

Análise da ação antimicrobiana de diferentes concentrações de glutaraldeído sobre culturas de *Mycobacterium massiliense* obtidas de pacientes submetidos à laparoscopia e artroscopia.

Amanda Dominience Menezes¹; Monalisa Martins Trentini²; Ana Paula Junqueira-Kipnis³; André Kipnis⁴.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Universidade Federal de Goiás

akipnis@iptsp.ufg.br

1. Aluna de graduação em Medicina – Faculdade de Medicina - UFG.
2. Técnica 2A INCT-TB CNPq, Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas – IPTSP- UFG.
3. Profa. Dra. em Imunologia e co- orientadora - IPTSP - UFG.
4. Prof. Dr. em Microbiologia e orientador – IPTSP – UFG.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium massiliense*, susceptibilidade, glutaraldeído e infecções nosocomiais.

INTRODUÇÃO

O estudo das micobactérias confunde-se com o próprio surgimento da microbiologia clínica que em 1868 teve a contribuição inicial de Gerhard Hansen, que realizou a descoberta do *Mycobacterium leprae* e de Robert Koch, que em 1882, descobriu o *Mycobacterium tuberculosis*, microrganismos causadores da hanseníase e tuberculose, respectivamente. Ao longo do século XX, deu-se continuidade à busca de conhecimento sobre as micobactérias, sendo descritas diversas outras espécies relacionadas a doenças, tais como as micobactérias de crescimento rápido ou não tuberculosas, descritas inicialmente por Costa Cruz em 1938. (MACEDO *et al*, 2009).

Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) são microrganismos que estão amplamente distribuídos no ambiente, particularmente no solo e na água, incluindo água potável, tubulações de sistemas de distribuição de água, piscina, esgoto e superfícies, mesmo em condições supostamente adversas, como baixo pH, pouca carga orgânica e temperaturas variadas. (MACEDO *et al*, 2009).

As MCR formam colônias visíveis a olho nu em até sete dias quando incubadas em meio sólido, diferentemente daquelas de crescimento lento como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*, as quais o fazem após 7 a 30 dias de incubação. (PITOMBO *et al*, 2009). São normalmente consideradas saprófitas e além disso, são descritas como raros patógenos oportunistas envolvidos em infecções nosocomiais e pseudo-surtos e devem portanto ser consideradas como um importante grupo de bactérias mostrando crescimento patológico importante (LORENA *et al*, 2010).

A resistência a antimicrobianos é um tema de destaque quando se estudam as micobactérias. A proteção que as bactérias obtêm por se alojarem dentro das células do hospedeiro, exige drogas que alcancem tais sítios o que dificulta a ação sobre as mesmas.

O primeiro relato de surto de infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido aconteceu em 1975, em um hospital da Carolina do Norte (Estados Unidos), com *M. abscessus* identificado no esterno de 19 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, cinco dos quais morreram. (WALLACE *et al*, 1998). Posteriormente, vários relatos de casos de infecções em sítio cirúrgico por micobactérias de crescimento rápido ocorreram esporadicamente, associados a vários tipos de operação.

No Brasil, apesar dos relatos esporádicos de surtos de infecções nosocomiais por MCR envolvendo procedimentos médicos, a partir de 2004 o quadro assumiu grandes proporções colocando as entidades responsáveis em sinal de alerta. Diversas foram as hipóteses para a

ocorrência dos surtos, tais como o tipo de material utilizado nas operações, falhas nos métodos de desinfecção ou esterilização, o processo de limpeza mecânica e desmonte dos artigos, o tempo de exposição aos saneantes, as condições nas quais os instrumentais foram imersos na solução e o possível aparecimento de uma cepa tolerante/não suscetível aos agentes de desinfecção/esterilização. (LORENA *et al*, 2009).

Sabendo-se que a desinfecção dos artigos cirúrgicos utilizados nos procedimentos laparoscópicos e artroscópicos realizados em Goiânia era realizada por meio da utilização de solução de glutaraldeído a 2% almejou-se por meio desse estudo estudar a susceptibilidade a esse agente das cepas isoladas envolvidas no surto, de 2005 a 2007, da cidade de Goiânia, Goiás. (CARDOSO *et al*, 2008).

OBJETIVOS

Estudar a susceptibilidade ao glutaraldeído de *Mycobacterium massiliense* isolados no surto, de 2005 à 2007, na cidade de Goiânia – Goiás e estabelecer uma padronização para testes de drogas inibidoras com potencial anti-micobacteriano.

METODOLOGIA

Isolamento das micobactérias

Cepas de *Mycobacterium massiliense* foram recuperadas a partir de biópsias de 13 pacientes que apresentavam sinais e sintomas da infecção localizada após cirurgia minimamente invasiva (artroscopia ou videolaparoscopia), provenientes de sete hospitais privados da cidade de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil. A coleta ocorreu entre agosto de 2005 e julho de 2007 e contou com a adesão dos pacientes à pesquisa por meio do conhecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os Isolados foram armazenados em freezer -80°C. As amostras foram reativadas e cultivadas em placas contendo meio ágar Mueller Hinton (MH) a 37°C, das quais foram obtidas colônias isoladas e, dessa forma, preparadas amostras em tubos de tampa rosca em duplicata contendo 3 ml de meio Mueller Hinton caldo. Os tubos foram incubados com agitação a 37°C por três dias. A suspensão bacteriana foi então ajustada para turbidez equivalente ao tubo um da escala McFarland.

Testes de tolerância ao Glutaraldeído (GA)

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomenda a microdiluição em caldo como método padrão para a realização do teste de suscetibilidade que pode ser realizado com qualquer micobactéria de crescimento rápido com significado clínico (isolados de sangue, fluidos corporais estéreis, tecidos, e amostras obtidas de lesões de pele e tecidos moles). (WOODS, 2000). Com base no exposto, para avaliação da suscetibilidade das amostras de *M. massiliense* à soluções de glutaraldeído comercial, foram colocados 10µL de suspensão bacteriana e 190 µL de solução de GA de diferentes concentrações em poços distintos de uma placa de 96 poços. O teste qualitativo foi realizado com as seguintes diluições de glutaraldeído: 1,0%, e 2,0%. Como controles, foram colocados em poços vazios e distintos: 100 µL de claritromicina (8µg/mL) + 100 µL de cultura (controle positivo de inibição), 190 meio + 10 µL de cultura (controle de crescimento micobacteriano positivo) e 200 µL de meio (controle de esterilidade do ensaio). Após 30 min de exposição, uma alíquota de 100 µL de cada mistura de bactérias e glutaraldeído foi transferida para um novo poço contendo o mesmo volume de sulfito de sódio a 1% para inativação do glutaraldeído e incubado por 3 min. A ação do desinfetante foi analisada por plaqueamento de 100 µL de cada ensaio em meio ágar Mueller Hinton, que após 3 a 4 dias de incubação foi analisado para crescimento de colônias. Considerou-se inibição de crescimento quando nenhuma colônia cresceu no meio. A cepa padrão de *M. abscessus* (ATCC 19977) que é susceptível a ação de glutaraldeído foi incluída no estudo.

RESULTADOS

Os testes de susceptibilidade por microdiluição em caldo com posterior cultura das cepas em meio ágar Mueller Hinton permitiram fazer a análise efetiva da susceptibilidade dos isolados de *M. massiliense* analisados, uma vez que a cepa padrão de *M. abscessus* incluída como indicadora de que a metodologia estaria sendo feita corretamente, se mostrou inibida com a ação das duas concentrações de glutaraldeído testadas (Tabela 1). O ensaio permitiu também demonstrar que o sulfito de sódio sozinho não tem efeito micobactericida sobre os isolados, que poderiam estar dando um resultado falso positivo de inibição (dados não mostrados). As 13 amostras de *M. massiliense* isoladas no período de 2005 à 2007 de pacientes durante o surto ocorrido em Goiânia que foram testadas frente ao glutaraldeído comercial se mostraram resistentes a exposição por 30 minutos tanto a 1% como a 2% de glutaraldeído (Tabela 1).

TABELA 1: Padrão de susceptibilidade de *M. abscessus* ATCC 19977, e isolados de *M. massiliense* frente às concentrações de 1% e 2% de glutaraldeído.

Amostras ¹	Glutaraldeído 1,0% ²	Glutaraldeído 2,0% ³
ATCC 19977	-	-
01. EAS	+	+
02. PGD	+	+
03. FMA	+	+
04. LPG	+	+
05. IDC	+	+
06. MAF	+	+
07. COM	+	+
08. SHRP	+	+
09. THT	+	+
10. AWF	+	+
11. RES	+	+
12. CPC	+	+
13. DCCV	+	+

1: Identificação numérica das amostras testadas e iniciais do paciente. 2: avaliação de crescimento (+) ou não (-) após exposição a glutaraldeído a 1%. 3: avaliação de crescimento (+) ou não (-) após exposição a glutaraldeído a 2%

DISCUSSÃO

Os estudos de surtos de MCR, em sua maioria, apresentam evidências de procedimentos inadequados de esterilização e/ou desinfecção, criando condições favoráveis à ocorrência desses eventos. (LORENA et al, 2010).

Desde 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária já divulgou a ocorrência de 15 surtos isolados de MCR associados a cuidados com a saúde em várias Unidades Federadas brasileiras, incluindo Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. Os números de casos variam entre as diversas localidades, com uma média de 50 casos em 2007. No entanto, mais de 2.000 casos foram confirmados em

todo o território nacional, sendo que houve 310 casos acumulados nos últimos quatro anos no Estado do Pará; 1.051 casos notificados no Estado do Rio de Janeiro, e 47 casos em Goiânia, Goiás. Os surtos relacionados aos procedimentos cirúrgicos envolvem principalmente aqueles em que os instrumentos médicos foram desinfetados com soluções de GA. (PITOMBO *et al*, 2009). A preocupação do surto ocorrido no período de 2004 a 2006 em alguns estados do Brasil, fez com que a ANVISA estabelecesse critérios rigorosos para o uso de glutaraldeído em estabelecimentos de saúde. (ANVISA, 2007).

Estes focos aparentemente descontrolados exibem detalhes comuns e específicos que podem explicar algumas questões epidemiológicas. Todos estes surtos descritos foram relacionados a cirurgias por videolaparoscopia e/ou outros procedimentos invasivos, precedida de desinfecção de alto nível através da utilização de GA 2% comercial de marcas diferentes.

Procedimentos inadequados para a desmontagem, limpeza ou remoção de material orgânico dos equipamentos de laparoscopia, o reuso de instrumentos médicos e a ausência de controle efetivo também foram sugeridos como possíveis fatores adicionais na promoção da epidemia em diferentes estados brasileiros. Além disso, muitos cirurgiões trabalhavam em diferentes hospitais e tiveram seus instrumentos de laparoscopia particular lavados e desinfetados, juntamente com outros equipamentos cirúrgicos. A substituição de GA 2% por ácido peracético (PA) ou esterelização física (autoclavagem por exemplo) foram os principais procedimentos para o controle da disseminação de infecções e bloqueio do surto em todas os hospitais. Embora a resistência ao GA 2% seja considerado um evento raro em micobactérias, linhagens com baixa susceptibilidade ao GA já têm sido descritas, a maioria delas relacionados com a *M. Chelonae*. (MANZOOR *et al*, 1999): Nesse estudo demonstramos que todas as culturas de *M. massiliense* isoladas em Goiânia se mostraram resistente ao glutaraldeído. Achados semelhantes foram encontrados por Lorena *et al* (2010). Estes achados concordantes reforçam a proximidade existente entre os isolados de Goiânia e de outros locais do Brasil. Nosso grupo (Cardoso *et al*, 2008), assim como Leão *et al* (2010) demonstraram a identidade genética existentes entre *M. massiliense* isolados de diferentes regiões do Brasil. Essa identidade genética está mostrando que os isolados apresentam semelhança fenotípicas como resistência ao glutaraldeído, por exemplo.

Svetlíkova *et al* (2009) propuseram que os defeitos de porinas em micobactérias possivelmente representam os principais mecanismos envolvidos na resistência aos desinfetantes baseados em aldeído. Nossos estudos de laboratório indicaram que as amostras

de *M. Massiliense* recuperadas durante a epidemia no estado do Goiás sobreviveram depois de exposição a soluções comerciais GA, fato que ilustra a resistência bacteriana e que associada a procedimentos de esterilização ineficientes pode ter contribuído para a possível disseminação de microrganismos biocida-tolerante ao redor dos centros cirúrgicos em 7 hospitais diferentes de Goiânia. (CARDOSO *et al*, 2008).

Estudo realizado por Lorena *et al* (2009) indicam que a resistência a altas concentrações GA é uma característica particular de *M. massiliense* pertencentes ao grupo clonal BRA 100. Estes clones específicos podem abrigar mecanismos de resistência não compartilhada por outras cepas de *M. massiliense* ou por outras espécies ao modo de ação de GA que é composto por ligações cruzadas com proteínas que compõem a parede celular das micobactérias e citoplasma causando a inibição da DNA, RNA e síntese de outras macromoléculas. Porém, a confirmação destas hipóteses precisam ser evidenciadas. A inclusão de *M. massiliense* em estudos moleculares sobre o modo de ação de desinfetantes e mecanismos de resistência é importante na medida em que possibilita melhorar o conhecimento sobre a sobrevivência destas micobactérias para estabelecer melhores medidas de controle.

CONCLUSÕES

O estudo do perfil de susceptibilidade da *M. massiliense* em função da ação antimicrobiana do glutaraldeído torna-se indispensável na medida em que fomenta e possibilita a melhor orientação sobre a esterilização correta de materiais e contribui para o melhor conhecimento do perfil das cepas para realização de testes futuros com a utilização de antimicrobianos alternativos.

Todos as amostras de *M. massiliense* isoladas no surto de Goiânia se mostraram resistentes ao glutaraldeído embasando de maneira científica a correta conduta da Anvisa de proibir o reprocessamento dos instrumentos de artroscopias com o uso deste agente de esterilização.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Informe técnico nº 04/07**. Brasília (DF): ANVISA. 2007. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/serviçossaude/control/alertas/informetecnico04.pdf>

- CARDOSO, A.M.; SOUSA, E.M.; VIANA-NIERO, C.; BORTOLI, F.B.; NEVES, Z.C.P.; LEÃO, S.C.; JUNQUEIRA-KIPNIS A.P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**. 2008, v. 10, 1552-15575.
- LEÃO, S.C.; VIANA-NIERO, C.; MATSUMOTO, C.K; LIMA, K.V.B.; LOPES, M.L.; PALACI, M.; HADAD, D.J.; VINHAS, S.; DUARTE, R.S.; LOURENÇO, M.C.S.; KIPNIS, A.; DAS NEVES, Z.C.; GABARDO, B.M.A.; RIBEIRO, M.O.; BAETHGEN, L.; DE ASSIS, D.B.; MADALOSSO, G.; CHIMARA, E.; DALCOMO, M.P. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Future Microbiology**. 2010, v. 5, p. 971-980.
- LORENA N.S.O.; DUARTE, R.S.; PITOMBO, M.B. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após Procedimentos videocirúrgicos --- a hipótese do glutaraldeído. **Rev. Col. Bras. Cir.** 2009, 36(3), 266-267.
- LORENA, N.S.O .; PITOMBO, M.B.; CÔRTEZ P.B.; MAYA M.C.A.; SILVA, M.G.; CARVALHO, A.C.S.; COELHO, F.S.; MIYAZAKI, N.H.T.; MARQUES, E.A.; CHEBABO, A.; FREITAS A.D.; LUPI, O.;DUARTE, R.S. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection . **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2010,v. 25 (5), 455-459.
- MACEDO, J.L.S.; MAIEROVITCH, C.; HENRIQUES, P. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. **Rev. Bras. Cir. Plást.** 2009, v. 24(4), 544-51.
- MANZOOR, S.E; LAMBERT, P.A; GRIFFITHS, P.A.; GILL, M.J.; FRAISE, A.P.; Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. **J Antimicrob Chemother**. 1999, v. 43, 759-65.
- PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2009, v. 31(11), 529-33.
- SVETLÍKOVÁ, Z.; SKOVIEROVÁ, H.; NIEDERWEIS, M.; GAILLARD, J.L.; MCDONNELL, G.; JACKSON, M. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. **Antimicrob Agents Chemother**. 2009, v. 53(9), 4015-8.
- WALLACE, R.J; BROWN, B.A; GRIFFITH D.E. Nosocomial outbreaks/pseudooutbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annu Rev Microbiol**. 1998, v. 52, 453-90.

WOODS, G.L. Susceptibility Testing for Mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**. 2000,
v. 31, 1209-1215.