUOMANEN, E.; DURACK, D. T.; TOMASZ, A. MINIREVIEW Clinical Isolates of Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, p. 521–527, 1986.

VAIDYANATHAN, S. et al. Superinfection of perinephric abscess by *Stenotrophomonas maltophilia* in a tetraplegic patient. **Spinal Cord**, v. 43, n. 6, p. 394–395, 25 jun. 2005.

VASOO, S. Susceptibility Testing for the Polymyxins: Two Steps Back, Three Steps Forward? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 2573–2582, set. 2017.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VITÓRIA, M. P. DA. Monitoramento de Vancomicina em Pacientes em Tratamento Hemodialítico com Infecções de Corrente Sanguínea por *Staphylococcus* spp. **Dissertação (mestrado em Doenças Infecciosas), Universidade Federal do Espírito Santo**, p. 112, 2015.

VOGWILL, T. et al. Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 29, n. 6, p. 1223–1233, jun. 2016.

WANG, Y. L. et al. Monotherapy with Fluoroquinolone or Trimethoprim-Sulfamethoxazole for Treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 176–182, jan. 2014.

WASHINGTON, J. A. Current problems in antimicrobial susceptibility testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 9, n. 3, p. 135–138, mar. 1988.

WIUFF, C. et al. Phenotypic Tolerance: Antibiotic Enrichment of Noninherited Resistance in Bacterial Populations Phenotypic Tolerance: Antibiotic Enrichment of Noninherited Resistance in Bacterial Populations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1483, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug resistance**. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/>. Acesso em: 9 set. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibacterial agents in clinical development. **Geneva: World Health Organization; 2017**, p. 48, 2017.

YILMAZ, G. et al. Suitable empiric antibiotic therapy saves lives in nosocomial pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Turk J Med Sci**, v. 40, n. 1, p. 99–103, 2010.

ZHOU, A. et al. Synergistic Interactions of Vancomycin with Different Antibiotics against *Escherichia coli*: Trimethoprim and Nitrofurantoin Display Strong Synergies with Vancomycin against Wild-Type *E. coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 276–281, 19 jan. 2015.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

ANEXO A – Composição dos meios e reagentes**• Solução crio-preservante**

Peptona de proteose.....	6,75 g
Fosfato de potássio dibásico anidro (Neon).....	1,8 g
Fosfato de potássio monobásico.....	0,45 g
Cloreto de sódio P.A. (Nuclear).....	2,25 g
Glicerina P.A.....	45 mL
Água destilada q.s.p.....	450 mL

A solução foi autoclavada a 121° C durante 15 minutos e estocada à 4°C.

• CAMHB suplementado com cálcio (50 mg/L)

CaCl ₂ (10mg/L).....	12,5 µL
CAMHB (25mg/L de cálcio) q.s.p.....	5 mL

ANEXO B – Preparo das soluções estoque dos antimicrobianos

Para o cálculo do volume do diluente a ser utilizado no preparo da solução estoque, aplicou-se a equação abaixo:

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

As soluções estoque foram preparadas pesando-se 0,01g de cada antimicrobiano, pois este é o limite mínimo de sensibilidade da balança disponível no laboratório. Depois de diluir e homogeneizar, as soluções estoque foram aliquotadas em microtubos e armazenadas em freezer a -20°C.

Antimicrobianos	Concentração desejada ($\mu\text{g/mL}$)	Potência ($\mu\text{g/mg}$)	Volume final (mL)	Solvente*/Diluente
Ceftazidima	1000	882	8,82	Água destilada
Cloranfenicol	1000	1000	10	Etanol/ Água destilada
Daptomicina	100	1000	1	DMSO/ Água destilada
Gentamicina	2000	637	3,185	Água destilada
Levofloxacina	1000	999	9,99	NaOH 0,1M/Água destilada
Sulfametoxazol	2000	998	4,99	NaOH 0,1M/Água destilada
Trimetoprim	1000	998	9,98	DMSO/Água destilada
Vancomicina	2000	998	4,99	Água destilada

*Utilizar a quantidade mínima suficiente para solubilizar.

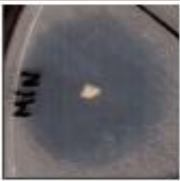
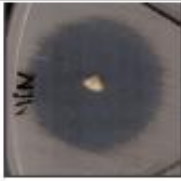











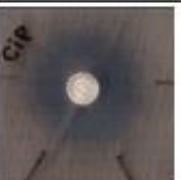
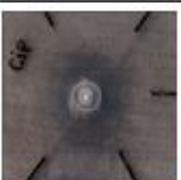






ANEXO C – Preparo das diluições dos antimicrobianos para testes de susceptibilidade

Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	+	Volume de CAMHB (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	5120	Solução estoque	1		9	512
2	512	Passo 1	1		1	256
3	512	Passo 1	1		3	128
4	512	Passo 1	1		7	64
5	64	Passo 4	1		1	32
6	64	Passo 4	1		3	16
7	64	Passo 4	1		7	8
8	8	Passo 7	1		1	4
9	8	Passo 7	1		3	2
10	8	Passo 7	1		7	1
11	1	Passo 10	1		1	0,5
12	1	Passo 10	1		3	0,25
13	1	Passo 10	1		7	0,125

CAMHB - *Cation-adjusted* Mueller-Hinton *Broth* (caldo Mueller-Hinton ajustado com cátions).

Tabela modificada do CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

ANEXO D – Halo de inibição das amostras parental e induzidas V3,9 e V15,6 após teste de disco-difusão adaptado.

	PARENTAL	V3,9	V15,6
MIN			
PXB			
LVX			
CAZ			
CIP			
TCC			
CLO			

Imagens obtidas após primeira etapa do teste de disco-difusão adaptado (24 h de incubação) das amostras parental e induzidas V3,9 e V15,6 para os antimicrobianos minociclina (MIN), polimixina B (PXB), levofloxacina (LVX), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), ticarcilina/clavulanato (TCC) e cloranfenicol (CLO). As imagens demarcadas em vermelho indicam menor susceptibilidade.