

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas aeruginosa* POR MEIO DO MÉTODO DE INATIVAÇÃO DE CARBAPENÊMICOS MODIFICADOS (mCIM) E DO EDTA-CIM (eCIM)

EVALUATION OF THE RESISTANCE OF BACTERIA OF THE GENUS *Pseudomonas aeruginosa* USING THE MODIFIED CARBAPENEM INACTIVATION METHOD (mCIM) AND EDTA-CIM (eCIM)

Andressa Késsia da Mota Leite¹, João Augusto Rocha de Carvalho Teixeira², Luiz Filipe da Silva Santos³, Tatiane Silva de Carvalho⁴, Juliana Loca Furtado Fontes⁵

¹Acadêmica de Biomedicina, Centro Universitário Aparício Carvalho - FIMCA, andressakessia41@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/9514813364565686>;

²Acadêmico de Biomedicina pelo Centro Universitário Aparício Carvalho - FIMCA, jarctfotos@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/0139891892125329>;

³Acadêmico de Biomedicina pelo Centro Universitário Aparício Carvalho - FIMCA, luifilipi001@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/3149715737993745>;

⁴Biomédica pela Faculdade São Lucas, Mestre em Biologia Experimental, docente do Centro Universitário Aparício Carvalho - FIMCA, julianafontesro@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/7110758242777925>; ⁵Bióloga pela Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Microbiologista do Núcleo de Patologia Clínica do Hospital de Base do Porto Velho Dr. Ary Pinheiro, docente do Centro Universitário Aparício Carvalho - FIMCA, prof.carvalho.tatiane@fimca.com.br, <http://lattes.cnpq.br/7950818397999211>.

DOI: <https://doi.org/10.37157/fimca.v12i2.1133>

RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria de importância médica oportunista, presente em ambientes hospitalares, podendo ser considerada uma infecção grave quando adquirida por pacientes imunocomprometidos. Possui uma grande variabilidade de mecanismos de resistência antimicrobiana, sendo a mais perigosa a produção de carbapenemases, o que torna o tratamento clínico um desafio. Os carbapenêmicos são considerados antibióticos de última escolha, geralmente indicados no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Contudo, seu uso vem sendo progressivamente limitado devido ao aumento significativo dos mecanismos de resistência, especialmente pela presença de cepas produtoras de carbapenemases, o que reduz a eficácia dessa classe de antimicrobianos na prática terapêutica. Sobre esse viés, os métodos fenotípicos mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method) e eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method) vêm sendo recomendados pelo CLSI, demonstrando-se uma ferramenta de fácil uso e acessível para triar as *P. aeruginosa* produtoras de carbapenêmicos. Este artigo tem como objetivo principal avaliar a resistência de cepas de origem clínica de *P. aeruginosa* por meio dos métodos fenotípicos mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method) e eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method). Foram utilizadas cepas de *P. aeruginosa* de origem clínica, previamente isoladas em ágar Mueller-Hinton, e uma cepa de controle, *Escherichia coli* ATCC 25922. Os ensaios envolvendo mCIM e o eCIM foram realizados seguindo os padrões padronizados pelo CLSI e EUCAST, usando discos de meropenem (10 µg) utilizando ou não o EDTA. Após a observação e interpretação dos halos, foi possível diferenciar a presença ou ausência de carbapenemases do tipo serino-β-lactamase e metalo-β-lactamase (MBL). Com esse estudo, obtivemos altas taxas de sensibilidade e especificidade (>98% e >95%, respectivamente), o que permite a diferenciação entre MBLs e outros tipos de carbapenemases. Ressaltando ainda o baixo custo e simplicidade do procedimento, o método em questão é apto para a utilização em laboratórios com materiais limitados, porém, este método identifica apenas genes, sendo preciso utilizar técnicas moleculares para complementação. Os métodos fenotípicos mCIM e eCIM são ferramentas acessíveis, padronizadas e utilizáveis para a detecção de carbapenemases em *P. aeruginosa*. A aplicação desta técnica contribui para um diagnóstico rápido e para a escolha da melhor terapia antimicrobiana, ajudando no enfrentamento das infecções causadas pelo patógeno multirresistente.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Resistência antimicrobiana, Carbapenemases, mCIM, CIM.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium of medical importance, which is present in hospital environments and can cause serious infections in immunocompromised patients. It has a wide range of antimicrobial resistance mechanisms, the most dangerous of which is the production of carbapenemases, making treatment a clinical challenge. Carbapenems are considered antibiotics of last resort, generally indicated for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria. However, their use has been progressively limited by the emergence of resistance mechanisms, particularly carbapenemase-producing strains, which reduce the efficacy of this class of antimicrobials in clinical practice. With this in mind, the phenotypic methods mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method) and eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method) have been recommended by CLSI. They are easy and inexpensive tools for screening for carbapenemase-producing *P. aeruginosa*. The main objective of this article is to evaluate the resistance of clinical strains of *P. aeruginosa* using the phenotypic methods mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method) and eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method). Clinical strains of *P. aeruginosa* previously isolated on Mueller-Hinton agar were used, with a control strain of *Escherichia coli* ATCC 25922. The tests involving mCIM and eCIM were carried out according to CLSI and EUCAST standards, using meropenem discs (10 µg) with or without EDTA. After observing and interpreting the halos, it was possible to differentiate whether or not serine-β-lactamase and metallo-β-lactamase (MBL) carbapenemases were present. In this study, we achieved high sensitivity (>98%) and specificity (>95%), enabling differentiation of MBLs from other carbapenemase types. In addition to its low cost and simplicity, the method is suitable for use in laboratories with limited resources. However, this method does not identify genes, and molecular techniques must be used to complement it. The mCIM and eCIM phenotypic methods are accessible, standardized, and usable tools for detecting carbapenemases in *P. aeruginosa*. The application of this technique facilitates rapid diagnosis and selection of optimal antimicrobial therapy, helping to address infections caused by multidrug-resistant pathogens.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial resistance, Carbapenemases, mCIM, CIM.

INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas* é um gênero de bactérias; nesse gênero há uma espécie conhecida como *Pseudomonas aeruginosa*. Trata-se de uma espécie não formadora de esporos, aeróbica e bacilar Gram-negativa. Essa bactéria causa vários tipos de infecção em hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos, residindo em ambientes de saúde e classificada como agente

causador de infecções hospitalares (Moradali; Ghods; Rehm, 2017; Reynolds; Kollef, 2021).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista que causa diversas formas de infecção. Devido a essa gama de infecções, tornou-se uma importante causa de morbidade, com elevada frequência de isolamento em ambientes hospitalares e facilidade para adquirir resistência a antibióticos (Hendrie, 1989; Shariati et al., 2018).

Esta bactéria é facilmente adaptável a diferentes ambientes e apresenta desenvoltura rápida no quesito resistência a antibióticos, pois possui diversos fatores de virulência. Esse patógeno afeta imunocomprometidos com maior intensidade, já que, além da facilidade de adquirir resistência, possui mecanismos que favorecem a evasão das defesas imunes, tanto inatas quanto adaptativas, por meio de adesão, colonização e formação de biofilme (Turkina; Vikström, 2019). A bactéria torna-se ainda mais patogênica quando associada a algumas doenças, como fibrose cística, câncer, queimaduras graves e infecções em neonatos (Jacqueline; Caillon, 2014; Turkina; Vikström, 2019).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* podem ser complicadas, pois terapias empregadas de forma inadequada, principalmente em cepas multirresistentes (MDR), estão associadas a pior prognóstico (Bail et al., 2022; Ito et al., 2021; Tuon et al., 2020). A resistência a diversos medicamentos representa um importante dificultador para a saúde humana e animal. Ademais, *P. aeruginosa* tornou-se um dos patógenos de maior ocorrência em hospitais, sendo responsável por 50% das infecções adquiridas nesses ambientes (Sarabhai; Sharma; Capalash, 2013).

Sendo assim, novos medicamentos com foco nessa bactéria foram desenvolvidos; entretanto, sua taxa de morbimortalidade ainda é elevada, variando entre 20% e 60% dos infectados (Bail et al., 2022; Ito et al., 2021; Kang et al., 2003; Tuon; Gortz; Rocha, 2012). Essa infecção pode apresentar diversos fatores de risco, dentre eles: doenças pulmonares, neoplasias hematológicas, transplantes, queimaduras extensas, uso inadequado de antibióticos, presença de implantes, tempo prolongado de hospitalização e de ventilação mecânica (Reynolds; Kollef, 2021). O biofilme produzido pela bactéria desempenha papel importante na determinação de sua virulência (Ghafoor; Hay; Rehm, 2011).

Além disso, apresenta facilidade em se alojar em materiais médicos e equipamentos alimentícios, o que contribui para aumentar a resistência a antibióticos, a tratamentos por irradiação, a condições ambientais adversas, aos desinfetantes e ao próprio sistema imunológico, tornando-se, na maioria das vezes, uma infecção crônica nos locais onde se aloja.

PROBLEMAS RELACIONADOS A RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Quando há um caso suspeito de *P. aeruginosa*, há duas abordagens: monoterapia e terapia combinada. Esses tratamentos têm as maiores taxas de sucesso, reduzindo a morbimortalidade entre os que os fazem uso (El Solh; Alhajhusain, 2009; Park et al., 2012).

Porém, ao longo dos anos, essa bactéria se tornou um desafio enorme, pois tem alta capacidade de mutar e resistir a antibióticos (Lister; Wolter; Hanson, 2009), em especial à classe dos carbapenêmicos, que representam a última alternativa de tratamento (Tacconelli, 2017).

Outro entrave significativo é o uso indiscriminado de antibióticos, que acelera o desenvolvimento de resistência bacteriana a esses medicamentos (Hirsch; Tam, 2010). A *P. aeruginosa* já apresenta resistência a diversas classes de antibióticos, entre elas aminoglicosídeos, quinolonas e beta-lactâmicos (Hancock; Speert, 2000). Os principais mecanismos de resistência são: intrínsecos, adquiridos e adaptativos (Pang et al., 2019).

RESISTÊNCIA INTRÍNSECA

A resistência intrínseca a antibióticos é uma classificação que se refere à sua capacidade primária de atenuar ao máximo a eficácia de um antibiótico, por meio de seu próprio maquinário estrutural e de funcionalidades inerentes (Blair et al., 2014). Já foi descrito na literatura que as *Pseudomonas* apresentam elevados níveis de resistência intrínseca, que se devem, em grande parte, à permeabilidade restrita da membrana externa. Os sistemas de efluxos são também muito bem utilizados pelas *P. aeruginosa*, assim como a produção de enzimas degradantes de antibióticos (Breidenstein; De La Fuente-Núñez; Hancock, 2011a).

RESISTÊNCIA ADQUIRIDA

As bactérias têm formas de adquirir resistência. Entre as alternativas de aquisição, encontram-se as principais: alterações mutacionais e aquisição de genes resistentes de outras bactérias (Munita; Arias, 2016). Além disso, o elevado nível de resistência intrínseca a antibióticos de *P. aeruginosa* e a inserção de um novo gene de resistência no seu DNA acabam por favorecer o aumento de cepas multirresistentes, dificultando o tratamento e a erradicação de infecções (Henrichfreise et al., 2007a).

A variabilidade multinacional pode diminuir a absorção dos antibióticos, modificar os alvos de ação, aumentar a expressão da bomba de efluxo e produzir enzimas que inativam os antibióticos, permitindo a presença simultânea de bactérias e moléculas antimicrobianas (Munita; Arias, 2016). Já a incorporação de genes de resistência é outra forma utilizada pelas bactérias. Esses genes podem ser conduzidos de uma bactéria para outra em plasmídeos, transposons, integrons e prófagos, sendo esta passagem de gene entre espécies ou até entre gêneros diferentes (Breidenstein; De La Fuente-Núñez; Hancock, 2011a).

A transferência de gene de uma bactéria para a outra pode ocorrer de três maneiras diferentes por transformação, transdução e conjugação (Arber, 2014). As bactérias têm formas de adquirir resistência. Entre as alternativas de aquisição, encontram-se as principais: alterações mutacionais e aquisição de genes resistentes de outras bactérias (Munita and Arias 2016a). Além disso, o elevado nível de resistência intrínseca a antibióticos de *P. aeruginosa* e a inserção de um novo gene de resistência no seu DNA acabam por facilitar o aumento de cepas multirresistentes, dificultando o tratamento e a erradicação de infecções (Henrichfreise et al., 2007b).

A variabilidade multinacional pode diminuir a absorção dos antibióticos, modificar os alvos de ação dos antibióticos, aumentar a expressão da bomba de efluxo e produzir enzimas que inativam os antibióticos, permitindo a presença simultânea de bactérias e moléculas antimicrobianas (Munita and Arias 2016b). Já a incorporação de genes de resistência é outra forma utilizada pelas bactérias. Esses genes podem ser transferidos de uma bactéria para outra por meio de plasmídeos, transposons, integrons e prófagos, sendo essa passagem de genes entre espécies ou até entre gêneros diferentes (Breidenstein; De La Fuente-Núñez; Hancock, 2011b).

A transferência de gene de uma bactéria para a outra pode ocorrer de três maneiras diferentes por transformação, transdução e conjugação (Arber 2014).

RESISTÊNCIA ADAPTATIVA

A resistência adaptativa é responsável por elevar a capacidade de sobrevivência bacteriana, aumentando a chance de resistir com maior facilidade aos ataques antibióticos, sendo o mecanismo adaptativo da *Pseudomonas* a formação de biofilme (Sandoval-Motta; Aldana, 2016; Taylor; Yeung; Hancock, 2014). Biofilme é a terminologia associada a um amontoado de microrganismos que se juntam uns aos outros em superfícies biológicas e não

biológicas, integrando-se a uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPSs) (Das; Sehar; Manefield, 2013; Donlan, 2002).

PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES COMO PRINCIPAL MECANISMO DE RESISTÊNCIA

Nos últimos anos, as bactérias multirresistentes tornaram-se um grande desafio. Dentre os mecanismos de resistência, destaca-se a produção de carbapenemases como fator de inativação de carbapenêmicos, que são classificados como a última linha de tratamento para doenças causadas por essas bactérias. As bactérias produzem estas enzimas com o intuito de quebrar os carbapenêmicos, o que dificulta a eficácia terapêutica desses fármacos e reduz a disponibilidade de tratamento (Codjoe; Donkor, 2017). Existem diversas classificações moleculares, sendo as principais as serino- β -lactamases, que fazem parte do grupo das serino (KPC, OXA-48), e as metalo- β -lactamases (NDM, VIM, IMP), traduzidas por genes normalmente encontrados em plasmídeos e transposons. Essa facilidade de translocação de genes favorece a transferência de genes entre bactérias (Nordmann; Naas; Poirel, 2011). Ademais, outros mecanismos, como a alteração da permeabilidade da membrana externa e a superexpressão de bombas de efluxo, aumentam a facilidade de resistência adquirida. Alguns estudos apontam que a presença de carbapenemases isoladas já é suficiente para conferir elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos (Logan; Weinstein, 2017).

DESAFIOS NA DETECÇÃO

LABORATORIAL DAS CARBAPENEMASES

A detecção de carbapenemase é um teste muito importante no enfrentamento à resistência antimicrobiana, especialmente em hospitais, onde há rápida e ampla disseminação dessas enzimas. Ademais, existem desafios técnicos, operacionais e econômicos que acabam por representar um problema (Nordmann; Naas; Poirel, 2011). Os convencionais fenótipos utilizados para triar as produtoras de carbapenemases, como o Hodge modificado (THM), apresentam limitações, como a baixa sensibilidade às metalo- β -lactamases (MBLs), podendo resultar em falso-positivo para outros mecanismos de resistência, como a combinação de ESBL e a perda da porina (Tamma; Simner, 2018). Outros testes fenotípicos, como o Carba NP, têm maior sensibilidade, porém exigem maior preparo para sua realização e podem não detectar outras variantes enzimáticas (Dortet; Poirel; Nordmann, 2012). A inclusão de testes moleculares, como PCR convencional, qPCR, PCR multiplex e, recentemente, técnicas de sequenciamento genético (NGS), ajuda a diagnosticar melhor genes de resistência (Queenan; Bush, 2007). Entretanto, essas metodologias são difíceis de usar e muito caras, exigem infraestrutura laboratorial e podem não identificar novas variantes nem genes variados (Codjoe; Donkor, 2017). Além do mais, não existe um teste padrão-ouro. Por isso, é indicado um diagnóstico combinado, que associa uma triagem fenotípica a uma triagem molecular, o que não pode ser realizado em países de baixa renda.

MÉTODOS FENOTÍPICOS mCIM E eCIM COMO FERRAMENTAS DE TRIAGEM

Com a elevação da resistência aos carbapenêmicos, é de suma importância, neste contexto, a triagem laboratorial de carbapenemases utilizando o mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method) e o eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method), propostos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Estes surgiram como metodologias

fenotípicas para a detecção de carbapenemase (“CLSI M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing”, 2025). O mCIM baseia-se na capacidade de um inóculo bacteriano de inativar o meropenem durante incubação em meio suplementado. O disco de papel contendo antibiótico é colocado sobre uma placa contendo *Escherichia coli* ATCC 25922; caso não haja um halo de inibição, indica-se a presença de carbapenemase (Pierce et al., 2017). Já o eCIM, é realizado repetindo o processo acima, porém com a adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), permitindo a identificação das metalo- β -lactamases (MBLs), visto que o EDTA inativa essas enzimas e restaura o halo de inibição quando colocado lado a lado com o mCIM separado (Tamma; Simner, 2018).

Estudos revelam que o mCIM tem sensibilidade superior a 98% e especificidade superior a 95% na detecção de carbapenemases do tipo KPC, OXA-48 e MBLs. O eCIM tem sido utilizado em áreas de grande circulação de genes, como bla_{NDM}, bla_{VIM} e bla_{IMP}, sendo possível, assim, diferenciar as MBLs das serinas carbapenemases (Tamma; Simner, 2018). A literatura demonstra que essa metodologia, quando padronizada e aplicada corretamente, apresenta-se como um ótimo custo-benefício e é facilmente implantada em ambientes laboratoriais, tornando-se uma opção viável para a genotipagem em locais com infraestrutura limitada (Codjoe; Donkor, 2017; Dortet; Poirel; Nordmann, 2012). Além do diminuto custo e simplicidade operacional dos testes mCIM e eCIM, vale salientar que esses métodos não identificam o gene específico da carbapenemase, sendo necessário o uso complementar de técnicas genotípicas, como PCR ou sequenciamento (Makinson et al., 2021).

Portanto, aplicamos o método mCIM de eCIM em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em ambiente hospitalar, detectando a presença de enzimas carbapenemases e avaliando a sensibilidade e especificidade dos testes mCIM e eCIM, utilizando a metodologia proposta.

MATERIAS E MÉTODOS

Amostras Bacterianas

Para os testes de mCIM/eCIM foram utilizadas cepas de *P. aeruginosa* anteriormente isoladas de amostras clínicas e repicadas em ágar Mueller-Hinton. Consequentemente, as placas foram mantidas na estufa, em condições adequadas, até o momento da análise. Como principal indicador, utilizou-se *Escherichia coli* ATCC 25922, recomendada para os testes de inibição com discos, conforme o CLSI.

Reagentes e Materiais

Caldo Tripton de soja (TSB); Ágar Mueller-Hinton (MH); Discos de meropenem (10 μ g); EDTA (ácido etilenodiamino

tetra-acético), solução preparada a 5 mM; Alça estéril de 10 μ L; Pipetas e ponteiros estéreis; Estufa bacteriológica (35 \pm 2 $^{\circ}$ C); Pinça estéril; Régua para medição dos halos; Tubos de ensaio estéreis;

Método de Inativação de Carbapenêmicos Modificado (Mcim)

O ensaio de mCIM foi realizado conforme a metodologia descrita pelo CLSI, adaptada para *P. aeruginosa* conforme as sugestões do EUCAST. Para cada cepa teste, uma alça calibrada de 10 μ L foi utilizada para coletar colônias isoladas recentes (18–24h), inoculando-as em tubo contendo 2 mL de TSB no qual foi adicionado um disco de meropenem (10 μ g). Os tubos foram incubados a 35 $^{\circ}$ C por 4 horas. Paralelamente, preparou-se uma

suspensão de *E. coli* ATCC 25922 ajustada à turbidez 0,5 na escala de McFarland, utilizada para semeadura em “lawn” sobre placas de ágar MH. Após a incubação, o disco de meropenem foi retirado assepticamente com pinça estéril e depositado sobre a placa semeada com *E. coli* ATCC 25922. As placas foram incubadas a 35 °C por 16–18 horas. Interpretação dos resultados (mCIM):

Positivo: halo de inibição de 6–15 mm, ou 16–18 mm com presença de colônias dentro do halo (indicativo de produção de carbapenemase);

Negativo: halo de inibição ≥ 19 mm (ausência de inativação do meropenem).

A aplicação do mCIM é especialmente útil em locais sem laboratórios bem equipados, pois a metodologia permite uma detecção rápida e confiável de carbapenemases, auxiliando nas medidas de controle de infecção hospitalar (Nordmann; Naas; Poirel, 2011)

Método de Inativação de Carbapenêmicos Modificados com Edta (eCIM)

O teste de eCIM foi realizado em paralelo ao mCIM, com a diferença de que o tubo de ensaio continha 2 mL de TSB + EDTA (5 mM) e o disco de meropenem (10 µg), no qual foi inoculada a mesma quantidade de *P. aeruginosa* (alça calibrada de 10 µL). Após incubação a 35 °C por 4 horas, o disco foi transferido para placa de ágar MH previamente semeada com *E. coli* ATCC 25922 e incubada a 35 °C por 16–18 horas. Interpretação dos resultados (eCIM):

Aumento ≥ 5 mm no eCIM em relação ao mCIM: presença de metalo- β -lactamase (MBL) — carbapenemase de classe B.

Aumento ≤ 4 mm: ausência de MBL, sugerindo carbapenemase de classe A ou D.

O uso de EDTA no eCIM é fundamentado em sua capacidade de quelar íons metálicos divalentes, como o zinco (Zn^{2+}), indispensável para a atividade catalítica das metalo- β -lactamase. Dessa forma, a inibição da enzima ocorre pela remoção desse cofator metálico, restabelecendo o halo de inibição (Tamma & Simner, 2018). Estudos atuais demonstram que a junção do mCIM/eCIM apresenta acurácia elevada na diferenciação entre carbapenemases de serina (classe A e D) e metalo- β -lactamase (classe B), ajudando na escolha da terapia antimicrobiana mais acertada (Pierce et al., 2017).

JUSTIFICATIVA METODOLÓGICA

A escolha do meropenem como antibiótico de referência nos testes de inativação modificados (mCIM e eCIM) fundamenta-se em critérios técnicos e metodológicos padronizados internacionalmente. O meropenem apresenta maior estabilidade

no caldo tripton de soja (TSB) durante a incubação de quatro horas, diferentemente de outros carbapenêmicos, como o imipenem, que sofrem degradação mais rápida. Além disso, apresenta excelente difusão no ágar MH, o que permite a formação de halos de inibição mais nítidos e facilmente mensuráveis, reduzindo ambiguidades. Tais características garantem a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados, reduzindo a ocorrência de falsos positivos e negativos. Por esses motivos, tanto o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) quanto o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) padronizam o uso de discos de meropenem (10 µg) para a execução dos testes de mCIM e eCIM, possibilitando a comparabilidade entre laboratórios e estudos. No

caso do eCIM, a adição do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tem papel crucial na diferenciação dos mecanismos de resistência. O EDTA atua como quelante de íons divalentes, em especial o zinco (Zn^{2+}), essencial para a atividade catalítica das metalo- β -lactamases (MBLs). Dessa forma, ao se ligar ao zinco, o EDTA inibe a atividade enzimática das MBLs, o que impede a hidrólise do meropenem. Como consequência, observa-se um aumento ≥ 5 mm no halo de inibição em comparação ao mCIM, confirmando a presença de carbapenemases de classe B.

Importante destacar que carbapenemases de outras classes (A e D), cuja atividade não depende de íons metálicos, não são interferidas pelo EDTA, o que confere ao método especificidade para MBLs. Portanto, a utilização do meropenem e do EDTA nos testes de mCIM e eCIM não apenas segue recomendações internacionais, mas também representa a forma mais precisa, padronizada e acessível de avaliar a produção e o tipo de carbapenemase em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Estudos afirmam que o uso de meropenem garante a padronização da metodologia e demonstra desempenho superior em comparação com outros carbapenêmicos (Pierce et al., 2017). A implementação do eCIM ao método aumenta a capacidade diagnóstica, possibilitando a distinção facilitada de carbapenemases de serina e metalo- β -lactamases (Sfeir et al., 2019). Contudo, reforça-se que a genotipagem, por meio de PCR ou sequenciamento, ainda é indispensável para a caracterização definitiva dos genes envolvidos (Nordmann; Naas; Poirel, 2011).

CONTROLES DE QUALIDADE

Em cada ensaio, foram incluídos controles positivos e negativos para carbapenemases, conforme as recomendações do CLSI e do EUCAST. Todos os testes foram realizados em duplicata e os materiais foram descartados conforme as normas de biossegurança vigentes (CLSI M100: Performance Standards for Antimicrobials, 35th edition, 2025; Ecde n.d.).

Além do mais, a implementação de controles de qualidade continua sendo fundamental para assegurar a confiabilidade dos resultados e reduzir interpretações precipitadas. A realização dos testes em duplicata, alinhada às boas práticas laboratoriais, garante maior reprodutibilidade e precisão nas análises (“CLSI M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing”, 2025). Ressalta-se que o uso de controles internos e externos, recomendado por órgãos internacionais de vigilância, contribui para a padronização entre laboratórios, reduzindo, assim, o risco de resultados falsos-positivos ou falsos-negativos.

RESULTADOS

Foi analisada uma cepa clínica, repicada a partir de amostra de urina de paciente da clínica cardiovascular, com infecção por *P. aeruginosa*, previamente isolada em ágar. A interpretação dos resultados foi realizada com base na observação das zonas de inibição nos discos de meropenem utilizados nos ensaios mCIM (teste de inativação de carbapenêmicos modificado) e eCIM (teste de inativação de carbapenêmicos com EDTA). Observa-se a presença de amplas zonas de inibição ao redor dos discos de meropenem, indicando que o antibiótico manteve sua atividade frente à cepa. Esse resultado confirmando o perfil esperado de controle negativo, sendo essencial para validar a confiabilidade do ensaio e demonstrar a robustez do método.

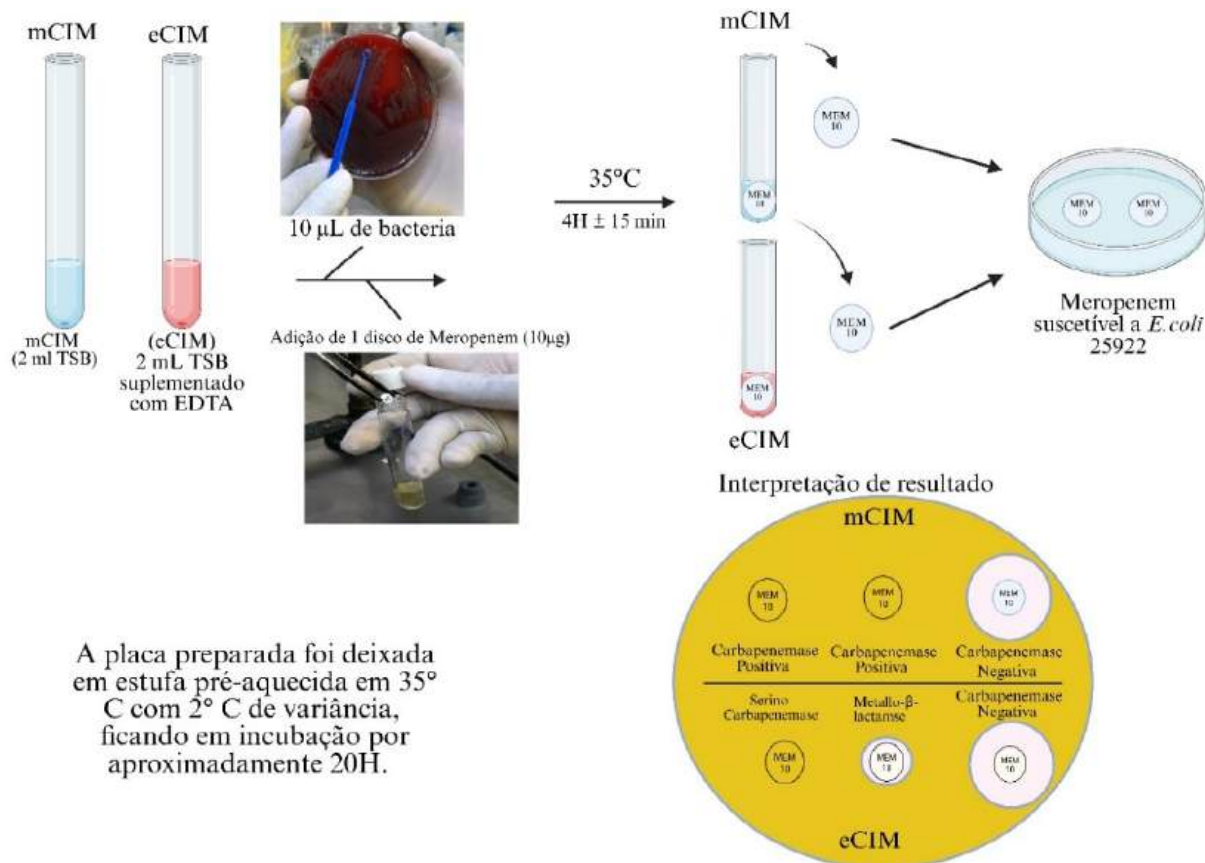


Figura 1. Representação esquemática dos testes mCIM e eCIM. A cepa bacteriana em estudo foi incubada com 1 disco de meropenem cada tubo, sendo que um permaneceu apenas com TSB (mCIM) e o outro tubo foi suplementado com EDTA (eCIM). Em seguida, os tubos foram levados à estufa e deixado por 4 horas \pm 15 minutos, em temperatura média de 35°C, com uma variância aproximada de 2°C. Após esse período, os discos de meropenem foram retirados dos tubos e colocados em placa Mueller-Hinton, previamente semeada com *E.coli* ATCC 25922, suscetíveis a carbapenemases. As placas retornaram à estufa e foram mantidas a 35°C, com variância de 2°C. Após cerca de 18 horas, foram observadas para diagnóstico.

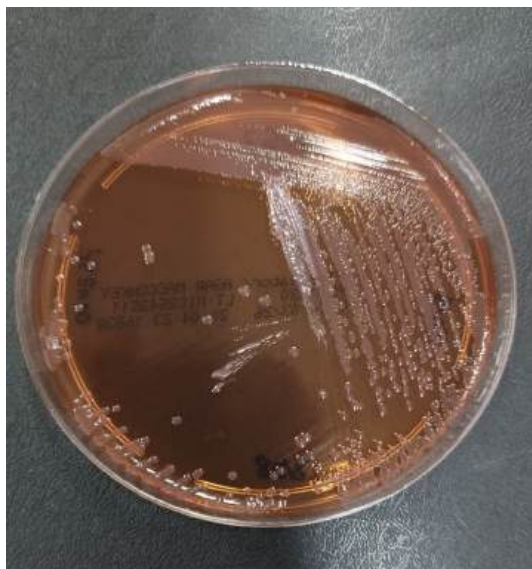


Figura 2. Crescimento de colônias de *P. aeruginosa* em meio ágar MacConkey, após incubação a 35 °C (\pm 2 °C) por 18 horas. Observa-se crescimento típico, com colônias de coloração rósea translúcida, compatíveis com as características morfológicas do micro-organismo.

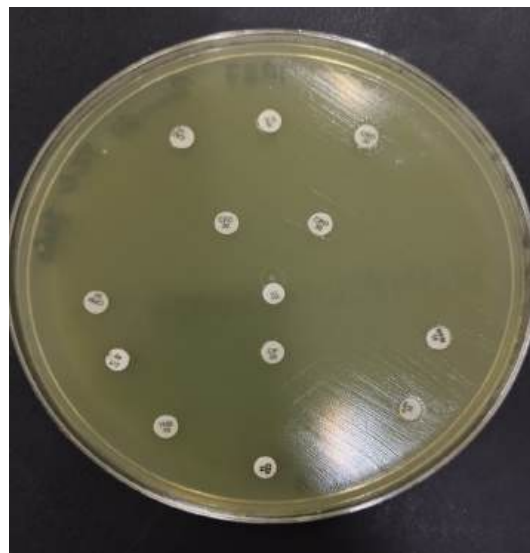


Figura 3. Teste de sensibilidade antimicrobiana em Mueller-Hinton, utilizando inóculo ajustado à turbidez de 0,5 na escala de McFarland e incubado a 35°C (\pm 2°C) por 16-18 horas. Observa-se ausência de halo de inibição (0 mm) em todos os discos testados (CRO, CFO, IPM, CAZ, MPM, AMI, CZA, TOB, C/T, CIP, CPM, P/T), indicando resistência total (R) do isolado frente aos antimicrobianos avaliados, conforme critério de interpretação estabelecido pelo CLSI (M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2025).

Tabela 1. Perfil de resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa* em ágar MH. Todos os antibióticos testados apresentam ausência de halo de inibição (0mm), sendo classificados como resistentes (R), conforme critérios estabelecidos pelo (“CLSI M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing”, 2025).

Código	Antibiótico	Carga do disco (µg)	Halo (mm)	Interpretação (CLSI 2025)
CRO	Ceftriaxona	30	0	R
CFO	Cefotaxima	30	0	R
IPM	Imipenem	10	0	R
CAZ	Ceftazidima	30	0	R
MPM	Meropenem	10	0	R
AMI	Amicacina	30	0	R
CZA	Ceftazidima/Avibactam	30/out	0	R
TOB	Tobramicina	10	0	R
C/T	Ceftolozano/Tazobactam	30/out	0	R
CIP	Ciprofloxacino	5	0	R
CPM	Cefepima	30	0	R
P/T	Piperacilina/Tazobactam	30	0	R

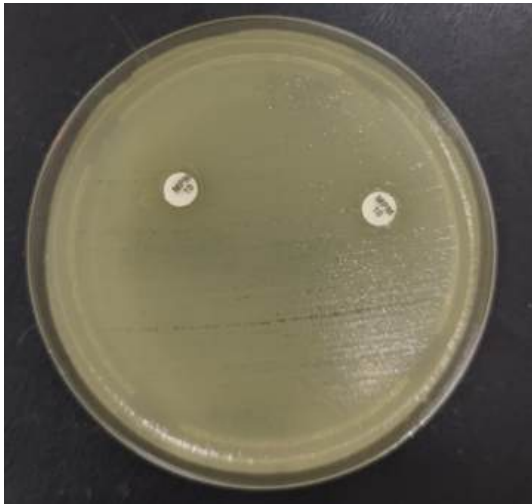


Figura 4. (Placa 684.1). Cepa de *P. aeruginosa* não produtora de carbapenemase.



Figura 5. (Placa 1057). Cepa de *P. aeruginosa* produtora de serino-carbapenemase. Observa-se ausência ou redução significativa da zona de inibição ao redor do disco de meropenem, caracterizando a inativação enzimática do antibiótico e confirmando o fenótipo de resistência. Esse resultado representa o teste definitivo para confirmar a presença da enzima carbapenemase, evidenciando a capacidade da cepa de neutralizar o efeito do antimicrobiano

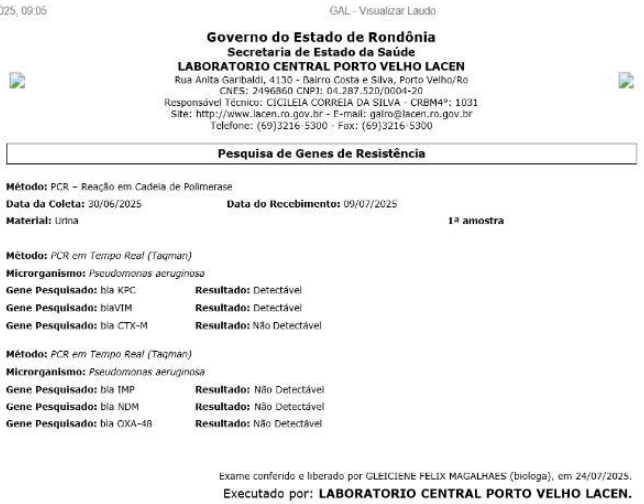


Figura 6. Ensaio molecular de detecção de genes de resistência por PCR. Foi identificada a presença dos genes KPC e VIM, confirmando a classificação da cepa como serino-carbapenemase e corroborando os resultados fenotípicos obtidos nos testes mCIM e eCIM.

Além da caracterização fenotípica pelos testes mCIM e eCIM, a cepa 1057 foi submetida a ensaio molecular de detecção de genes de resistência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esse teste identificou a presença dos genes KPC e VIM, confirmando que a cepa é de fato uma serino-carbapenemase, o que corrobora com os resultados obtidos nos testes fenotípicos. A comparação entre as duas cepas (controle negativo – 684.1 e cepa produtora de carbapenemase – 1057) demonstrou claramente a eficiência dos métodos mCIM e eCIM na detecção fenotípica de carbapenemases em *P. aeruginosa*.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A cepa de *P. aeruginosa* estudada demonstrou elevada resistência aos antibióticos testados, incluindo β -lactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, caracterizando um perfil multirresistente (Tabela 1). Os testes mCIM e eCIM mostraram-se úteis na detecção de carbapenemases, permitindo a diferenciação entre serino- β -lactamases e metalo- β -lactamases (MBLs). Essa abordagem reforça a relevância do método, que se destaca por ser simplificado, acessível e de baixo custo. A testagem molecular subsequente confirmou a presença simultânea dos genes KPC e VIM, evidenciando o desafio terapêutico, uma vez que a coprodução dessas enzimas confere resistência à maioria dos carbapenêmicos. Esses achados corroboram com estudos recentes de Li et al., 2019 identificou blaVIM como o de maior prevalência (47,64%) em isolados na América Latina, além do crescimento do gene blaNDM (Pillonetto et al., 2025) Em âmbito nacional, a Nota Técnica Conjunta nº 309/2025 alertou para o aumento de isolados produtores de carbapenemases, sendo as combinações mais frequentes KPC+VIM e KPC+NDM. Esses dados reforçam a necessidade da aplicação dos métodos mCIM e eCIM como ferramentas rápidas de triagem, associadas a testes moleculares confirmatórios, para apoiar decisões terapêuticas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo evidenciou que a cepa *P. aeruginosa* analisada apresentou um perfil multirresistente preocupante, com destaque para a produção de carbapenemases, confirmada pelos testes mCIM e eCIM, além da detecção dos genes KPC e VIM por PCR. De acordo com Codjoe & Donkor (2017), a combinação da abordagem fenotípica com a molecular aumenta a precisão na caracterização da resistência, fornecendo subsídios para a implementação de terapias mais eficazes.

A identificação acelerada da produção de carbapenemases é essencial para atenuar a morbimortalidade associada às infecções por *P. aeruginosa* multirresistente. Assim, a integração entre o diagnóstico laboratorial e as medidas preventivas é indispensável. Portanto, os resultados obtidos reforçam a importância da política de uso racional de antimicrobianos e da vigilância epidemiológica sistemática para combater a disseminação de cepas multirresistentes. Esse ponto é destacado por Nordmann et al. (2011), que enfatizam a necessidade de estratégias preventivas para reduzir o impacto clínico e econômico das infecções causadas por bactérias resistentes.

REFERÊNCIAS

- ARBER, W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life*, v. 4, n. 2, p. 217–224, 2014. <https://doi.org/10.3390/life4020217>.
- BAIL, L.; ITO, C.A.S.; AREND, L.N.V.S.; et al. Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing Enterobacterales. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 102, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115568>
- BLAIR, J.M. A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, v. 19, n. 8, p. 419–426, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- JAMES, S. LEWIS II, J.S.; MATHERS, A.J.; BOBENCHIK, A. M.; et al. CLSI M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Washington: Clinical and Laboratory Standards Institute. p. 428, 2025. <https://clsi.org/shop/standards/m100/>
- CODJOE, F. S.; DONKOR, E. S. Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, v. 6, n. 1, p. 1-28, 2017. <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
- DAS, T.; SEHAR, S.; MANEFIELD, Mi. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, v. 5, n. 6, p. 778–786, 2013. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12085>
- DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 12, p. 6437–6440, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.01395-12>
- EL SOLH, A. A.; ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, n. 2, p. 229–238, 2009. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp201>
- EUCAST. Disponível em: <<https://www.eucast.org/>>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- GHAFOOR, A.; HAY, I.D.; REHM, B.H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 15, p. 5238–5246, 2011. <https://doi.org/10.1128/aem.00637-11>
- HANCOCK, R. E. W.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*, v. 3, n. 4, p. 247–255, 2000. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>
- HENDRIE, C. A. Naloxone-sensitive hyperalgesia follows analgesia induced by morphine and environmental stimulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 32, n. 4, p. 961–966, 1989. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90066-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90066-x)
- HENRICHFREISE, B.; WIEGAND, I.; PFITER, W.; WIEDEMANN, B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 11, p. 4062–4070, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.00148-07>
- HIRSCH, E.B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research*, v. 10, n. 4, p. 441–451, 2010. <https://doi.org/10.1586/erp.10.49>
- ITO, C. A. S.; BAIL, L.; AREND, L. N. V. S.; et al. The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infectious Diseases*, v. 53, n. 5, p. 386–389, 2021. <https://doi.org/10.1080/23744235.2020.1867763>
- JACQUELINE, C.; CAILLON, J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 69 Suppl 1, n. SUPPL1, 2014. <https://doi.org/10.1093/jac/dku254>
- KANG, C. I.; KIM, S.; KIM, H.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases*, v. 37, n. 6, p. 745–751, 2003. <https://doi.org/10.1086/377200>
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 4, p. 582–610, 2009. <https://doi.org/10.1128/cmr.00040-09>
- LOGAN, L.K.; WEINSTEIN, R.A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 215, n. 1, p. S28–S36, 15 2017. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
- MAKINSON, A.; PARK, L. S.; STONE, K.; et al. Risks of Opportunistic Infections in People With Human Immunodeficiency Virus With Cancers Treated With

- Chemotherapy. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 8, n. 8, 2021. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab389>
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. FEB, p. 249785, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, p. 481–511, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- PANG, Z.; RAUDONIR, R.; GLICK, B. R.; et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- PARK, S. Y.; PARK, H. J.; MOON, S. M.; et al. Impact of adequate empirical combination therapy on mortality from bacteremic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *BMC Infectious Diseases*, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-308>
- PIERCE, V. M.; SIMMER, P. J.; LONSWAY, D. R.; et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 2321–2333, 2017. <https://doi.org/10.1128/jcm.00193-17>
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007. <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-07>
- REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- SANDOVAL-MOTTA, S.; ALDANA, M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 8, n. 3, p. 253–267, 2016. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1335>
- SARABHAI, S.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. Ellagic Acid Derivatives from *Terminalia chebula* Retz. Downregulate the Expression of Quorum Sensing Genes to Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Virulence. *PLOS ONE*, v. 8, n. 1, p. e53441, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053441>
- SFEIR, M. M.; HAYDEN, J. A.; FAUNTLEROY, K. A.; et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method: A phenotypic method for detecting metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 57, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.1128/jcm.01757-18>
- SHARIATI, A.; AZIMI, T.; ARDEBILI, A.; et al. Insertional inactivation of *oprD* in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. *New Microbes and New Infections*, v. 21, p. 75–80, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.013>
- TACCONELLI, E.; MAGRINI, N. WHO global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, p. 1–7, 2017. <https://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/resource/who-global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria.pdf>
- TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 11, 2018. <https://doi.org/10.1128/jcm.01140-18>
- TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T. Y.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, v. 191, p. 121–130, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>
- TUON, F. F.; GORTZ, L. W.; ROCHA, J. L. Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 16, n. 4, p. 351–356, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.009>
- TUON, F. F.; CIESLINSKI, J.; RODRIGUES, S. S.; et al. Evaluation of in vitro activity of ceftolozane–tazobactam against recent clinical bacterial isolates from Brazil – the EM200 study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, n. 2, p. 96–103, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.04.004>
- TURKINA, M.V.; VIKSTRÖM, E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of innate immunity*, v. 11, n. 3, p. 263–279, 2019. <https://doi.org/10.1159/000494069>