

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE MEDICINA - CAMPUS SOBRAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TICIANA MONT'ALVERNE LOPES PARENTE

ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS E DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA
TERAPIA FOTODINÂMICA EM ISOLADOS
AMBIENTAIS, ORAIS E EXTRA-ORAIS DE *Serratia*
marcescens

SOBRAL-CE

2010

TICIANA MONT' ALVERNE LOPES PARENTE

ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS E DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA
TERAPIA FOTODINÂMICA EM ISOLADOS
AMBIENTAIS, ORAIS E EXTRA-ORAI DE *Serratia*
marcescens

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin.

SOBRAL-CE

2010

TICIANA MONT' ALVERNE LOPES PARENTE

ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS E DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA
TERAPIA FOTODINÂMICA EM ISOLADOS
AMBIENTAIS, ORAIS E EXTRA-ORAIS DE *Serratia*
marcescens

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Profª. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, por tudo que tenho e que sou...

Aos meus pais e irmãos, forte alicerce e apoio incondicional nas horas difíceis.

À minha filha, pela forte inspiração à realização desse sonho.

Ao meu marido, pelo incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Jesualdo Pereira Farias.

À Faculdade de Medicina de Sobral, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho pela realização do meu sonho: SER MESTRE.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica de seus pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. Edson Teixeira Holanda, coordenador do programa de pós-graduação, pela competente e exemplar função de coordenador.

À Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin que acreditou no meu potencial com seus brilhantes ensinamentos, por suas palavras de apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa pela preciosa colaboração durante toda a pesquisa, ensinamentos e estimada participação na banca examinadora.

À toda família NUBIS, especialmente Prof. Rodrigo Maranguape pela inestimável colaboração.

Ao Prof. Ricardo Santos e ao aluno de Iniciação científica Sanrangers Sales Silva pela colaboração na análise estatística e análise de gráficos.

À Emanuella de Lima Rebouças, pela parceria e amizade e por compartilhar comigo momentos de angústia, alegria e dúvidas não medindo esforços para me ajudar.

À Alrieta Henrique Teixeira pela prestimosa colaboração, apoio e amizade.

À Joseíres Lira de Sousa Fontenelle por sua disponibilidade e bom humor em colaborar com o andamento da pesquisa.

Aos meus colegas da turma de mestrado na pessoa de Cynara Carvalho Parente, pela amizade, companheirismo e boa convivência.

Aos meus amigos Ruliglesio Rocha, Jackson do Nascimento Costa e Eliane dos Santos Pereira, pelo inestimável apoio.

À equipe do laboratório de Microbiologia na pessoa de Ana Paula Andrade pelo esforço de me ajudar em todos os momentos da pesquisa.

Aos funcionários da biblioteca e cantina pelo excelente acolhimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, a minha sincera gratidão.

MUITO OBRIGADA!

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses, 4.13

RESUMO

Serratia marcescens se encontra largamente distribuída na natureza, mas tem emergido nos últimos anos como um importante patógeno nosocomial resistente a diversos antimicrobianos. Este estudo teve como objetivo verificar a susceptibilidade de isolados ambientais, orais e extra-orais de *Serratia marcescens* a diferentes antibióticos e avaliar a terapia fotodinâmica antimicrobiana na redução do crescimento bacteriano em culturas de células planctônicas e biofilme. O teste de susceptibilidade antimicrobiano E-test® foi realizado para as 55 cepas e o TFA para as 30 cepas mais resistentes aos antimicrobianos testados. O efeito antimicrobiano do azul de o-toluidina associado com 4,72 J cm⁻² de luz emitida por um diodo (LED) foi avaliado. Antes e após os tratamentos, os inóculos bacterianos foram analisados com consideração do número de unidades formadoras de colônias. Considerando o perfil antimicrobiano observamos que das 55 cepas analisadas, 13 (23,63%) apresentaram resistência à doxiciclina, mas apenas um (1,81%) isolado apresentou resistência ao ciprofloxacino, outro à tobramicina e outro à cefotaxima; 24 (43,63%) cepas apresentaram sensibilidade intermediária à doxiciclina, todas foram sensíveis ao imipenem e a maioria foi sensível ao ciprofloxacino, à tobramicina e à cefotaxima. A análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas no perfil de resistência das amostras de diferentes origens em relação as drogas DX, CT e IP. Considerando a resistência a CI, as amostras ambientais foram significativamente mais resistentes do que as amostras orais e extra-orais. Para a droga TM, as amostras orais foram significativamente mais sensíveis do que as demais amostras. A irradiação das culturas planctônicas e biofilmes na ausência de TBO (L+C-), a incubação com TBO sozinho (L-C+) e o grupo controle não tratado (L-C-) não apresentou efeitos significativos na viabilidade das cepas de *S. marcescens* estudadas ($p < 0,05$). Decréscimos significativos na viabilidade bacteriana foram observados somente quando cultura planctônica e biofilme de cepas ambientais, orais e extra-orais de *S. marcescens* foram expostas ao azul de orto toluidina e luz LED ao mesmo tempo (L+C+). Reduções significativas nas contagens bacterianas foram observadas pela Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com variação de 10^{11} a 10^7 . A associação de TBO e LED, com densidade de energia de 4,72 J cm⁻², foi efetivo na redução da viabilidade bacteriana em cepas ambientais, orais e extra-orais de *S. marcescens* podendo ser uma ferramenta biotecnológica útil no controle da resistência bacteriana.

Palavras-chave: *Serratia marcescens*, resistência, E-test®, terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Serratia marcescens is widely distributed in nature, but has emerged in the last years as important nosocomial pathogen with resistance of many antimicrobial drugs. This study aimed to verify the susceptibility of *Serratia marcescens* isolates from environment, from oral infections and from extra-oral infections to different antibiotics and evaluate the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy as biotechnology tools reducing bacterial growth in planktonic cells and biofilm. E-test® were performed for fifty-five strains and the PACT for the thirty strains more resistant to antimicrobials tested. The antimicrobial effect of toluidine blue O, associated with 4,72 J cm⁻² of a light-emitting diode, was evaluated. Before and after the treatments, bacterial inocula were analysed with regard to the number of colony-forming units. For antimicrobials, we observed that the 55 strains analyzed, 13 (23.63%) were resistant to doxycycline, but only one (1.81%) isolate showed resistance to ciprofloxacin, another to tobramycin and another to cefotaxime, 24 (43.63%) strains had intermediate sensitivity to doxycycline, all were sensitive to imipenem and most were sensitive to ciprofloxacin, tobramycin and cefotaxime. Statistical analysis showed no significant differences in resistance of samples of different origins for drugs DX, CT, and IP. Considering the resistance to CI, the environmental samples were significantly more resistant than samples oral and extra-oral. For the drug TM, the oral samples were significantly more sensitive than the other samples. The irradiation of planktonic and biofilm cultures in the absence of TBO (L+S-), incubation with TBO alone (L-S+) and untreated control group (L-S-) had no significant effect on the viability of strains of *S. marcescens* studied ($p < 0.05$). Significant decreases in bacterial viability were observed only when planktonic and biofilm culture of environmental strains, oral and extra-oral *S. marcescens* were exposed to toluidine blue O and LED light at the same time (L+S+). Significant reductions in bacterial counts were observed by antimicrobial photodynamic therapy ranging from 10⁻¹¹ to 10⁻⁷. The association of TBO and light, with energy density 4,72 J cm⁻², was effective in reducing the viability of bacterial strains in environmental, oral and extra-oral *S. marcescens* and can be a useful biotechnological tool in the control of bacterial resistance.

Keywords: *Serratia marcescens*, resistance, E-test®, photodynamic therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de desenvolvimento do biofilme.....	26
Figura 2. Isolado incubado nos meios EPM e MILi identificado presuntivamente como <i>S. marcescens</i>	45
Figura 3. Painel do sistema BBL Crystal Enteric/Nonferment representando identificação definitiva de isolado como <i>S. marcescens</i>	46
Figura 4. Diagrama do sistema BBL Crystal Enteric/Nonferment com representação numérica identificando um isolado como <i>S. marcescens</i>	46
Figura 5. Distribuição das tiras do E - test® na placa de BHI Agar.....	48
Figura 6. (A) Aparelho de LED Laser Beam com um espectro de emissão de 620 a 660nm e comprimento de onda predominante 638.8 nm. (B) Aplicação do LED sob placas de cultivo.....	51
Figura 7. Fotossensibilizador utilizado, azul de orto-toluidina (Sigma-CI 52040).....	51
Figura 8. Disruptor de células (Branson Sonifier).....	53
Figura 9. Formação do halo de inibição distribuídos em placa de BHI Agar	57
Figura 10. Gráficos do perfil de resistência das cepas Ambientais aos Agentes Antimicrobianos	63
Figura 11. Gráficos do perfil de resistência das cepas Oraís aos Agentes Antimicrobianos	63
Figura 12. Gráficos do perfil de resistência das cepas Extra - Oraís aos Agentes Antimicrobianos	64
Figura 13. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana a partir da associação do azul de orto-toluidina (TBO) e diodo emissor de luz (L+C+) em culturas planctônicas e biofilme iniciais formados por cepas ambientais, oraís e extra-oraís de <i>Serratia marcescens</i> comparado com os controles (L-C-),(L+C-) e (L-C+)	65
Figura 14. Imagem característica da contagem microbiológica observada nos grupos controles (L+C-), (L-C-), (L-C+) da cepa oral 86 - A de <i>S. marcescens</i> crescido na forma de biofilme usando a técnica da gota em placas de BHI Agar.....	66
Figura 15. Contagem microbiológica após o TFA (L+C+) da cepa oral 86 - A de <i>S. marcescens</i> crescida na forma de biofilme usando a técnica da gota em placas de BHI Agar.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição das 23 cepas de <i>Serratia marcescens</i> isoladas de diferentes condições periodontais.....	44
Quadro 2. Distribuição e origem clínica das 22 cepas de <i>Serratia marcescens</i> isoladas de infecções extra-orais.....	45
Quadro 3. Amostras de <i>S. marcescens</i> de isolados ambientais, orais e extra-orais mais resistentes aos antibióticos	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de crescimento da cepa CDC 4112 determinada pela medida da absorvância a 600nm em diferentes intervalos de tempo.....	54
Gráfico 2. Demonstração da incidência de cepas extra-orais resistentes de acordo com a origem clínica	59
Gráfico 3. Susceptibilidade das cepas ao ciprofloxacino.....	60
Gráfico 4. Susceptibilidade das cepas à doxiciclina.....	60
Gráfico 5. Susceptibilidade das cepas a tobramicina.....	61
Gráfico 6. Susceptibilidade das cepas ao imipenem.....	61
Gráfico 7. Susceptibilidade das cepas a cefotaxima	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste de suscetibilidade pelo E – test ® para os cinco antimicrobianos testados.....	55
Tabela 2. Perfil de resistência dos 55 isolados de <i>S. marcescens</i> de diferentes origens em relação aos todos os antimicrobianos.....	56
Tabela 3. Teste de susceptibilidade pelo E-test para antimicrobianos.....	58
Tabela 4. Perfil de sensibilidade de cepas ambientais, orais e extra-orais a diferentes antimicrobianos	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µl	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centers for Disease Control
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo
CFU	Unidade Formadora de Colônia
CI	Ciprofloxacino
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CT	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaxinamase
DX	Doxiciclina
I	Intermediário
IH	Infecção Hospitalar
IP	Imipenem
KPC	Carbapenemase
L+ C-	Com luz e sem corante
L- C-	Sem luz e com corante
L- C+	Sem luz e sem corante
L+C+	Com luz e com corante
LED	Diodo emissor de luz
MH	Mueller- Hinton
NACL	Cloreto de Sódio
NCCLS	Comitê Nacional de Padrões Clínicos Laboratoriais
R	Resistente
S	Sensível
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TM	Tobramicina
TBO	Azul de orto- toluidina
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Infecção hospitalar e resistência bacteriana.....	19
2.2 <i>Serratia marcescens</i> e a resistência a drogas.....	21
2.3 Mecanismos de resistência a drogas.....	24
2.3.1 Intrínsecos e adquiridos.....	24
2.3.2 Biofilme.....	25
2.4 Terapias antimicrobianas.....	28
2.4.1 Antibióticos e mecanismos de resistência	28
2.4.1.1 Imipenem.....	28
2.4.1.2 Tobramicina.....	30
2.4.1.3 Doxiciclina.....	32
2.4.1.4 Cefotaxime.....	33
2.4.1.5 Ciprofloxacino.....	34
2.4.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana e mecanismos de resistência.....	36
2.4.2.1 Mecanismo de ação.....	37
2.4.3 Fotoinativação bacteriana.....	38
2.4.4 Agentes fotosensibilizantes antimicrobianos	39
2.4.5 Tipos de fontes de luz.....	41
3 OBJETIVOS.....	43
4 METODOLOGIA.....	44
4.1 Caracterização de cepas.....	44
4.1.1 Confirmação da pureza das cepas bacterianas previamente isoladas.....	46
4.2 Curvas de crescimento bacteriano - CEPA CDC 4112 - <i>S.marcescens</i>	47
4.3 Susceptibilidade antimicrobiana às drogas.....	47
4.3.1 Capacidade de formação de biofilme das amostras.....	49
4.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA)	49
4.4.1 Fonte de luz e fotossensibilizador.....	50
4.4.2 TFA em culturas planctônicas.....	51
4.4.3 TFA em biofilmes.....	52

4.5 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS.....	54
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÕES.....	75
8 REFERÊNCIAS	76
9 APÊNDICE	
10 ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

Serratia marcescens é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, móvel pertencente a família *Enterobacteriaceae* que está amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado na água, solo e ar. Também é reconhecido como um patógeno oportunista (HEJAZI *et al.*, 1997; HUME *et al.*, 2004), causador de infecções nosocomiais severas afetando principalmente pacientes imunocomprometidos, anciões e crianças em unidades neonatais (SCHABERG *et al.*, 1976; SMITH *et al.*, 1984; CIMOLAI *et al.*, 1997; ALFIZAH, 2004). O bacilo também tem sido encontrado em alguns estudos em pacientes com periodontites no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2006). As infecções causadas por este microorganismo podem ser de difícil tratamento devido a resistência para uma variedade de antimicrobianos, entre eles β -lactâmicos, amoxicilina, cefalosporinas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, ciprofloxacina, cloranfenicol, aztreonam e tetraciclina (STOCK *et al.*, 2003; ALFIZAH *et al.*, 2004).

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de agente antimicrobiano requerida para prevenir o crescimento de microorganismos em condições experimentais, fornecendo uma medida quantitativa de susceptibilidade bacteriana. A CIM vem desempenhando um papel central no monitoramento da terapia com antibiótico uma vez que a extrapolação dos dados pode indicar a eficácia clínica da droga. Nessa técnica, baseado nos valores do CIM os organismos são agrupados em três categorias: suscetível (S), intermediário (I) e resistente (R) (MARTINEZ *et al.*, 2000).

Um dos fatores de virulência da *Serratia marcescens* é a produção de um agente surfactante chamado de “*serrawettin*” que provavelmente está envolvido no processo de formação de biofilme (WEI *et al.*, 2004). Biofilmes microbianos podem ser definidos como diversas comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície sólida com uma interface líquida entre eles (ZANIN *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a estrutura do biofilme pode atuar como barreira física a difusão dos agentes antimicrobianos, sendo essas limitações mais severas quando comparadas com células planctônicas (STEINBERG *et al.*, 2008). Além disso, bactérias embebidas em

biofilmes expressam diferentes genes, permitindo um ambiente que faz estas bactérias menos sensíveis aos agentes antibacterianos (MOTEGI *et al.*, 2006; SHEMESH *et al.*, 2007).

Desde 1940, o desenvolvimento de fármacos efetivos e seguros para lidar com as infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, e a morbidade e as mortalidades associadas a estas doenças foram bastante reduzidas. Infelizmente, o desenvolvimento de fármacos antibacterianos efetivos foi acompanhado pela emergência de organismos resistentes aos fármacos. Isto não é inesperado, uma vez que o curto tempo de geração de muitas das espécies bacterianas oferece ampla oportunidade para a adaptação evolutiva. O fenômeno da resistência impõe sérias restrições às opções disponíveis para o tratamento clínico de muitas infecções bacterianas. A resistência aos agentes quimioterápicos pode também desenvolver-se nos protozoários, nos parasitas multicelulares e nas populações de células malignas (FOLEY e TILLEY, 1997; MARTIN e ROBERTSON, 2000; St GEORGIEV, 2000; RANG e DALE, 2007).

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) tem surgido como uma alternativa antimicrobiana para indução de morte celular através da liberação de radicais livres em curto espaço de tempo, tornando o surgimento de resistência improvável. A terapia envolve um tratamento baseado em uma reação fotoquímica, a qual é iniciada pela ativação de uma droga fotosensibilizadora por uma luz de comprimento de onda complementar que pode levar a danos irreversíveis ou a morte celular, sendo uma técnica minimamente invasiva (KUBLER, 2005).

O uso da TFA é uma alternativa viável e promissora devido ao crescente número de patógenos multi-resistentes a drogas (WINCKLER, 2006). Comprimentos de onda claros visíveis, principalmente na presença de um fotosensibilizador químico, foram estudados como meios para afetar a vitalidade bacteriana, uma vez que através dele moléculas são quimicamente excitadas podendo causar dano biológico ou conduzir à geração de oxigênio reativo capaz de afetar sistemas biológicos como organelas, células, e bactérias (STEINBERG *et al.*, 2008).

A grande maioria dos estudos utilizando a terapia fotodinâmica para obtenção de efeito antimicrobiano utiliza lasers de baixa potência com diversos meios ativos e comprimentos de onda. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) surgiram como luzes alternativas a essa terapia. Os LEDs são dispositivos semicondutores que quando

polarizados adequadamente emitem luz na faixa visível ou invisível. Embora tanto os lasers quanto os LED produzam luzes monocromáticas, os LED não apresentam boa colimação e coerência, resultando em bandas de emissão mais largas que favorecem a obtenção de complementaridade com os fotossensibilizadores utilizados.

Entre as vantagens da terapia fotodinâmica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais temos primeiramente que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável. Finalmente, o uso do fotossensibilizador ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica (Wilson, 2004).

Alguns autores têm relatado a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre bactérias relacionadas a infecções hospitalares como *Staphylococcus aureus* (DAI *et al.*, 2010) e *Pseudomonas aeruginosa* (TSENG *et al.*, 2009) mas poucos são os estudos que avaliam a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Serratia marcescens* crescidas na forma planctônica (LIPOVSKY *et al.*, 2008) ou em biofilmes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção hospitalar e resistência bacteriana

A infecção hospitalar (IH) pode ser definida como qualquer infecção adquirida após a internação do paciente, que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, e que pode ser relacionada com a permanência do paciente e/ou procedimentos hospitalares (GOMES *et al.*, 2001). Essa infecção pode ser causada pela microbiota do próprio paciente, ou por microrganismos encontrados no ambiente em que ele vivia. Nesse ambiente, o uso racional de antimicrobianos torna-se arma essencial do sistema de prevenção de infecções nosocomiais. A literatura tem mostrado que o sistema de auditoria dos antimicrobianos prescritos por equipe multidisciplinar dedicada a essa função é a forma mais eficaz de racionalizar esse uso, passando então a ser ferramenta fundamental do sistema preventivo (COUTO *et al.*, 1999; ANDERSON; KAYE, 2009).

A IH é um problema tão antigo, quanto os primeiros estabelecimentos que surgiram, há séculos (325 D.c, com o objetivo de albergar pessoas doentes. Contudo, mesmo na sociedade antiga, como na moderna, esta infecção sempre causou impacto e preocupação, na área médica, por seu alto índice de mortalidade (SANTOS, 2004).

A introdução de procedimentos para melhorar as condições sanitárias e das práticas de higiene instituídas nos hospitais, ocorridas no final do século XIX, reduziu as taxas de IH. Os principais expoentes e líderes desta inquietante batalha do controle de IH foram Wendel, Holmes, Semmelweis, Nihtingale, Pasteur e Lister (SANTOS, 2004).

Embora as UTIs representem apenas 5% a 10% dos leitos de um hospital, estima-se que nelas ocorram cerca de 25% das infecções hospitalares. A média das taxas de infecção hospitalar em 196 UTIs americanas que participaram do programa National Nosocomial Infections Surveillance System/Center for Disease Control and Prevention (NNISS/CDC) está próxima de 9,2% (com densidade de infecção de 23,7 infecções por mil pacientes/dia), o que equivale a uma taxa duas a cinco vezes maiores do que as encontradas em enfermarias (SPENCER, 1994).

Um estudo europeu de prevalência de infecções hospitalares em UTIs (excluídas as unidades coronarianas e as UTIs infantis e especiais) merece destaque por ter contado com a participação de 17 países, 1.417 UTIs e 10.038 pacientes acompanhados. Neste trabalho foram detectados 4.501 (44,8%) pacientes infectados, dos quais 2.064 (20,6%) eram portadores de infecção hospitalar (FERNANDES *et al.*, 2000).

OLIVEIRA *et al.* (2007) observaram em um Hospital Universitário Brasileiro uma taxa global de infecção de 23,8%, constatando que a colonização por microrganismos resistentes contribuiu para o desenvolvimento de infecção. A taxa de mortalidade foi de 10,8% e destes, 23 pacientes (37,1%) faleceram após o diagnóstico de infecção hospitalar. Tais resultados reafirmam a necessidade de esforços direcionados ao controle da infecção e da resistência bacteriana subsidiando reflexões frente à adoção de medidas tais como uso de equipamentos de proteção individual, procedimentos invasivos, higienização das mãos, educação permanente da equipe assistencial multiprofissional, uso racional dos antibióticos.

MENEZES *et al.* (2002) verificaram a taxa média de infecção hospitalar de 13,4 infecções hospitalares por mil pacientes/dia na UTI do Hospital Geral de Fortaleza. Adicionalmente, NOGUEIRA *et al.* (2009) verificaram que a taxa de IH anual média no Hospital Universitário de Fortaleza foi de 8,2%.

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos é extremamente variável entre países, regiões e origem hospitalar e/ou comunitária das estirpes. Algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo. Entre os microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos com o correr dos anos, destacam-se: *estafilococos*, *enterobactérias*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e, mais recentemente, *hemófilos*, *gonococos*, *enterococos* e *pneumococos* (TAVARES, 2000).

Os patógenos nosocomiais são selecionados por causa de mudanças nas práticas médicas e devido ao uso de antimicrobianos (LOPES *et al.*, 2005). A partir dos meados de 1990, as sucessivas implementações da terapia anti-infectiva têm se tornado cada vez mais difícil devido à disseminação da resistência bacteriana, da emergência de novos patógenos e a decorrência de infecções em pacientes imunodeprimidos, nos quais as drogas antimicrobianas tornaram-se menos efetivas (LEMONICK, 1994; SANTOS, 2004).

O impacto das bactérias resistentes é mundial e representa ameaça para a humanidade. É um grave problema de saúde pública, de grande amplitude médico-social, cujas conseqüências, para muitos estudiosos (LEMONICK, 1994; SANTOS, 1997) já estão aí no nosso cotidiano e, se não forem freadas, no futuro serão ainda mais devastadoras para a humanidade.

A prevenção de emergência de cepas de microorganismos multiresistentes é necessidade urgente, mas ainda não atingida de forma eficiente pelas abordagens clássicas (FUCHS *et al.*, 2006). O crescente interesse, em estudar e melhor analisar o problema da IH, está voltado, principalmente para o fenômeno das bactérias antibiótico- resistentes.

2.2 *Serratia marcescens* e a resistência a drogas

Serratia marcescens é um bacilo Gram-negativo, aeróbico, móvel, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Por muitos anos esse organismo foi considerado saprófito para o homem, sendo freqüentemente isolado da água, solo, ar, plantas, gêneros alimentícios e animais. Entretanto, tem emergido nos últimos anos, como causa de várias infecções hospitalares de severidade variável, sendo atualmente reconhecido como um patógeno oportunista para o homem (CARBONELL *et al.*, 2000; HUME; WILLCOX, 2004). Algumas amostras dessa espécie são capazes de produzir um pigmento vermelho, denominado prodigiosina, um metabólito secundário promissor devido a relatadas atividades antifúngica, imunossupressiva e antiproliferativa (GIRI *et al.*, 2004; HARRIS *et al.*, 2004; SUNAGA *et al.*, 2004), além de efeitos apoptóticos e potente citotoxicidade contra várias linhagens humanas cancerosas ESCOBAR – DIAZ *et al.*, 2005.

Enquanto *S. marcescens* pode ser raramente detectada em indivíduos saudáveis, pacientes hospitalizados podem ser colonizados ou infectados por esta espécie. Muito freqüentemente, essa bactéria foi relacionada a infecções no trato respiratório de pacientes entubados, infecções no trato urinário de pacientes com cateteres, infecções em feridas cirúrgicas, superinfecções, osteomielite e septicemia em pacientes com cateterização intravenosa, sendo que nestes casos a taxa de mortalidade pode alcançar de 39 a 50% (ADJIDÉ *et al.*, 2004; LAU *et al.*, 2004; SEKIGUCHI *et al.*, 2004; CURTIS *et al.*, 2005; IWAYA *et al.*, 2005).

A *S. marcescens* tem sido frequentemente causa de infecções sendo isolado de várias fontes do meio ambiente hospitalar, entre elas soluções desinfetantes e anti-sépticos (SANTOS, 2004). Ressalta-se que esta bactéria pode apresentar resistência a estas soluções, normalmente, são usadas nos hospitais como meio de controle de microorganismos. Recentemente, foram encontradas cepas formadoras de biofilme resistentes a soluções de quaternário de amônio usadas para preservação de lentes de contato em contraste com cepas planctônicas que se apresentaram sensíveis (SZCZOTKA *et al.*, 2009) demonstrando assim o papel dos biofilmes no aumento da resistência bacteriana.

Também foi relatada freqüentemente a ocorrência de surtos causados por *S. marcescens* em unidades de cuidados intensivos neonatais e de pacientes imunocomprometidos ou com doenças debilitantes (SARVIKIVI *et al.*, 2004; GULER *et al.*, 2008). Nestes hospedeiros, *S. marcescens* pode invadir a corrente sanguínea através do trato intestinal e causar choque endotóxico e falência múltipla de órgãos (VINOGRADOV *et al.*, 2003). Infecções oculares devido a esse microrganismo são comuns e causa freqüente de queratite (KUNIMOTO *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2004; MUNOZ *et al.*, 2004)

Recentemente, *S. marcescens* foi isolada do biofilme subgengival de indivíduos com diferentes condições periodontais, tendo sido mais prevalente em pacientes com periodontite severa (4,1%) do que em indivíduos com gengivite (3,2%) ou com o periodonto clinicamente saudável (2,5%) (BARBOSA *et al.*, 2006). Anteriormente, esta espécie tinha sido a mais freqüentemente isolada entre os organismos da família *Enterobacteriaceae*, da microbiota subgengival de indivíduos brasileiros com periodontite, presente em quase 10% da população estudada (BARBOSA *et al.*, 2001). Apesar da presença desses microrganismos em sítios subgengivais, inclusive após o tratamento periodontal (SLOTS *et al.*, 1990a; LISTGARTEN *et al.*, 1993), o papel desses microrganismos na doença periodontal ainda não foi elucidado.

Em estudo realizado por Carbonell *et al.* (2000) utilizando cepas clínicas hospitalares de *S. marcescens*, foi observado que dentre 938 isolados deste microrganismo apenas 32 (3,4%) produziam pigmento e que a maioria dos isolados pigmentados apresentava o mesmo padrão de resistência a antibióticos (ampicilina, cefalotina e tetraciclina) do que os não pigmentados. Sendo que dentre estes isolados pigmentados, os que carregavam plasmídeos apresentavam resistência somente a esses mesmos antimicrobianos.

S. marcescens prontamente adere à instrumentação hospitalar invasiva, tais como cateteres, endoscópios e tubos intravenosos (SICKBERT-BENNETT *et al.*, 2005 apud BARBOSA, 2005). Além disso, infecções causadas por *S. marcescens* podem ser difíceis de tratar devido à resistência dessa bactéria a uma variedade de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, ciprofloxacina, cloranfenicol, aztreonam, trimetropim /sulfametoxazol e tetraciclina (FILIUS *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005; HURRELL *et al.*, 2009). Nesse sentido, a definição da concentração inibitória mínima (CIM) vem desempenhando um papel central no monitoramento da terapia com antibiótico de modo que a extrapolação dos dados pode prever a eficácia clínica da droga (MARTINEZ *et al.*, 2000).

Apesar da disponibilização de novos antibióticos, o ritmo do desenvolvimento de resistência bacteriana nos diferentes patógenos, Gram-positivos e Gram-negativos, representa um constante desafio terapêutico, fenômeno observado em todo o mundo. O número de antibióticos em pesquisa diminuiu nos últimos anos, enquanto a resistência as drogas antimicrobianas tem crescido de forma inexorável (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). No período de 1972 a 1973, comparado ao período de 1997 a 1998, o percentual de artigos relacionados a novas resistências, publicados no *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, aumentou de 11% para 34% (SWARTZ, 2000).

Um importante fator de resistência dessa espécie relaciona-se ao fato de *S. marcescens* pertencer ao grupo das enterobactérias produtoras de β -lactamases (AmpC) de expressão cromossômico induzível não inibida por inibidores de beta-lactamase (ácido clavulânico) (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Entre bactérias Gram-negativas, cepas de enterobactérias e não-fermentadores vem apresentando níveis de resistência cada vez mais expressivos ante as diferentes cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração. Cepas produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado, conhecidas como ESBL, capazes de inativar cefalosporinas de terceira e quarta geração, passam também a ser preocupação mundial, implicando mudanças na abordagem terapêutica (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

S. marcescens foi isolada de 36% de tubos nasogástricos enterais de neonatos em UTIs no Reino Unido apresentando-se todas resistentes a amoxicilina e amoxicilina com ácido clavulânico (HURRELL *et al.*, 2009). É reconhecida como um patógeno importante, com propriedades invasoras e tendência a resistir a muitos antibióticos utilizados na atualidade (KONEMAN *et al.*, 2001).

2.3 Mecanismos de resistência a drogas

2.3.1 Intrínsecos e adquiridos

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos pode ser dividida em dois tipos gerais: uma na qual a característica de resistência apresenta-se como uma propriedade intrínseca e outra que pode ser adquirida. Os termos resistência intrínseca ou inerente são usados para indicar uma resistência que é uma característica usual, presente em todas ou quase todas as cepas da espécie (TOCARS *et al.*, 1999; TORTORA *et al.*, 2005).

Segundo Rossi e Andreazzi (2005) resistência intrínseca é uma característica natural de determinados grupos de bactérias, sendo espécie ou gênero-específico, e delimita o espectro de atividade dos antimicrobianos e pode ser utilizada para confirmar a correta identificação de uma bactéria, além de servir como marcador no monitoramento de procedimentos padronizados. O principal mecanismo da resistência intrínseca é a inexistência de sistema metabólico ou organela, alvos da ação do antimicrobiano no organismo (FUCHS, 2006).

A transferência ou aquisição de DNA pode ocorrer por conjugação, onde os genes de resistência são transferidos através dos plasmídios havendo necessariamente contato entre as células bacterianas; transdução, onde a transferência é realizada através de um vírus; transformação, com transferência da célula doadora para a receptora sem contato entre as células e transposição, onde os genes determinantes de resistência podem transferir-se de um plasmídeo a outro, para o cromossomo ou para um bacteriófago. O elemento responsável pela transferência é o transposon (RANG e DALE, 2007).

Os genes para resistência intrínseca, como outras características da espécie, parecem residir em cromossomo (MURRAY, 1990). Resistência adquirida pode resultar tanto de mutações no DNA existente quanto da aquisição de novo DNA. A mutação é cromossômica e a emergência da resistência ocorre a medida que as bactérias se replicam. Durante o processo de replicação podem ocorrer erros que modificam a sequência da codificação do DNA e, conseqüentemente, alteração da informação contida no DNA original, produzindo células com uma mutação específica, que será transferida a futuras gerações. Algumas mutações são benéficas para a bactéria, como resistir à ação de um antibiótico, oferecendo uma vantagem competitiva em seu ambiente.

Essas transferências genéticas ocorrem geralmente no trato gastrointestinal de homens e animais, locais onde outras bactérias também estão expostas a pressões seletivas pelo uso terapêutico e subterapêutico de antimicrobianos (MUNDY *et al.*, 2000).

As várias características intrínsecas expressadas pela *Serratia marcescens* incluem resistência à ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de primeira geração, cefuroxima, colistina, cefoxitina (NCCLS, 2003). Exemplos de resistência adquirida são encontrados na literatura como completa resistência a ampicilina e cefalotina, elevada susceptibilidade a cefalosporinas de segunda e terceira geração, aminoglicosídeos, quinolonas e cotrimoxazol (MANFREDI *et al.*, 2004). Existe uma preocupação atual com a emergência de cepas multi-resistentes isoladas principalmente de pacientes hospitalizados por longos períodos e/ou que receberam terapia antimicrobiana de amplo espectro.

2.3.2 Biofilme

A resistência a biofilmes é chamada resistência fisiológica e ocorre em condições especiais de crescimento bacteriano (FUCHS *et al.*, 2006). Biofilme microbiano pode ser definido como uma comunidade diversificada de microorganismos aderidos a uma superfície, usualmente com um líquido de interfaciamento (ZANIN *et al.*, 2006). Estudos indicam que esses filmes biológicos são pontos estáveis em um ciclo de vida que inclui iniciação, maturação, manutenção e dissolução (ABDULAH *et al.*, 2005). *S. marcescens* forma biofilme através de uma série de estágios definidos que culminam com um biofilme poroso e filamentoso com cadeias agrupadas de células, os quais são dependentes do sistema “quorum-sensing”. Alguns aspectos do ciclo de vida de *S. marcescens* incluem adesão, “swarming” e formação de arquitetura tridimensional (RICE *et al.*, 2005).

A formação do biofilme pode ocorrer por meio de três mecanismos (STOODLEY *et al.*, 2002). O primeiro é pela redistribuição de células fixas através da motilidade de sua superfície. O segundo mecanismo ocorre por divisão binária das células fixas à superfície. Após a divisão, células filhas se expandem externamente e para cima, se ligando à superfície e formando aglomerado de células, de forma similar à formação de colônias em placas de ágar (HEYDORN *et al.*, 2000). O terceiro mecanismo de agregação ocorre pelo recrutamento de

células presentes no meio externo para o desenvolvimento do biofilme (TOLKER-NIELSON *et al.*, 2000).

A formação de biofilmes pode ocorrer como um mecanismo de defesa dos organismos a condições de estresse ambiental. Biofilmes são resistentes a forças físicas como as produzidas, por exemplo, pela corrente sanguínea ou a ação de lavagem que a saliva realiza sobre as superfícies na cavidade bucal. Organismos vivendo em comunidades podem também suportar mudanças de pH, a ação de radicais de oxigênio, desinfetantes e antibióticos de uma forma mais favorável à vida do que as células vivendo de forma planctônica. Biofilmes são resistentes à fagocitose, e as células de defesa que tentam fagocitar os microrganismos em biofilme podem causar mais danos aos tecidos circunvizinhos que ao biofilme propriamente dito (JEFFERSON, 2004).

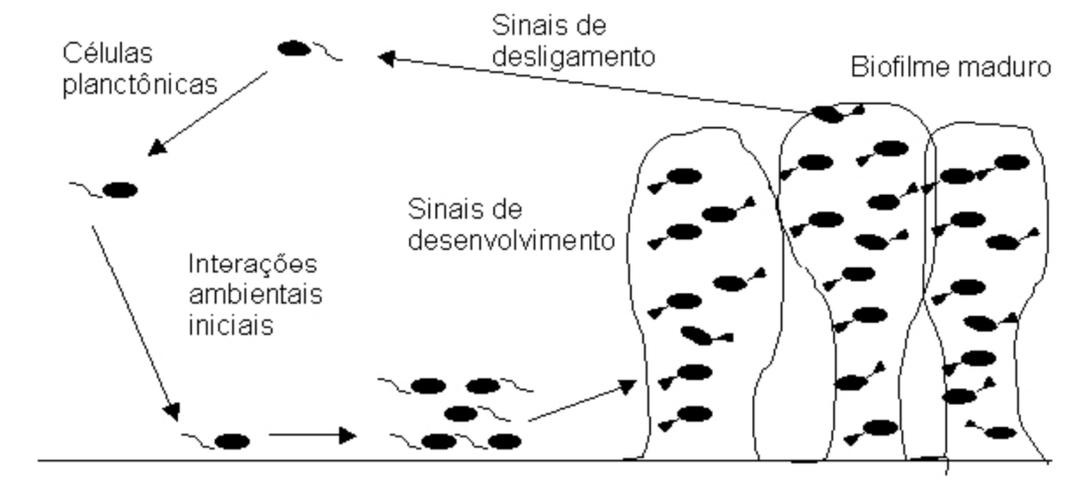


Figura 1- Modelo de desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley *et al.* (2002)

De acordo com Doron (2008), claras evidências mostram que células no biofilme apresentam-se em um estado fisiológico diferentes das células planctônicas, tendendo a serem menos susceptíveis a agentes antimicrobianos. Em alguns casos extremos, a concentração de antimicrobiano necessária para exercer atividade bactericida frente a biofilmes pode ser maior de três ou quatro ordens de magnitude comparado a quantidade necessária para ter ação sobre organismos planctônicos, dependendo da combinação espécie-droga.

De acordo com Lewis (2001), três fatores podem ser considerados para explicar a resistência dos biofilmes à morte por antimicrobianos: a penetração restrita da droga no interior

das comunidades microbianas, a característica de crescimento lento apresentada por algumas células presentes no biofilme e ainda a expressão de alguns genes biofilme-específico.

Biofilmes estão embebidos em uma matriz polimérica composta por proteínas, carboidratos e DNA (CARNIOL E GILMORE, 2004) que pode restringir a penetração de substâncias e ligar-se a antimicrobianos. Isso poderá fornecer resistência efetiva às células em comunidades frente a grandes moléculas como as do sistema complemento e proteínas antimicrobianas. A barreira de difusão é provavelmente efetiva também frente a pequenos peptídeos antimicrobianos. A carga negativa do polissacarídeo extracelular também apresenta importante função na proteção do biofilme frente a moléculas positivamente carregadas dos aminoglicosídeos, restringindo sua penetração através de ligações com as moléculas da matriz (LEWIS, 2001). A difusão retardada de um antimicrobiano na matriz polimérica irá diminuir a sua concentração adentrando a estrutura do biofilme, auxiliando na ação de enzimas tais como β -lactamase (GIWEREMAN *et al.*, 1991).

Quando é considerada a ação dos antimicrobianos sobre os microrganismos em geral se observa que virtualmente todos são mais efetivos em matar células em crescimento. Alguns como, por exemplo, as penicilinas só exercem sua função sobre células em crescimento. Outros agentes mais modernos tais como cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas podem matar células que não estão em fase de crescimento, mas são evidentemente mais efetivos frente a células durante essa fase do seu ciclo de vida (JEFFERSON, 2004).

Assim, o crescimento lento indubitavelmente contribui para que os filmes biológicos resistam à morte por antimicrobianos e pode ser apontado como principal fator para uma possível resistência de células planctônicas à morte (ADAMS e MELED, 1999). Uma pequena população de células em uma comunidade microbiana pode apresentar-se quiescente ou em estado de dormência, dessa forma encontra-se em uma fase metabólica que não favorece a ação da maioria dos antimicrobianos. Por essa razão, não são atingidas nas terapias medicamentosas corriqueiramente utilizadas (ANWAR *et al.*, 1992).

Um outro fator a concorrer para a sobrevivência dos organismos em comunidade é a possibilidade de expressão gênica diferente de algumas células presentes nos biofilmes conferindo-lhes vantagens metabólicas, adaptativas e de defesa, em seu microambiente de desenvolvimento. Um exemplo dessa característica é quando em filmes polimicrobianos encontra-se uma espécie bacteriana com bagagem genética para expressar β -lactamase e outras

espécies que não podem produzir tal substância vêm a se beneficiar quando submetidas à terapia medicamentosa com β -lactâmicos (COSTERTON *et al.*, 2003).

Um ponto de grande relevância em relação à susceptibilidade de células persistentes a antimicrobianos é a capacidade que o sistema imunológico apresenta de contribuir para debelar infecções recorrentes. Dessa forma, células persistentes tornam-se um problema de maior dificuldade de resolução quando o sistema imunológico não está exercendo adequadamente suas funções. Um exemplo é a meningite causada por *Streptococcus pneumoniae* que causa meningites recalcitrantes devido à inacessibilidade do fluido cérebro-espinhal aos componentes do sistema imunológico. E ainda que células do sistema imunológico tenham acesso ao local onde o biofilme encontra-se, a presença de polissacarídeo extracelular protege fisicamente suas células dos componentes do sistema imune (LEWIS, 2001).

Se a concentração do antimicrobiano cai temporariamente ou se os sintomas desaparecem devido à erradicação das células planctônicas e a terapia é descontinuada, as células persistentes irão refazer a estrutura do biofilme que começará a liberar novas células de vida livre. Essa dinâmica explica a natureza recalcitrante das infecções causadas por biofilmes e a necessidade de uma terapia antimicrobiana prolongada (LEWIS, 2001).

2.4 Terapias antimicrobianas

2.4.1 Antibióticos e mecanismos de resistência

2.4.1.1 Imipenem

O Imipenem é o derivado N-formidoil da tienamicina, antibiótico produzido pelo *Streptomyces cattleya* que pertence ao novo quadro de antibióticos beta-lactâmicos chamados carbapenêmicos. Os carbapenens são caracterizados, quimicamente, por um anel pentagonal no qual o enxofre do ácido 6-aminopenicilâmico é substituído pelo carbono, ainda apresentando uma dupla ligação. O imipenem possui o espectro antibacteriano mais amplo de todos os antibióticos beta-lactâmicos (SILVA, 2006). Quando administrado isoladamente, sofre grande metabolização pela desidropeptidase-1, enzima que existe nas células dos túbulos renais proximais com borda em escova. Essa degradação produz baixas concentrações de droga ativa na urina (TRIPATHI, 2006).

Mecanismo de Ação: O imipenem, como as penicilinas, inibe a biossíntese da parede celular bacteriana, mas apresenta certas peculiaridades nesse sentido, além de ser rapidamente bactericida para as bactérias sensíveis. Exerce seu efeito antibacteriano ligando-se a proteínas específicas que se acoplam às penicilinas, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, produzindo esferoplastos, forma de degradação das bactérias. O imipenem também se combina a proteínas específicas do tipo 1, o que resulta em rápido efeito letal para as bactérias. Outras ações do Imipenem consistem na sua penetração através da membrana externa dos Gram-negativos e na sua resistência à ação de beta-lactamases mediadas por plasmídios e por cromossomos da maioria das bactérias, inclusive de raças resistentes a outros antibióticos (SILVA, 2006).

Resistência: O imipenem é capaz de induzir beta-lactamases em certas bactérias Gram-negativas, como *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas essas bactérias não se tornam resistentes ao antibiótico, como acontece com as cefamicinas e aminotizolilcefalosporinas, que também induzem beta-lactamases (SILVA, 2006). A resistência dos carbapenêmicos as beta-lactamases conta para sua eficácia contra mais de 90% das espécies de Gram-negativas de bactérias (REMINGTON, 2000). As bactérias que tiveram suas beta-lactamases induzidas pelo imipenem tornam-se resistentes às cefalosporinas e penicilinas. Essas observações explicam a inexistência de resistência cruzada entre o imipenem e outros antibióticos e, também, o antagonismo que amiúde se observa, in vitro, quando se associa imipenem a outro antibiótico beta-lactâmico. Praticamente, o imipenem é resistente a quase todos os tipos de beta-lactamases, se bem que seja inativado pelas beta-lactamases de *Pseudomonas multophila* e duas cepas de *Bacterioides fragilis*. A resistência ao imipenem pelo mecanismo mediado pela beta-lactames é, portanto, muito raro. Certas raças de *Serratia marcescens* e de *Enterobacter cloacae* são resistentes ao imipenem por um mecanismo que parece envolver redução da permeabilidade da parede celular bacteriana. Observou-se o aparecimento de cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, durante o tratamento, mas essas cepas podem ser sensíveis às penicilinas antipseudomonas, cefalosporinas da terceira geração e aos aminoglicosídios (SILVA, 2006).

O imipenem era originalmente resistente a todas as beta-lactamases, porém alguns microorganismos possuem agora genes cromossômicos codificando beta-lactamases que hidrolisam o imipenem (RANG e DALE, 2007) e mostra-se resistente à maioria das beta-lactamases, mas não às metalo-beta-lactamases (KATZUNG, 2005).

2.4.1.2 Tobramicina

É um aminoglicosídeo pertencente a família da estreptomicina. Todos os aminoglicosídeos apresentam em sua estrutura um anel essencial: o aminociclitol. O termo aminoglicosídeo resulta de ligações glicosídicas entre o aminociclitol e dois ou mais grupamentos amino ou aminoaçúcares. A tobramicina faz parte da família das canamicinas derivada do *Streptomyces ssp.*

A relação estrutura-atividade dos aminoglicosídeos não está completamente elucidada. Estudos removendo os grupamentos amino, hidroxil ou ambos levaram à perda da atividade antibacteriana e do potencial tóxico, respectivamente (SILVA, 2006).

Mecanismo de Ação: Atuam pela inibição irreversível da síntese protéica bacteriana. O mecanismo de ação é iniciado quando o fármaco ultrapassa a membrana externa do patógeno através de canais de porina; em seguida, a droga é transportada de forma ativa até o citoplasma, em um processo dependente de oxigênio, o que ajuda a explicar a ausência de ação desses fármacos contra microorganismos anaeróbios. O cloranfenicol bloqueia este sistema de transporte (RANG e DALE, 2007). A energia necessária para a ocorrência desse evento é gerada pelo próprio gradiente eletroquímico transmembranoso, sendo o transporte acoplado a uma bomba de prótons. Além das condições anaeróbias, o pH extracelular baixo também inibe o transporte de aminoglicosídeos. Por outro lado, antibióticos que atuam na parede bacteriana, como as penicilinas, podem intensificar a chegada do aminoglicosídeo no citoplasma, gerando um aumento da atividade bactericida de forma sinérgica (SILVA, 2006). O efeito bactericida dos aminoglicosídeos é reforçado por agentes que interferem com a síntese da parede celular (RANG e DALE, 2007).

A inibição da síntese protéica bacteriana pelos aminoglicosídeos ocorre após a ligação do antibiótico a proteínas específicas da subunidade 30S ribossômica. O aminoglicosídeo pode, então: (1) inibir a síntese de proteínas, interferindo do complexo de iniciação de peptídeos; (2) provocar uma leitura equivocada do RNAm, que burla a oferta de aminoácidos e leva à formação de um peptídeo não-funcional; ou, ainda, (3) causar a ruptura de polissomos, formando monossomos (cadeia de RNA com apenas um ribossomo) não-funcionais. Como essas atividades ocorrem praticamente de forma simultânea, os efeitos finais são altamente bactericidas (SILVA, 2006).

Resistência: A resistência aos aminoglicosídeos está se tornando um grande problema devido à variedade de mecanismos (RANG e DALE, 2007) e desenvolve-se muito rapidamente com algumas bactérias como alta resistência de única etapa (GENNARO, 2004). As bactérias sensíveis aos aminoglicosídeos apresentam como mecanismos de defesa a alteração na captação do fármaco, a síntese de enzimas modificadoras (fatores R) ou mudanças nos sítios de ligação nos ribossomos. As alterações enzimáticas geram o mecanismo mais comum de resistência e podem diminuir ou causar a perda total da atividade antimicrobiana. Essas enzimas podem ser produzidas tanto por microorganismos Gram-positivos quanto por Gram-negativos e são de três categorias: fosfotransferases, nucleotidiltransferases e acetiltransferases (SILVA, 2006).

Os aminoglicosídeos modificados enzimaticamente apresentam uma capacidade muito reduzida de ligação à subunidade ribossômica e, conseqüentemente, encontram altos níveis de resistência em bactérias capazes de produzir essas enzimas. Bactérias que possuem adeniltransferases são resistentes à gentamicina e à tobramicina, enquanto aquelas que possuem fosfotransferases são resistentes à neomicina, paromicina e canamicina. As enzimas responsáveis pela resistência bacteriana são ainda encontradas em transposons e plasmídios bacterianos extras cromossômicos. Esse fato indica a possibilidade de transferência de genes que codificam resistência aos aminoglicosídeos de bactérias Gram-positivas para Gram-negativas. É conhecida a transferência gênica de fosfotransferases de enterococos para espécies de *Campylobacter*. As teorias para a origem dessas enzimas inativadoras revelam que elas podem ser derivadas de microorganismos produtores de aminoglicosídeos ou, ainda, resultantes de mutações em genes que codificam enzimas envolvidas na respiração celular normal (RANG e DALE, 2007).

A segunda forma de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos é a alteração no sítio(16S) de ligação no RNAm no ribossomo como resultado de atividade enzimática ou de mutações. Por fim, algumas bactérias podem apresentar resistência pela diminuição da captação do antibiótico. Mutações cromossômicas podem provocar defeitos que influenciam o gradiente eletroquímico responsável pela captação do aminoglicosídeo, ao tempo que fases da captação do antibiótico não-dependentes de energia podem levar à resistência, pois são capazes de alterar a permeabilidade da membrana (SILVA,2006). A resistência como resultada da deficiência na penetração pode ser largamente superada pelo uso concomitante de penicilina e/ou vancomicina (RANG e DALE, 2007).

A resistência decorrente da elaboração bacteriana de enzimas destrutivas dos aminoglicosídeos pode ser adquirida ou natural, sendo que nove dessas enzimas já foram identificadas. Em decorrência da rápida aquisição de resistência, é comum empregar os aminoglicosídeos apenas em combinação com outras drogas antibacterianas (GENNARO, 2004).

2.4.1.3 Doxiciclina

É um antibacteriano de largo espectro, pertencente ao grupo das tetraciclina com ação bacteriostática em concentrações terapêuticas e com amplo espectro que inclui Gram-positivas, Gram-negativas, bactérias aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, micoplasmas, riquetsias, clamídias e alguns protozoários. De acordo com sua farmacologia, é um componente de longa ação. Surgiu em 1967 como um análogo da tetraciclina determinada por substituições na estrutura básica da tetraciclina, a qual consiste em um núcleo hidronaftaceno que contém quatro anéis fundidos.

Mecanismo de Ação: A ação das tetraciclina é devida à capacidade dessas drogas de se ligar à subunidade 30S dos ribossomos microbianos, bloqueando a ligação da RNA aminoacil transferase e inibindo a síntese de proteínas, pois impede a adição de novos aminoácidos na cadeia polipeptídica em formação (GENNARO, 2004).

Resistência: A resistência bacteriana às tetraciclina ocorre predominantemente em microorganismos que não possuem mecanismos de transporte ativo através das membranas celulares e, dessa forma, não concentram a droga em suas células. Isso é acompanhado do decréscimo do fluxo ou aumento da capacidade da célula para expulsar o antibiótico. A resistência pode ser mediada pela transferência de plasmídios resistentes através da transdução ou conjugação (SILVA, 2006) e como os genes que controlam a resistência às tetraciclina estão intimamente associados aos genes pra resistência aos outros antibióticos, os microorganismos podem desenvolver resistência a muitos fármacos simultaneamente (RANG e DALE, 2007). Com o uso disseminado desses fármacos, a resistência tem aumentado inclusive em espécies bacterianas consideradas altamente sensíveis.

O espectro antimicrobiano de todas as tetraciclinas é praticamente idêntico e os semelhantes lipofílicos são mais ativos que os hidrofílicos. No tratamento de infecções agudas do trato urinário, são os agentes mais utilizados.

Embora a resistência às tetraciclinas não seja adquirida tão rapidamente como para a penicilina, ela, entretanto ocorre logo. Entre as bactérias Gram-positivas, mais de 44% de *Streptococcus pyogenes* são resistentes e 74% de *Enterococcus faecalis* o são. A incidência de resistência entre cepas de hospital de *S.aureus* pode variar entre 30 a 50%, mas pode chegar a 75% depois de vários dias de tratamento (SILVA, 2006).

A incidência de resistência entre as várias bactérias Gram-negativas também é muito alta, especialmente entre as *Enterobacteriaceae*, que, no intestino, podem passar os genes que controlam a resistência de uma espécie, até mesmo de um gênero, para outra (resistência infecciosa à droga). A resistência para uma tetraciclina normalmente confere resistência a todas as outras, exceto para algumas cepas de *streptococos* e *E. coli* resistentes às tetraciclina que podem manter a sensibilidade à minociclina. Não é comum ocorrer resistência cruzada entre a penicilina e as tetraciclinas ou entre outras classes de antibióticos e as tetraciclinas, exceto em resistência infecciosa à droga, em que o epissomo ou plasmídeo adquirido contém mais de um gene para resistência a outras drogas (GENNARO, 2004).

2.4.1.4 Cefotaxime

É uma cefalosporina de terceira geração, as quais representam um importante e rapidamente crescente grupo de antibióticos na medicina atual. Provêm de um fungo, o *Cephalosporium acremonium*, capaz de produzir vários antibióticos semelhantes às penicilinas, mas com a característica de serem resistentes à beta-lactamase, além de serem ativos contra Gram-positivos e Gram-negativos (SILVA, 2006). As cefalosporinas de terceira geração possuem espectro antibacteriano ainda mais amplo contra as bactérias Gram-negativas aeróbias, inclusive contra bactérias resistentes a outras cefalosporinas (TRIPATHI, 2006).

O ácido 7-amino-cefalosporânico núcleo das cefalosporinas possui um anel beta-lactâmico unido a um anel diidrotiazínico. As cefalosporinas naturais apresentam baixo poder antimicrobiano, mas a introdução de substituições nas cadeias laterais ao nível dos carbonos 7

e 3 resultaram em inúmeros produtos com muito maior potência e características especiais (PENILDON, 2006).

Mecanismo de Ação: Interferência com a síntese de peptidoglicano bacteriano depois da ligação com as proteínas ligadoras dos beta-lactâmicos (GENNARO, 2004).

Resistência: A resistência a este grupo de fármacos aumentou por causa das beta-lactamases codificada por plasmídeo ou cromossômica. Quase todas as bactérias Gram-negativas apresentam um gene cromossômico que codifica uma beta-lactamase que é mais ativa na hidrólise das cefalosporinas que das penicilinas, e em vários microorganismos uma mutação única pode resultar em produção constitutiva de alto nível desta enzima. A resistência também ocorre quando houver diminuição da penetração do fármaco como resultado de alterações das proteínas da membrana externa, ou mutações das proteínas nos locais de ligação (RANG e DALE, 2007).

Embora algumas cefalosporinas sejam desativadas por tipos de beta-lactamases semelhantes às penicilinas, muitas beta-lactamases são seletivas para cefalosporinas e são chamadas de tipos de cefalosporinases (GENNARO, 2004). Apresentam grande atividade contra *Enterobacteriaceae*. Porém, apesar da resistência desse grupo de antibióticos às beta-lactamases, a eficácia desses fármacos frente a infecções por *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., e *Pseudomonas* sp. pode ficar limitada pelo surgimento da resistência bacteriana durante o tratamento, fenômeno raro antes do advento desses produtos. A indução na produção de beta-lactamases pode resultar do contato das bactérias com essas drogas, provocando resistência a outras cefalosporinas da terceira geração (KATZUNG, 2005).

2.4.1.5 Ciprofloxacino

É uma droga antibacteriana do grupo das quinolonas, desenvolvida a partir da introdução dos grupos 6-flúor e 7-(1-piperazinil) na estrutura do ácido nalidíxico, ou seja, é um análogo sintético do ácido nalidíxico. O ácido nalidíxico encontra-se em desuso por conta do espectro antibacteriano limitado que possuíam, uma vez que não atingiam níveis antibacterianos sistêmicos com rápido desenvolvimento de resistência. A introdução do átomo de flúor (fluoroquinolonas) ampliou o espectro, aumentou a potência e parece ter evitado o desenvolvimento de resistência mediada pelo plasmídeo (KATZUNG, 2005). As

flourquinolonas são bacteriostáticas em baixas concentrações, bactericidas em altas concentrações e altamente ativas contra *Enterobacteriaceae* (GENNARO, 2004).

Mecanismo de Ação: Inibem a síntese do DNA bacteriano, ocasionando a morte da bactéria. O alvo bioquímico na ação dessa droga é a inibição da atividade das enzimas DNA girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV, as quais catalisam a passagem de um filamento do DNA através do outro. A natureza altamente condensada do cromossomo encontrado na célula bacteriana torna-a totalmente dependente dessas enzimas para realizar o seu processo de replicação. As topoisomerases são enzimas cruciais para ajudar a manter o DNA celular em um estado apropriado de superespirilamento na região de replicação do cromossomo bacteriano.

As quinolonas exercem sua atividade aprisionando ou estabilizando os complexos de DNA e enzima após a ruptura dos filamentos e antes do resselamento do DNA. O complexo aprisionado parece funcionar como um verdadeiro veneno celular, uma vez que resulta na geração de uma ruptura no DNA que a célula bacteriana dificilmente consegue reparar.

Uma das grandes vantagens desse grupo de drogas é a capacidade de apresentar toxicidade seletiva. Embora ambas as células, humana e bacteriana, possuam um DNA de duplo filamento, ocorrem diferenças fundamentais na forma de organização do DNA nesses dois tipos de células, impedindo danos à célula do hospedeiro (PENILDON, 2006).

Resistência: A resistência a agentes antimicrobianos não relacionados estruturalmente, que ocorre quando se faz seleção para resistência quinolônica, sugere possíveis alterações na difusão da droga. A resistência desses mutantes envolve a redução na produção de proteínas da membrana externa, que constitui poros através dos quais as quinolonas são transportadas. Tais mutantes com comprometimento na absorção têm sido identificados em *Serratia marcescens* resistentes ao ácido nalidíxico.

Parece provável que tanto alteração ao nível da subunidade A da DNA girase e topoisomerase IV quanto a diminuição da difusibilidade da droga representam mecanismos de resistência quinolônica em cepas clínicas (RANG e DALE, 2007).

É preocupante a capacidade do ciprofloxacino de induzir, em bacilos Gram-negativos, resistência a antimicrobianos não-relacionados às quinolonas, como cefalosporinas,

aminoglicosídeos e carbapenêmicos, por meio da indução de bombas de efluxo (FUCHS *et al.*, 2006).

2.4.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana e mecanismos de resistência

O surgimento de agentes infecciosos resistentes a drogas, aqueles que não são mortas ou inibidas por compostos antimicrobianos, é um problema clínico sério importante da saúde pública (WAINWRIGHT *et al.*, 2004). A prescrição inadequada e o uso inadequado de antibióticos com diferentes mecanismos de ação, bem como a incapacidade de alguns pacientes na conclusão da terapia antibiótica tem causado um aumento mundial no número de microorganismos resistentes a diversos antibióticos (JORI e COPPELLOTTI, 2007). Conseqüentemente, diferentes abordagens para a erradicação das bactérias são necessárias para a busca de novas drogas ou tecnologias no combate a estes agentes resistentes.

Vantagens apresentadas pela terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) em tratamentos oncológicos, como a seletividade da área tratada, menores doses e maior conforto comparados aos tratamentos convencionais têm aumentado o interesse por processos fotoquímicos em muitas áreas médicas. Assim, vários estudos têm sugerido o TFA como uma modalidade terapêutica inovadora para o tratamento de infecções microbianas (WILSON, 2004; CARVALHO *et al.*, 2007).

A terapia fotodinâmica e fotossensibilização letal são os termos usados para descrever um processo que utiliza uma fonte de luz com um comprimento de onda específico que é apropriado para absorção por uma substância fotossensível. Esta interação pode resultar em oxigênio singleto (O_3) ou formação de outros radicais livres capazes de danificar componentes celulares essenciais ou modificar as suas atividades metabólicas de uma forma irreversível, o que pode resultar em morte celular (MALIK *et al.*, 1990; BHATTI *et al.*, 1997, MITRA, 2004; AKILOV *et al.*, 2006). Por apresentar mecanismos de ação diferentes dos tratamentos mais convencionais, a inativação de células microbianas pela TFA pode incluir várias características favoráveis tais como:

- É uma terapia duplamente seletiva que oferece baixo risco de destruição das células saudáveis, uma vez que a luz ou fotossensibilizador na TFA induz pouco ou nenhum

efeito tóxico por si só (HABLIN e HASAN, 2004). Além disso, os anticorpos poderiam ser adicionados ao fotossensibilizador, a fim de aumentar sua afinidade célula específica.

- Ela é reprodutível e pode ser aplicada repetidas vezes, (BACKHAUS *et al.*, 2007), sem grandes efeitos colaterais e sem causar reações sistêmicas que as drogas usuais costumam causar (HABLIN e HASAN, 2004).

- Promove a morte bacteriana rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações por longos períodos de tempo tornando o surgimento de resistência improvável (WAINWRIGHT *et al.*, 2004).

- A possibilidade de desenvolvimento de protocolos contra a maioria das classes de bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e vírus (ROVALDI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2007).

- Possibilidade de utilização de fontes de luz de baixo custo para a ativação dos agentes fotossensibilizantes (ZANIN *et al.*, 2006). Além disso, o uso de diferentes tipos de agentes fotossensibilizantes.

2.4.2.1 Mecanismo de ação

O processo fotodinâmico é baseado em um protocolo de duas etapas, onde as células-alvo são seletivamente carregadas com um fotossensibilizador seguido de irradiação com uma luz de comprimento de onda complementar (KUBLER, 2005). Assim, reações térmicas não fotoquímicas podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo o oxigênio molecular singleto, o que pode prejudicar as bactérias oxidantes, moléculas orgânicas, como membrana plasmática ou DNA podendo danificar ou matar a célula alvo (MACROBERT *et al.*, 1989; MALIK *et al.*, 1990; BHATTI *et al.*, 1997).

Durante a terapia fotodinâmica antimicrobiana dois processos fotoquímicos podem acontecer. A reação fotoquímica tipo I é uma reação radical ou redox em que um fotossensibilizador excitado interage com as moléculas adjacentes por troca de um elétron ou um átomo de hidrogênio produzindo radicais de ânion superóxido. Este processo é geralmente seguido pela conversão do superóxido em H_2O_2 , que é um precursor imediato do radical

hidroxila, um dos membros mais perigosos das espécies reativas de oxigênio que pode atacar e oxidar qualquer molécula biológica (MACROBERT *et al.*, 1989; PLAETZER *et al.*, 2003; HABLIN e HASAN, 2004). Por outro lado, o tipo de reação fotoquímica II envolve a interação direta do fotossensibilizador com o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete. O oxigênio singlete é instável sendo um poderoso oxidante que pode reagir com vários tipos de biomoléculas, tais como triacilgliceróis insaturados, colesterol, fosfolípidios, aminoácidos como o triptofano, histidina e metionina, bem como bases de ácidos nucleicos (MACROBERT *et al.*, 1989; PLAETZER *et al.*, 2003; HABLIN e HASAN, 2004).

Assim, independentemente do tipo de reação do oxigênio singlete e radicais hidroxila somente irão oxidar moléculas e estruturas que estão próximos à área de sua produção (coincidente a área de aplicação do fotossensibilizador) uma vez que estes produtos têm alta reatividade e relativamente curto tempo de vida em sistemas biológicos, sendo baixa a capacidade de difusão dos efeitos citotóxicos para outros tecidos, garantindo assim a seletividade da terapia (PLAETZER *et al.*, 2003).

2.4.3 Fotoinativação bacteriana

A realização de um tratamento rápido e eficaz de infecções localizadas da cavidade oral parece ser bastante complexa, pois as células microbianas são caracterizadas por grandes diferenças em sua estrutura e organização. Este fato tem influências óbvias na modulação da interação dessas células com agentes fotossensibilizantes adicionados externamente (JORI e COPPELLOTTI, 2006). Assim, células de bactérias são classificadas em duas categorias principais, dependendo de sua resposta ao Gram, o que implica em diferenças na sua morfologia (JORI e BROWN, 2004). A foto inativação de bactérias Gram positivas e Gram negativas são baseadas no conceito de que alguns fotossensibilizadores podem ser acumulados em quantidades significativas no interior ou à parede celular e induzir um dano irreversível nas bactérias (MAISCH *et al.*, 2004). No entanto, a penetração do fotossensibilizador na célula não é um processo normal e é dependente do tamanho do fotossensibilizador, carga, propriedades de solubilidade e local de ação (KESSEL e LUO, 1999).

A parede celular desempenha um papel importante na susceptibilidade de aplicação da TFA em bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo as bactérias Gram positivas mais sensíveis. Esta maior suscetibilidade pode ser atribuída à sua fisiologia, uma vez que essas bactérias apresentam uma parede celular com espessura de 15-80 nm, contendo várias camadas de peptideoglicano e ácido lipoteicóico com alto grau de porosidade. Conseqüentemente, várias macromoléculas, como fotossensibilizadores, são capazes de passar através da parede celular (WAINWRIGHT, 1998; JORI e BROWN, 2004; HAMBLIN e HASAN, 2004).

Em contraste, a parede celular das bactérias Gram negativas apresenta uma estrutura complementar, com espessura de 10-15 nm, conhecida como membrana externa, que é separada da membrana citoplasmática contendo peptideoglicano em seu interior pelo periplasma. Essa estrutura altamente organizada funciona como uma barreira contra a difusão molecular, incluindo os agentes fotossensibilizadores. Nas células bacterianas Gram negativas, moléculas do fotossensibilizador ligam-se preferencialmente a membrana externa inibindo a sua penetração na célula e evitando a foto inativação pela TFA (HAMBLIN E HASAN, 2004).

Como descrito anteriormente, a resposta celular á TFA é resultado da interação bactéria-fotossensibilizador, porém, os danos das células bacterianas é também um resultado da interação entre a fonte de luz, as células bacterianas e as condições de ambiente (condições térmicas, pressão, osmolaridade e pH.) (KESSEL e LUO, 1999; AKILOV *et al.*, 2006).

2.4.4 Agentes fotossensibilizantes antimicrobianos

Para que a terapia antimicrobiana fotodinâmica exerça algum efeito na célula bacteriana, a luz deve ser absorvida por um ou mais de seus constituintes. Embora algumas bactérias apresentem componentes capazes de absorver parte do espectro de luz visível, a maioria das espécies não apresenta esses componentes, de modo que o uso de fotossensibilizadores exógenos, que atraia para si a luz, é fundamental ao sucesso dessa terapia (WILSON; DOBSON; HARVEY, 1992).

Os fotossensibilizadores são elementos críticos no processo de terapia fotodinâmica. Desde que a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes

especiais, com capacidade de absorção significativa para a luz, a utilização de um fotossensibilizador que atrai luz própria e inicia a formação de radicais livres é essencial (WILSON *et al.*, 1992; KUBLER, 2005). Vários fotossensibilizadores têm sido desenvolvidos durante as últimas duas décadas para o uso em terapia fotodinâmica com diferentes propriedades físicas de absorção de luz (WAINWRIGHT *et al.*, 1998).

A capacidade de um componente para absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Os requisitos de um fotossensibilizador ideal incluem características físicas, químicas e biológicas. Um fotossensibilizador ideal tem que ser não-tóxico e deverá apresentar toxicidade local apenas após a ativação pela iluminação. Os fotossensibilizadores que têm sido estudados para a eliminação de microrganismos pertencem a diferentes classes de compostos e pode mostrar bandas de absorção diferentes. Os grupos principalmente para TFA são: derivados fenotiazínicos, tais como azul de toluidina e azul de metileno; porfirinas (WAINWRIGHT, 2000) e derivados de ftalocianina de alumínio (Wood *et al.*, 1999), os derivados halogenados xantinas, como rosa bengal, verde de malaquita, alguns conjugados de clorinas e hipericina (CASTANHO *et al.*, 2004; HAMBLIN e HASAN, 2004).

Um dos grupos mais importante de derivados fenotiazínicos são azul de metileno e azul orto toluidina (USACHEVA *et al.*, 2001). Esses corantes têm estrutura química e forma semelhantes e grande afinidade aos ácidos nucleicos com espectro de absorção muito semelhantes na região do vermelho visível ($\cong \lambda = 660\text{nm}$ e 630nm , respectivamente). Eles

também têm baixo peso molecular e propriedades físico-químicas semelhantes e ambos apresentam características hidrofílicas que tornam possível passarem livremente através da membrana. Estes fotossensibilizadores podem induzir a uma redução *in vitro* de 4-5 logs na população microbiana após um curto período de incubação de 5 a 10 minutos (JORI *et al.*, 2006).

Wilson e colaboradores têm demonstrado a eficácia de uma série de fotossensibilizadores, incluindo o azul de metileno e azul de toluidina, contra bactérias relevantes para a cavidade oral (WILSON, PRATTEN e PEARSON, 1995; WILSON, 2004).

Isso é particularmente atraente, dada a baixa toxicidade humana destes dois fotossensibilizadores, azul de toluidina sendo usado na coloração da cavidade oral para lesões pré-cancerosas (WAINWRIGHT, 2005).

Tanto o azul de metileno e TBO são usados na identificação cirúrgica em concentrações de até 1% sem causar toxicidade humana. Em termos de TFA, foi demonstrado que a dose de luz necessária para matar as bactérias tratadas com TBO é bem menor do que a toxicidade causando em cultura de queratinócitos humanos e fibroblastos (WAINWRIGHT, 1998).

2.4.5 Tipos de fontes de luz

Assim como o fotossensibilizador, a escolha da fonte de luz é um importante fator para o êxito da terapia fotodinâmica. A fim de otimizar o tratamento, é essencial que a emissão de luz coincida com o pico de absorção do fotossensibilizador escolhido (FISCHER *et al.*, 1998). Embora lasers convencionais sejam tradicionalmente utilizados, recentemente o uso dos LEDs tem se intensificado, uma vez que, por não apresentarem boa colimação e coerência, resultam em bandas de emissão de luz mais largas, favorecendo, assim, a complementaridade com o fotossensibilizador (ZANIN *et al.*, 2006; PELOI *et al.*, 2008; GIUSTI *et al.*, 2008).

O comprimento de onda de absorção dos compostos fotossensibilizantes é um fator importante para o sucesso da foto inativação e as fontes de luz utilizadas são um componente essencial no processo fotodinâmico. Para chegar à resposta ao tratamento na TFA, dois objetivos devem ser alcançados. Inicialmente, para que a reação fotoquímica aconteça, o comprimento de onda da luz utilizada deve coincidir com o espectro de absorção do fotossensibilizador. Adicionalmente, a luz deverá ser capaz de penetrar até atingir a célula alvo (YAVARI, 2006). Diversos estudos mostraram o uso da terapia fotodinâmica para a inativação de bactérias utilizando lâmpadas halógenas, díodos emissores de luz (LEDs) e lasers (DOBSON e WILSON, 1992; BURNS *et al.*, 1995, WILSON e YIANNI, 1995; GRIFFITHS *et al.*, 1997; ZANIN *et al.*, 2002; CHABRIER-ROSELLO *et al.*, 2005, ZANIN *et al.*, 2005).

O uso de lâmpadas halógenas como de tungstênio e xenônio como fontes de luz são uma opção para a TFA. Eles podem fornecer até 250 mW/cm^2 sobre um amplo espectro de emissão (350-850 nm) e potência de até 8W. Manutenção fácil, tamanho pequeno, simples operação e baixo custo, são as principais vantagens desses tipos de fontes de luz. No entanto, elas limitaram-se a iluminação superficial, uma vez que a luz gerada não é eficientemente acoplada em fibras ópticas. Além disso, uma combinação de banda estreita, passe longo e passe curto e filtros são necessários, para identificar com precisão o comprimento de onda escolhido (BRANCALEON e MONSELEY, 2002).

Outra possível fonte de luz para TFA são diodos emissores de luz. As luzes do tipo LED parecem ser as fontes de luz mais promissoras. Apesar de serem capazes de produzir luz monocromática como os lasers, os LEDs não apresentam boa colimação e coerência, resultando em faixas mais amplas de emissão o que acaba sendo vantajoso para TFA, porque aumenta a possibilidade de sobreposição do espectro da irradiação do LED com o espectro de absorção da luz pelo fotossensibilizador (PELOI *et al.*, 2008). Eles são dispositivos semicondutores de baixo custo em comparação com todas as outras fontes descritas (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007), pequeno e leve em massa e sua vida útil pode chegar a centenas de milhares de horas. Em pesquisas laboratoriais foi avaliado o efeito antimicrobiano da TFA usando LED como fonte de luz e seus resultados mostraram a utilização satisfatória contra bactérias orais (ZANIN *et al.*, 2005, 2006; GIUSTI *et al.*, 2008).

Lasers com fonte de luz monocromática coerente também são amplamente utilizados. Diferentes sistemas de laser foram utilizados para a inativação fotodinâmica de bactérias, destacando-se o hélio-neon (He-Ne laser) e o laser semicondutor (laser diodo) (CALIN e PARASCA, 2009). Estes sistemas de laser são extremamente compactos e fáceis de manusear podendo ser usados diretamente ou em pausas (BRANCALEON e MONSELEY, 2002). A banda espectral principal em que ele emite são os de néon, com comprimentos de onda de 632,8 nm (CALIN e PARASCA, 2009). Os lasers He-Ne têm sido intensivamente utilizados para o tratamento fotodinâmico de bactérias, especialmente *Porphyromonas gingivalis* e estreptococos do grupo mutans (BURNS *et al.*, 1995; ZANIN *et al.*, 2005), com bons resultados. Apesar de haver dificuldades na obtenção de um laser He-Ne com saídas de alta-energia - um ressonador único com uma saída de 30 mW é o laser He-Ne laser mais alto que nós poderíamos obter. Este fato torna muito difícil conseguir uma densidade de energia ótima capaz de cobrir toda a superfície alvo. Atualmente, os sistemas de laser de diodo podem

produzir resultados mais elevados de energia no modo de onda contínua para alcançar uma alta densidade de potência para uma área ideal (CALIN e PARASCA, 2009).

3 OBJETIVOS

Os objetivos dessa dissertação de mestrado foram:

- Verificar a susceptibilidade de isolados ambientais, orais e extra-orais de *Serratia marcescens* a diferentes antibióticos;

- Determinar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica através da associação do azul de O-toluidina (TBO) e um diodo emissor de luz (LED) na viabilidade de culturas planctônicas e biofilme de *Serratia marcescens* isoladas do ambiente, infecções orais e infecções extra-orais;

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização de cepas

Neste estudo 55 cepas de *S. marcescens* de diferentes procedências foram analisadas, conforme descrito a seguir:

- Vinte e três isolados foram obtidos de amostras do biofilme subgengival de indivíduos com diferentes condições periodontais (BARBOSA *et al.*, 2006), conforme descrito no quadro 1.
- Vinte e dois isolados oriundos de infecções extra-orais, sendo treze isolados de infecções nosocomiais, gentilmente cedidos pela Dra. Gleize Carbonell, Secção de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Campinas, São Paulo; oito isolados no Laboratório Dr. Sérgio Franco do Hospital Paulistano (São Paulo - SP) e um isolado no Laboratório Fleury (São Paulo - SP) de uma amostra de sangue de uma paciente com 83 anos, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Waldemar Francisco. A distribuição destas cepas, de acordo com a fonte de isolamento, é mostrada no quadro 2.
- Dez isolados do ambiente, sendo oito obtidos a partir da análise de amostras de água para consumo humano não-tratada, gentilmente cedido pela Dra. Maria Inês Zanoli Sato da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) de São Paulo-SP. Duas das cepas ambientais de *S. marcescens* foram gentilmente cedidas pela Profa. Rosa Gamba, Laboratório de Microbiologia Ambiental, do ICB, USP-SP.

Condição Periodontal	Cepas	Número de isolados
Periodontite crônica severa	26B; 86A; 124A; 217A ₁ ; 217C; 273C; 274A; 274B; 274C	09
Periodontite crônica moderada	85A; 130A	02
Periodontite agressiva	32B; 307A; 312B; 312C; 387B; 387C; 54A; 76A; 131A	09
Gengivite	240C; 385C	02
Periodonto clinicamente saudável	338C	01

Quadro 1. Distribuição das 23 cepas de *S. marcescens* isoladas de diferentes condições periodontais.

Origem clínica	Cepas	Número de isolados
Infecção do trato urinário	10; 458; 654; 833; 3963	05
Secreção ocular	266	01
Orofaringe	341; 380	02
Abscesso	480; 631	02
Secreção de ferimento	636; 901	02
Líquido ascético	651	01
Trato respiratório	521; 821; 3202	03
Secreção de tornozelo	3303; 4479	02
Sangue	WF; 567; 1113	03
Sêmen	3838	01

Quadro 2- Distribuição e origem clínica das 22 cepas de *S. marcescens* isoladas de infecções extra-orais.

Todas as cepas de *S. marcescens* isoladas do biofilme subgingival foram identificadas presuntivamente através de testes bioquímicos EPM e MILi (TOLEDO *et al.*, 1982a; TOLEDO *et al.*, 1982b) e depois identificadas de forma definitiva através do sistema BBL CRYSTAL ENTERIC/NONFERMENTER (*Becton Dickinson Microbiology Systems*, Cockeysville MD, EUA) em estudo prévio (BARBOSA *et al.*, 2006) de acordo com figuras 1,2 e 3 gentilmente cedidas por professor Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa, da UFC, Sobral, CE. Os isolados de infecções extra-orais e do ambiente também foram submetidos aos testes bioquímicos supracitados para confirmação de identidade.

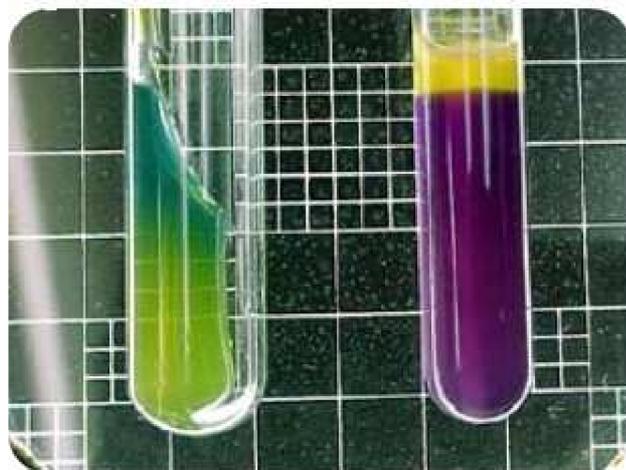


Figura 2. Isolado incubado nos meios EPM e MILi identificado presuntivamente como *S. marcescens*.

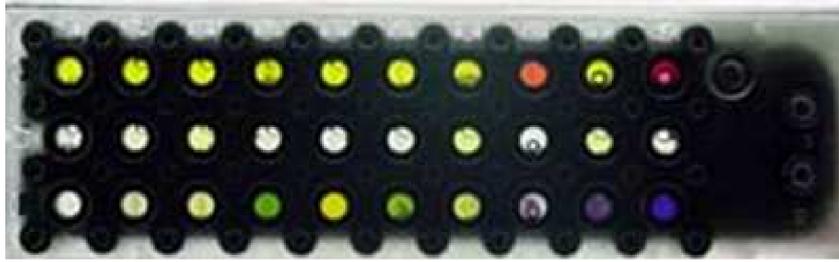


Figura 3. Painel do sistema BBL Crystal Enteric/Nonferment representando identificação definitiva de isolado como *S. marcescens*.

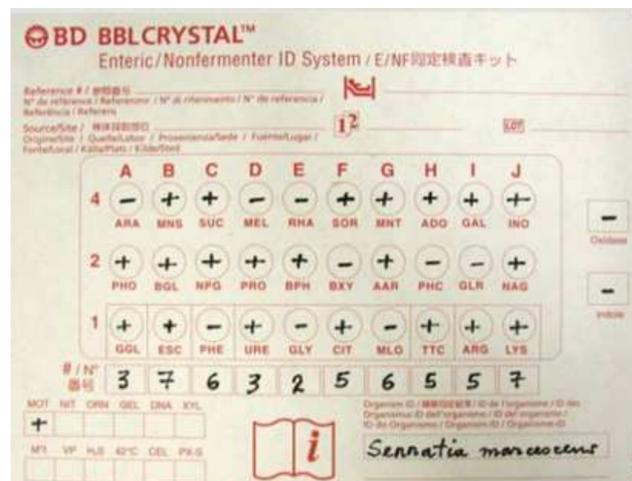


Figura 4. Diagrama do sistema BBL Crystal Enteric/Nonferment com representação numérica identificando um isolado como *S. marcescens*.

4.1.1 Confirmação da pureza das cepas bacterianas previamente isoladas

As bactérias previamente isoladas foram transportadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará- campus Sobral devidamente acondicionadas e conservadas em BHI – glicerol a 40%. Em seguida, foram estocadas a - 80°C. Para a reativação das cepas foi retirada uma alíquota de 200µL da amostra em BHI – glicerol (após descongelamento em temperatura ambiente) e transferida para um tubo com 5mL de BHI caldo e incubada a 37°C por 18h em aerobiose. Após crescimento, cada amostra foi semeada em placas de Agar MacConkey, seletivo e diferencial para bactérias entéricas e espécies relacionadas e novamente incubada a 37° C por 18h em aerobiose. Após confirmação da pureza da amostra,

foi retirada uma unidade formadora de colônia (UFC) e inoculada em caldo BHI e incubada novamente por 18 h a 37°C. Após crescimento, retirou-se 200 µL de cada amostra e transferiram-se para um microtubo de centrifuga contendo 200 µL de BHI – glicerol, as amostras foram então armazenadas em freezer a - 80°C para uso nos experimentos que se seguem. O experimento foi realizado no período de agosto de 2008 a dezembro de 2009.

4.2 Curva de crescimento bacteriano - CEPA CDC 4112 - *S.marcescens*

Para a realização da curva de crescimento bacteriano, foi retirada uma alíquota de 200 µL da amostra padrão *S. marcescens* CDC 4112 previamente armazenada no BHI – glicerol a - 80° C e inoculada em 5 mL de BHI caldo. Após 18 horas de crescimento em aerobiose a 37°C, foi retirada uma alíquota de 100µL da amostra e inoculada em 5 ml de caldo Mueller-Hinton (MH) e incubada novamente em estufa de aerobiose por 18 h a 37°C. Após o crescimento, verificou-se novamente a pureza da amostra através de suas características morfo-tintoriais (Coloração de Gram) e inoculou-se 1 mL da amostra em 50 mL de caldo MH para iniciarmos a curva de crescimento.

A curva de crescimento para *S. marcescens* CDC 4112 foi realizada através da medição seqüencial do crescimento bacteriano a partir de um inóculo inicial obtida através de duas metodologias distintas: a leitura de absorbância a 600 nm comparada com o seu crescimento em Agar. Para tanto, para iniciar a curva de crescimento no tempo zero (T0), 1 mL do inóculo foi transferido para um microtubo de centrifuga estéril para leitura da absorbância enquanto que 1 mL do inóculo foi transferido para outro microtubo de centrifuga, diluído em série decimal de 10⁻¹ a 10⁻¹¹ e plaqueado pela técnica da gota (HERIGSTAD, 2001). As leituras, diluições e plaqueamentos foram realizadas inicialmente a cada hora e a partir do início da fase exponencial foram realizados a cada 30 minutos. As placas de Agar foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 h e após esse período, as colônias foram contadas com o auxílio de um negatoscópio. A curva de crescimento neste estudo teve como objetivo estabelecer e determinar um número de células equivalente a 10⁸ UFC/ml, que foi utilizado como padrão de concentração bacteriana para realização do E-test®.

4.3 Susceptibilidade antimicrobiana às drogas

A curva de crescimento da cepa padrão de *S. marcescens* CDC 4112 demonstrou que uma absorbância entre 0,04 e 0,07 a 600 nm correspondia a um crescimento de $1-3 \times 10^8$ UFC/ml. Assim, para a realização do teste de susceptibilidade a drogas todas as bactérias orais, extra-orais e ambientais foram crescidas como descrito anteriormente e tiveram sua concentração ajustada com a ajuda de um espectrofotômetro. Nesse estudo, a susceptibilidade antibiótica das cepas de *S. marcescens* foi determinada usando E-test® (AB Biodisk, Solna, Suécia) como ilustrado na figura 5 para ciprofloxacino, ceftazidima, doxiciclina, imipenem e tobramicina.

A seguir, um swab estéril foi mergulhado na suspensão bacteriana e estriado na placa de Agar MH de 150 mm, com 4 rotações de 90° preenchendo todas as lacunas na placa e em seguida espalhando nas bordas. As placas ficaram em repouso por 15 minutos na bancada até que o inóculo tivesse sido completamente absorvido no meio.

As tiras do E-test® foram removidas do freezer -20°C, 20 minutos antes do uso e foram manipuladas em condições assépticas para evitar contaminação. Em seguida, cinco tiras do E-test® correspondentes aos cinco antibióticos testados foram inseridas equidistantes umas das outras, conforme demonstrado na figura 5. As placas foram incubadas por 18 horas em aerobiose a 37 °C após o que a leitura das zonas de inibição de crescimento foi realizada por dois examinadores. A concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml foi então determinada para cada antibiótico utilizado conforme prospecto do fabricante em anexo A. Em seguida, as placas foram fotografadas para arquivo.

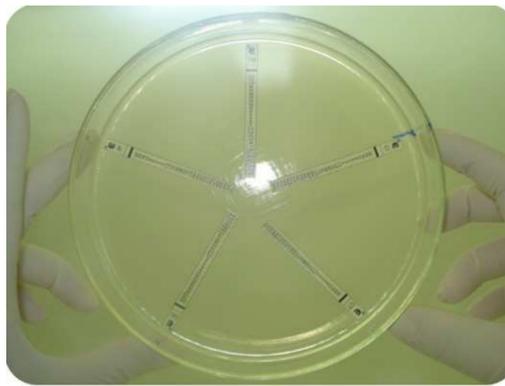


Figura 5- Distribuição das tiras do E - test® na placa de BHI Agar.

4.3.1 Capacidade de formação de biofilme das amostras

Para verificação da capacidade de formação de biofilme das amostras, 200 µl de inóculo bacteriano das amostras orais, extra – orais e ambientais foram inoculadas em 5 ml de caldo BHI e crescidos por 18 horas a 37° C em aerobiose. Em seguida, foram distribuídos 200 µl em cada poço de placas de microtitulação de 96 poços e adicionados 2 µl de inóculo bacteriano. Uma leitura em espectrofotômetro a 600 nm foi realizada e as placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 24 horas. Após esse período, o crescimento planctônico foi verificado através da leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

As culturas foram descartadas e a capacidade de formação inicial de biofilme foi quantificada adicionando 200µL de metanol por 15 minutos para fixação das bactérias à placa. A seguir, a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 200 µL de cristal violeta 1% em cada poço por 15 minutos. A placa foi lavada três vezes com água destilada e colocada sob temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, adicionou-se 200µL de álcool etílico a cada poço e, após 30minutos, 100µL da suspensão foi transferida para uma segunda placa de ELISA de fundo chato seguido de leitura em espectrofotômetro a 600nm. A adesão bacteriana foi quantificada segundo a Metodologia de O'TOOLE G.A & KOLTER em 1998.

4.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA)

A terapia antimicrobiana fotodinâmica foi realizada nas trinta amostras mais resistentes aos antibióticos pela metodologia do E-test ® (Quadro 3) crescidas tanto na forma planctônica como na forma de biofilmes.

AMBIENTAIS	ORAIS	EXTRA – ORAIS
AMB I	312 –C	341
AMB II	274 – C	480
AMB III	76-A	821
AMB IV	86-A	3202
AMB V	131-A	458
AMB VI	312-B	901
AMB VI I	387-B	CDC
AMB VIII	85-A	1103
AMB IX	124-A	3303
AMB X	240-C	4479

Quadro 3. Amostras de *Serratia marcescens* de isolados ambientais, orais e extra- orais mais resistentes aos antibióticos.

4.4.1 Fonte de luz e fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado foi o azul de orto-toluidina (Sigma, CI 52040), ilustrado na figura 7 dissolvido em água deionizada na concentração de 0,1 mg/ml estocado em frasco âmbar. A fonte de luz utilizada foi um diodo emissor de luz – LED (Laserbeam, Rio de Janeiro, Brasil) com um espectro de emissão de 620 a 660nm e comprimento de onda predominante em 638.8 nm, ilustrado na figura 6.

A luz foi distribuída por um cabo de fibra óptica com 9,5mm. A irradiação foi realizada com um foco de raio mantido a 2,0mm de distância do material tanto para as células planctônicas quanto para os biofilmes. A potência de luz LED foi de 40mW e as amostras submetidas a uma densidade de energia de 4,72 J/cm² após 5 minutos de irradiação. A densidade de energia foi calculada a partir da fórmula a seguir.

$$DE = (P \times T) / A$$

DE= densidade de energia (J/cm²)

P = potência (W)

A = área estimada (cm²)

T = segundos



Figura 6– (A) Aparelho de LED Laser Beam com um espectro de emissão de 620 a 660nm e comprimento de onda predominante 638.8 nm. (B) Aplicação do LED sob placas de cultivo.



Figura 7- Fotossensibilizador utilizado, azul de orto-toluidina (Sigma-CI 52040).

4.4.2 TFA em culturas planctônicas

A ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica foi testada para as bactérias tanto na forma planctônica como na forma de biofilme. Assim, cada uma das cepas selecionadas foi individualmente crescida em placas de cultura de tecidos e células de 24 poços em aerobiose a 37 °C por 18 horas sob agitação. A seguir, 100 µL da suspensão foi adicionada a igual volume de azul de orto-toluidina ou solução salina de NaCl a 0,9% por um tempo de pré-irradiação de 5 minutos. Decorrido o período de pré-irradiação alíquotas de 80µL das amostras foram transferidas para a tampa de microtubos de centrifuga estéreis e submetidas ao tratamento com luz ou exposição ao ar por igual período. Adicionalmente ao grupo submetido a terapia fotodinâmica antimicrobiana (com luz e com corante, L+C+) foram feitos os controles submetidos aos tratamentos sem luz e sem corante (L-C-), com luz e sem corante (L+C-) e sem luz e com corante (L-C+). Ao final dos tratamentos as suspensões foram diluídas em

série decimal de 10^{-1} a 10^{-11} em solução de NaCl 0,9% em placas de microtitulação e foram inoculadas em placas de petri contendo meios de cultura Agar MacConkey pelo método da gota e incubadas por 18h a 37°C . Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Decorrido o tempo de incubação, os microrganismos viáveis foram contados e o número de unidades formadoras de colônia por mililitro de suspensão bacteriana (UFC ml^{-1}) foi determinado.

4.4.3 TFA em biofilmes

Para a verificação da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre os biofilmes formados pelas cepas selecionadas as bactérias foram crescidas em placas de cultivo de tecidos e células de 24 poços em aerobiose a 37°C por 18 horas. A seguir, a cultura planctônica foi retirada por pipetagem e ao biofilme formado foi adicionado 2 ml de solução salina de NaCl a 0,9% ou azul de orto-toluidina por um tempo de pré-irradiação de 5 minutos. Decorrido o período de pré-irradiação os biofilmes foram submetidos ao tratamento com luz ou exposição ao ar por igual período. Adicionalmente ao grupo submetido à terapia fotodinâmica antimicrobiana (L+C+) foram feitos os controles submetidos aos tratamentos sem luz e sem corante (L-C-), com luz e sem corante (L+C-) e sem luz e com corante (L-C+). Em seguida, os poços foram sonicados utilizando um equipamento para disrupção (Branson Sonifier) com dois pulsos de 10 segundos com intervalo de 10 segundos entre eles e 10% de amplitude. Ao final dos tratamentos as suspensões foram diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-11} em solução de NaCl 0,9% e foram inoculadas em placas de petri contendo meios de cultura Agar Mac Conkey pelo método da gota e incubadas por 18h a 37°C . Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Decorrido o tempo de incubação, os microrganismos viáveis foram contados e o número de UFC ml^{-1} foi determinado.



Figura 8- Disruptor de células (Branson Sonifier)- Laboratório de Microbiologia Sobral

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Statdisk 9.1 e Biostat 3.0 com nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Inicialmente, a distribuição normal dos resultados foi verificada utilizando o teste Shapiro Wilk. A seguir, diante da confirmação da irregularidade da distribuição normal dos resultados entre os grupos, testes não paramétricos foram realizados. Assim para avaliar o teste de susceptibilidade antimicrobiana foi usado o teste Kruskal-Wallis para verificar diferenças estatísticas entre os três grupos de cepas (Ambiental, Oral e Extra – oral). Em seguida, Wilcoxon foi utilizado para comparação dos grupos dois a dois para cada droga. Para verificar a existência de diferenças estatísticas entre o grupo teste (L+C+) e os controles (L-C-, L+C-, L-C+) o teste Kruskal-Wallis foi utilizado tanto para as culturas planctônicas quanto para os biofilmes.

5 RESULTADOS

Foram analisadas 55 cepas de *S. marcescens*, sendo 10 de origem ambiental, 23 da cavidade bucal e 22 de infecções extra-orais. A curva de crescimento foi realizada com a cepa padrão CDC 4112 de *S.marcescens*, obtendo-se uma curva de crescimento típica da espécie, atingindo a fase log após 2 h de crescimento e a fase estacionária após 18h. O tempo de crescimento bacteriano e a medida das absorbâncias estão descritas no gráfico 1.

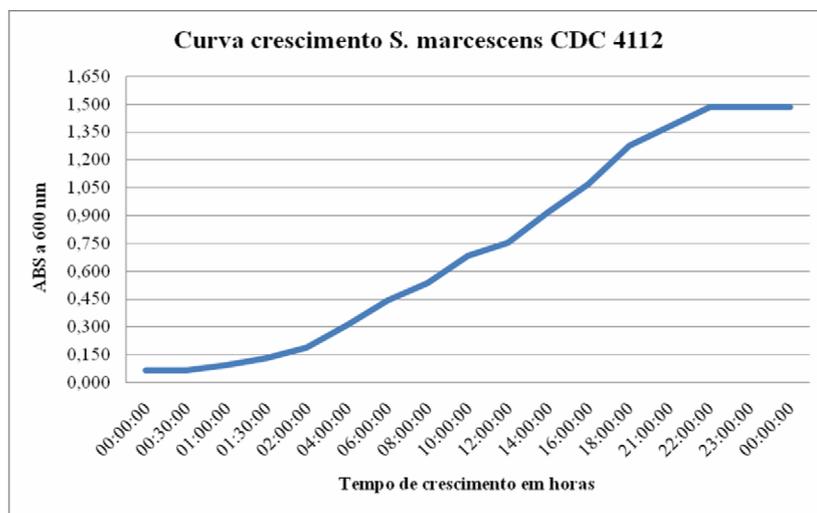


Gráfico 1. Curva de crescimento da cepa CDC 4112 determinada pela medida da absorbância a 600nm em diferentes intervalos de tempo.

O teste de susceptibilidade antimicrobiana (*E-test*) foi realizado para todas as cepas de diferentes origens com cinco antimicrobianos, ciprofloxacino (CI), cefotaxime (CT), doxiciclina (DX), imipenem (IP) e tobramicina (TM). Analisando-se a concentração inibitória mínima (CIM) desses fármacos, observamos que 14 (25,45%) isolados, independentemente da origem, apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, enquanto apenas um isolado (1,81%) de infecção extra-oral apresentou resistência a dois antimicrobianos de acordo com a tabela 1, página 55.

Tabela 1- Teste de suscetibilidade pelo E – test ® para os cinco antimicrobianos testados.

Cepa	Grupo	CT	TM	DX	IP	CI
I	Ambiental	S	S	I	S	S
II	Ambiental	S	S	I	S	S
III	Ambiental	S	S	I	S	S
IV	Ambiental	S	S	S	S	S
V	Ambiental	S	S	I	S	S
VI	Ambiental	S	S	I	S	S
VII	Ambiental	S	S	R	S	S
VIII	Ambiental	S	S	R	S	S
IX	Ambiental	S	S	R	S	S
X	Ambiental	S	S	I	S	S
131-A	Oral	S	S	R	S	S
274-A	Oral	S	S	I	S	S
274-C	Oral	S	S	I	S	S
76-A	Oral	S	S	R	S	S
387-C	Oral	S	S	R	S	S
307-A	Oral	S	S	S	S	S
32-B	Oral	S	S	S	S	S
312-B	Oral	S	S	R	S	S
54-A	Oral	S	S	I	S	S
312-C	Oral	S	S	R	S	S
387-B	Oral	S	S	I	S	S
385-C	Oral	S	S	S	S	S
338-C	Oral	S	S	S	S	S
86-A	Oral	S	S	S	S	S
85-A	Oral	S	S	R	S	S
124-A	Oral	S	S	S	S	S
26-B	Oral	S	S	S	S	S
217-C	Oral	S	S	S	S	S
240-C	Oral	S	S	I	S	S
130	Oral	S	S	S	S	S
273-C	Oral	S	S	I	S	S
274-B	Oral	S	S	I	S	S
217-A	Oral	R	S	S	S	S
3963	Extra-Oral	S	S	I	S	R
341	Extra-Oral	S	S	R	S	S
636	Extra-Oral	S	S	S	S	S
480	Extra-Oral	S	S	I	S	S
821	Extra-Oral	S	S	I	S	S
3202	Extra-Oral	S	S	I	S	S
458	Extra-Oral	S	S	R	S	S
3838	Extra-Oral	S	S	I	S	S
10	Extra-Oral	S	S	R	S	S
266	Extra-Oral	S	S	I	S	S
901	Extra-Oral	S	R	R	S	S
CDC	Extra-Oral	S	S	I	S	S

Cepa	Grupo	CT	TM	DX	IP	CI
Karol	Extra-Oral	S	S	S	S	S
833	Extra-Oral	S	S	S	S	S
1103	Extra-Oral	S	S	I	S	S
654	Extra-Oral	S	S	I	S	S
3303	Extra-Oral	S	S	I	S	S
380	Extra-Oral	S	S	S	S	S
WF	Extra-Oral	S	S	S	S	S
631	Extra-Oral	S	S	I	S	S
4479	Extra-Oral	S	S	S	S	S
651	Extra-Oral	S	S	S	S	S

S= sensível; I= sensibilidade intermediária; R = resistente. CT(0,002-32µg/ml), TM(0,016-256µg/ml), DX(0,016-256µg/ml), IP(0,032-32µg/ml), CI(0,002-32µg/ml). Os valores de susceptibilidade (µg/ml) foram interpretados de acordo com as normas do NCCLS (2003): cefotaxima (CT) $S \leq 8, 16 \leq I \leq 32, R \geq 64$; tobramicina (TM) $S \leq 4, I = 8, R \geq 16$; doxiciclina (DX) $S \leq 4, I = 8, R \geq 16$; imipenem (IP) $S \leq 4, I = 8, R \geq 16$; ciprofloxacino (CI) $S \leq 1, I = 2, R \geq 4$.

Em relação aos diferentes antimicrobianos, observamos que das 55 cepas analisadas, 13 (23,63%) apresentaram resistência à doxiciclina, mas apenas um (1,81%) isolado apresentou resistência ao ciprofloxacino, outro à tobramicina e outro à cefotaxima; 24 (43,63%) cepas apresentaram sensibilidade intermediária à doxiciclina, todas foram sensíveis ao imipenem e a maioria foi sensível ao ciprofloxacino, à tobramicina e à cefotaxima de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Perfil de resistência dos 55 isolados de *S. marcescens* de diferentes origens em relação aos todos os antimicrobianos

<i>S. marcescens</i> n = 55	CI	IP	TM	CT	DX
S	54 (98,19%)	55 (100%)	54 (98,19%)	54 (98,19%)	18 (32,72%)
I	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	24 (43,63%)
R	1 (1,81%)	0 0%	1 (1,81%)	1 (1,81%)	13 (23,63%)

Contudo, o perfil de resistência às drogas foi diferente quando comparados os isolados ambientais, orais e extra – orais de *Serratia marcescens*.

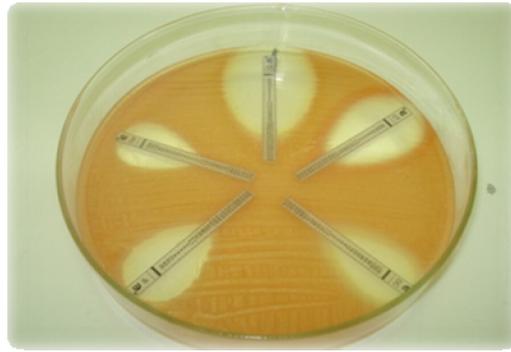


Figura 9. Formação do halo de inibição distribuídos em placa de BHI agar.

Analisando a suscetibilidade dos isolados ambientais, observamos que das dez cepas estudadas, 3 (30%) apresentaram resistência à doxiciclina. Para todas as outras drogas antimicrobianas analisadas, esse grupo de bactérias apresentou sensibilidade de acordo com a tabela 3, página 58.

Todas as 23 cepas da cavidade bucal analisadas apresentaram sensibilidade ao imipenem, tobramicina e ciprofloxacino. Em relação à cefotaxima, 22 (95,65%) apresentaram sensibilidade e apenas um isolado (4,35%) foi resistente (Tabela 3, página 58). Enquanto para a doxiciclina, obteve-se 43,5%, 30,5% e 26,0% de sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência, respectivamente.

Todos os isolados de infecções extra-orais foram sensíveis ao imipenem e à cefotaxima. Em relação ao ciprofloxacino e à tobramicina, apenas um (4,5%) isolado apresentou resistência à CI e outro à TM. A análise da concentração inibitória mínima nos permite afirmar que quatro (18,18%) cepas extra-orais apresentaram-se resistentes à doxiciclina (Tabela 3, página 58), onze (50%) apresentaram sensibilidade intermediária e sete (31,81%) foram sensíveis.

Tabela 3. Teste de susceptibilidade pelo E-test para antimicrobianos

Ambientais (n=10)	CI	IP	TM	CT	DX
S	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	1 (10%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)
R	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)
Orais (n=23)	CI	IP	TM	CT	DX
S	23 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	22 (95,65%)	10 (43,5%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (30,5%)
R	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,35%)	6 (26,0%)
Extra-orais (n=22)	CI	IP	TM	CT	DX
S	21 (95,5%)	22 (100%)	21 (95,5%)	22 (100%)	7 (31,81%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (50%)
R	1 (4,5%)	0 (0%)	1 (4,5%)	0 (0%)	4 (18,18%)

Dados absolutos seguidos das porcentagens de cepas que se apresentaram sensíveis(S), intermediárias(I) ou resistentes(R) aos antibióticos testados.

Ao analisar o perfil de resistência das cepas extra-orais de acordo com a distribuição e origem clínica (Quadro 2, página 45), constatamos que a cepa 901, isolada de secreção de ferimento, foi multiresistente, apresentando resistência à tobramicina e à doxiciclina. Enquanto, as cepas 458 e 10 ambas provenientes de infecções do trato urinário e a cepa 341 proveniente de infecção de orofaringe, apresentaram resistência apenas à doxiciclina, e a cepa 3963 também isolada de infecção do trato urinário apresentou resistência ao ciprofloxacino.

Dos isolados extra-orais que apresentaram resistência aos antimicrobianos analisados, 3 (60%) eram oriundos de infecção do trato urinário, 1 (20%) de infecção da orofaringe e 1 (20%) de secreção de ferimento (Gráfico 2, página 59).

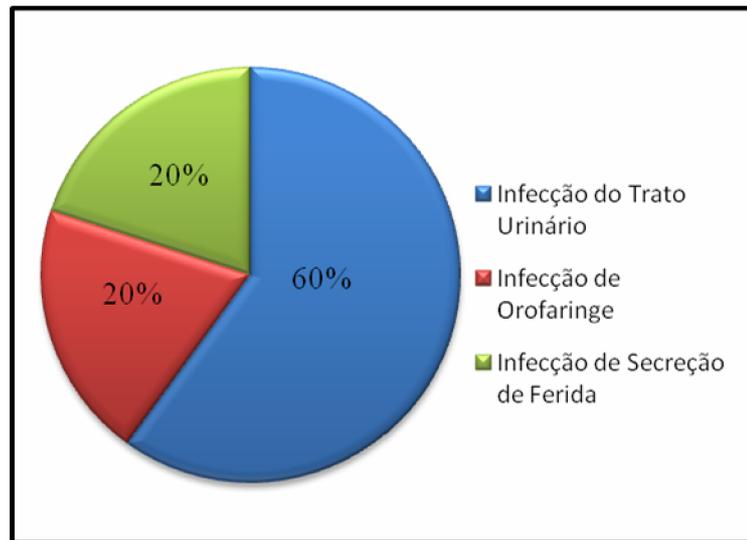


Gráfico 2. Demonstração da incidência de cepas extra-orais resistentes de acordo com a origem clínica.

Ao compararmos os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de doxiciclina, imipenem e cefotaxima para os isolados de diferentes origens não observamos diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) como mostram os gráficos 3, 5 e 6 respectivamente.

Por outro lado, ao compararmos os valores de CIM do ciprofloxacino (Gráfico 3, página 60) em relação às cepas ambientais e extra-orais, observamos diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Contudo, esta comparação quando feita entre os isolados orais e extra-orais não se observou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Em relação aos valores de CIM da tobramicina (Gráfico 5, página 61), na comparação entre os isolados ambientais e orais e entre orais e extra-orais houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Todavia, quando comparados os valores de CIM entre as cepas ambientais e extra-orais não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

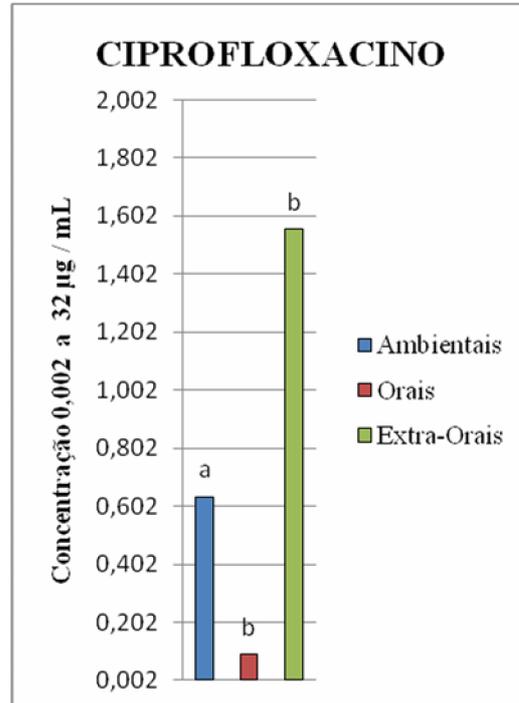


Gráfico 3. Susceptibilidade das cepas ao ciprofloxacino. Concentração inibitória mínima (CIM) com concentração média dos isolados ambientais 0,635; orais 0,091 e extra- orais 1,556. Valor de referência da droga 0,002 a 32µg/ml. Letras diferentes significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

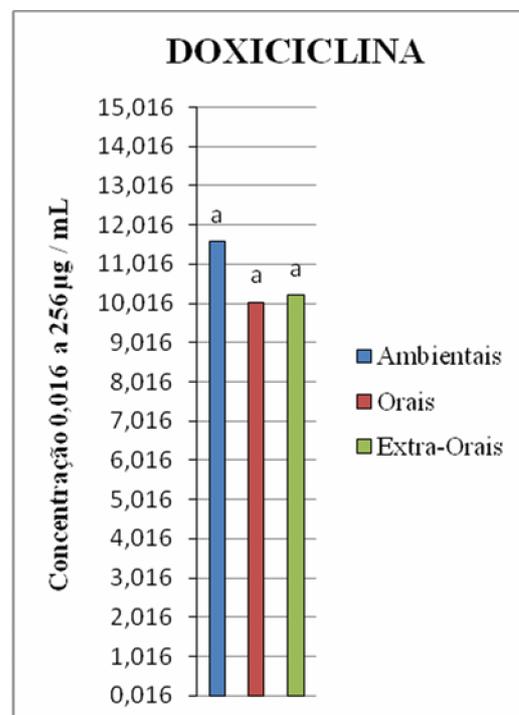


Gráfico 4. Susceptibilidade das cepas à doxiciclina. Concentração inibitória mínima (CIM) com concentração média dos isolados ambientais 11,6; orais 10,04 e extra-orais 10,22. Valor de referência da droga 0,016 a 256µg/ml. Letras diferentes significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

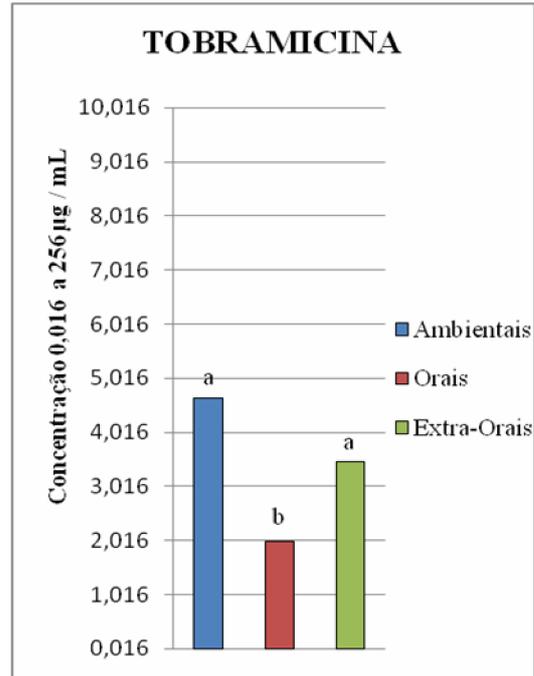


Gráfico 5. Susceptibilidade das cepas a tobramicina. Concentração inibitória mínima (CIM) com concentração média dos isolados ambientais 4,63 ; orais 2,0; extra- orais 3,47. Valor de referência da droga 0,016 a 256µg/ml. Letras diferentes significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

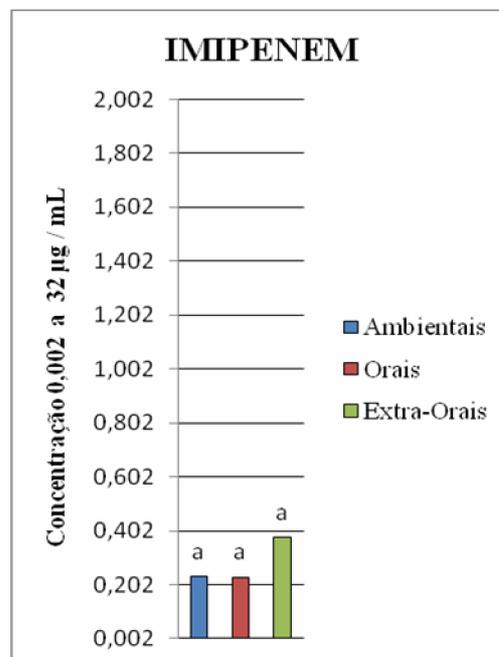


Gráfico 6. Susceptibilidade das cepas ao imipenem. Concentração inibitória mínima (CIM) com concentração média dos isolados ambientais 0,233; orais 0,230; extra- orais 0,376. Valor de referência da droga 0,002 a 32µg/ml. Letras diferentes significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

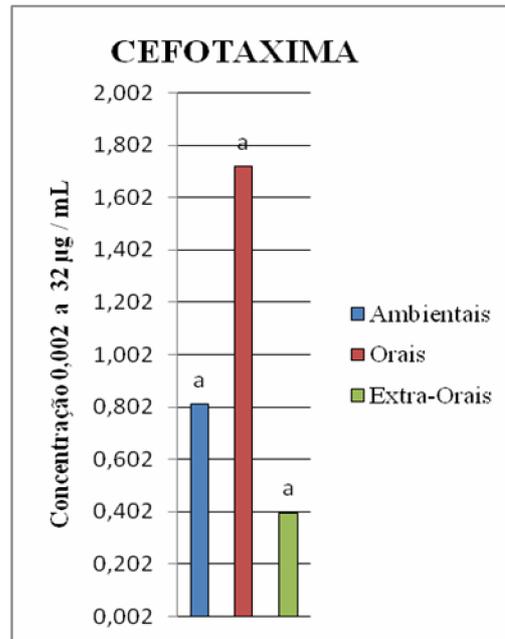


Gráfico 7. Susceptibilidade das cepas a cefotaxima. Concentração inibitória mínima (CIM) com concentração média dos isolados ambientais 0,814; orais 1,720; extra- orais 0,399. Valor de referência da droga 0,002 a 32µg/ml. ($P < 0,05$).

Analisando os grupos farmacológicos em relação às cepas de diferentes origens verificamos que 98,18% foram sensíveis ao ciprofloxacino (Fluoroquinolonas), à tobramicina (Aminoglicosídeo), à cefotaxima (Cefalosporina) e todas foram sensíveis ao imipenem (Carbapenêmico). No entanto, em relação à doxiciclina (Tetraciclina) apenas 32,7% das cepas foram sensíveis, havendo isolados resistentes de todas as origens, ambiental, oral e extra-oral de acordo com a tabela 4 e figuras 10, 11 e 12.

Tabela 4. Perfil de sensibilidade de todas as cepas estudadas aos diferentes antimicrobianos.

	β - Lactâmicos	Fluoroquinolona	Aminoglicosídeo	Tetraciclina
Cepas Sensíveis	Cefotaxima	Ciprofloxacino	Tobramicina	Doxiciclina
	98,1%	98,1%	98,1%	32,7%
	Imipenem			
	100%			

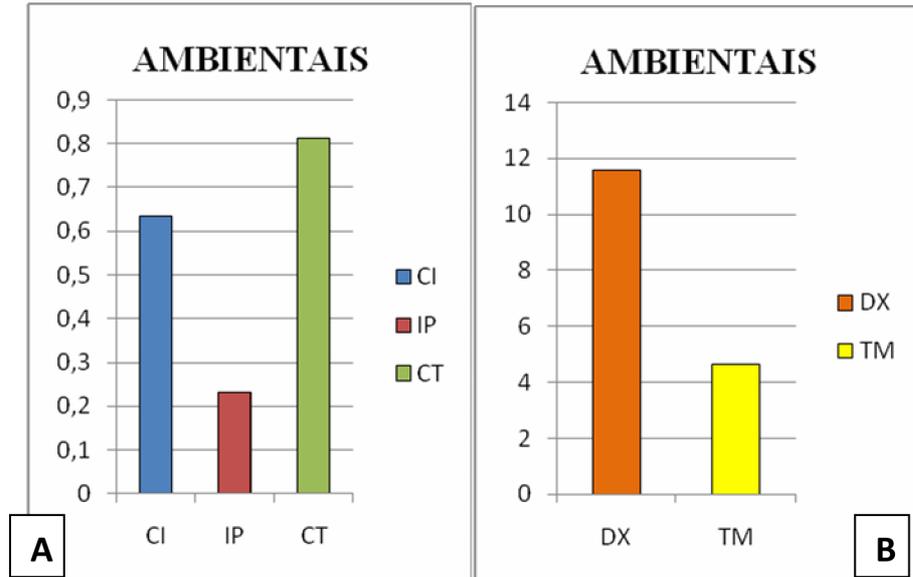


Figura 10- Gráficos do perfil de resistência das cepas Ambientais aos Agentes Antimicrobianos. Gráfico A apresenta a Concentração inibitória mínima (MIC) com concentração média dos isolados ambientais para o CI: 0,6348; IP: 0,233; CT: 0,8135. Valor de referência das drogas 0,002 a 32 μ g/ml. Gráfico B apresenta a Concentração inibitória mínima (MIC) com concentração média dos isolados ambientais para a DX: 11,6; TM: 4,638. Valor de referência das drogas 0,016 a 256 μ g/ml. ($P < 0,05$) CI: Ciprofloxacin, IP: Imipenem, CT: Cefotaxim; DX: Doxicilina; TM: Tobramicina.

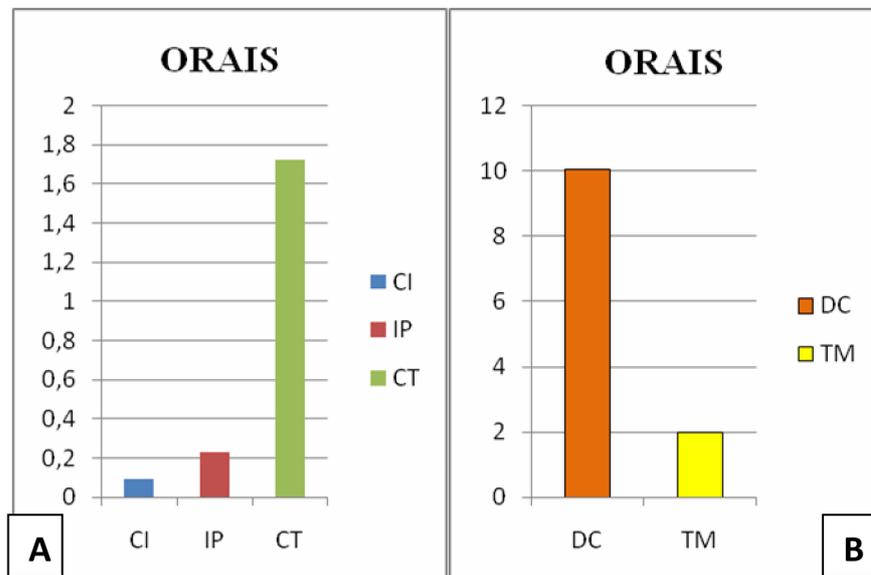


Figura 11- Gráficos do perfil de resistência das cepas Oraís aos Agentes Antimicrobianos. Gráfico A apresenta a Concentração inibitória mínima (MIC) com concentração média dos isolados orais para o CI: 0,0914; IP: 0,229; CT: 1,720. Valor de referência das drogas 0,002 a 32 μ g/ml. Gráfico B apresenta a Concentração inibitória mínima (MIC) com concentração média dos isolados orais para a DX: 10,04; TM: 2. Valor de referência das drogas 0,016 a 256 μ g/ml. ($P < 0,05$) CI: Ciprofloxacin, IP: Imipenem, CT: Cefotaxim; DX: Doxicilina; TM: Tobramicina.

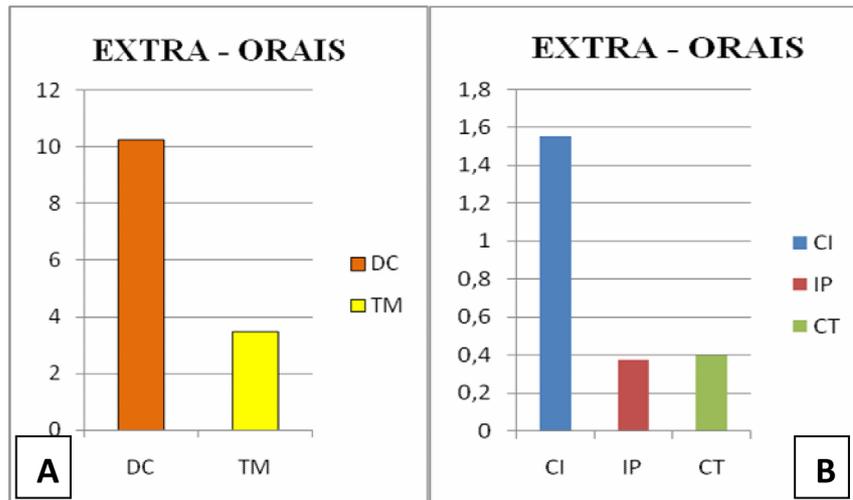


Figura 12- Gráficos do perfil de resistência das cepas Extra - Oraís aos Agentes Antimicrobianos. Gráfico A apresenta a Concentração inibitória mínima (MIC) com concentração média dos isolados extra - orais para o CI: 1,555; IP: 0,3761; CT:0,3989. Valor de referência das drogas 0,002 a 32 μ g/ml. Gráfico B apresenta a Concentração inibitória mínima (MIC) com concentração média dos isolados extra - orais para a DX: 10,227; TM: 3,4. Valor de referência das drogas 0,016 a 256 μ g/ml. (P < 0,05) CI: Ciprofloxacina, IP: Imipenem, CT: Cefotaxima; DX: Doxicilina; TM: Tobramicina.

Os efeitos antimicrobianos da fotossensibilização das culturas planctônicas e biofilme de isolados ambientais, orais e extra-orais de *Serratia marcescens* são mostrados na figura 13, página 65. A irradiação das culturas planctônicas e biofilmes na ausência de TBO (L+C-), a incubação com TBO sozinho (L-C+) e o grupo controle não tratado (L-C-) não apresentou efeitos significativos na viabilidade das cepas de *S. marcescens* estudadas ($p < 0,05$). Decréscimos significativos na viabilidade bacteriana foram observados somente quando cultura planctônica e biofilme de cepas ambientais, orais e extra-orais de *S. marcescens* foram expostos ao TBO e luz LED ao mesmo tempo (L+C+). Reduções significativas nas contagens médias de viabilidade de $1,46 \times 10^{11}$ a $5,8 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ para cultura planctônica de cepas ambientais, $9,54 \times 10^{10}$ a $6,06 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ para cepas orais e $1,19 \times 10^{11}$ a $5,5 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ para cepas extra-orais de *S. marcescens* foram observadas após a terapia fotodinâmica antimicrobiana (Figura 13, página 65). Os biofilmes de cepas ambientais, orais e extra-orais de *S. marcescens* também foram susceptíveis ao TFA com reduções nas contagens de viabilidade de $4,57 \times 10^{10}$ a $3,51 \times 10^7$ UFC mg⁻¹ para cepas ambientais, $2,79 \times 10^{10}$ a $2,83 \times 10^7$ UFC mg⁻¹ para cepas orais e $3,34 \times 10^{10}$ a $2,75 \times 10^7$ UFC mg⁻¹ para cepas extra-orais de *S. marcescens*. Não foram observadas diferenças estatísticas na redução de viabilidade observada nos grupos submetidos ao TFA quando as culturas planctônicas e biofilmes iniciais foram comparados ($p < 0,05$).

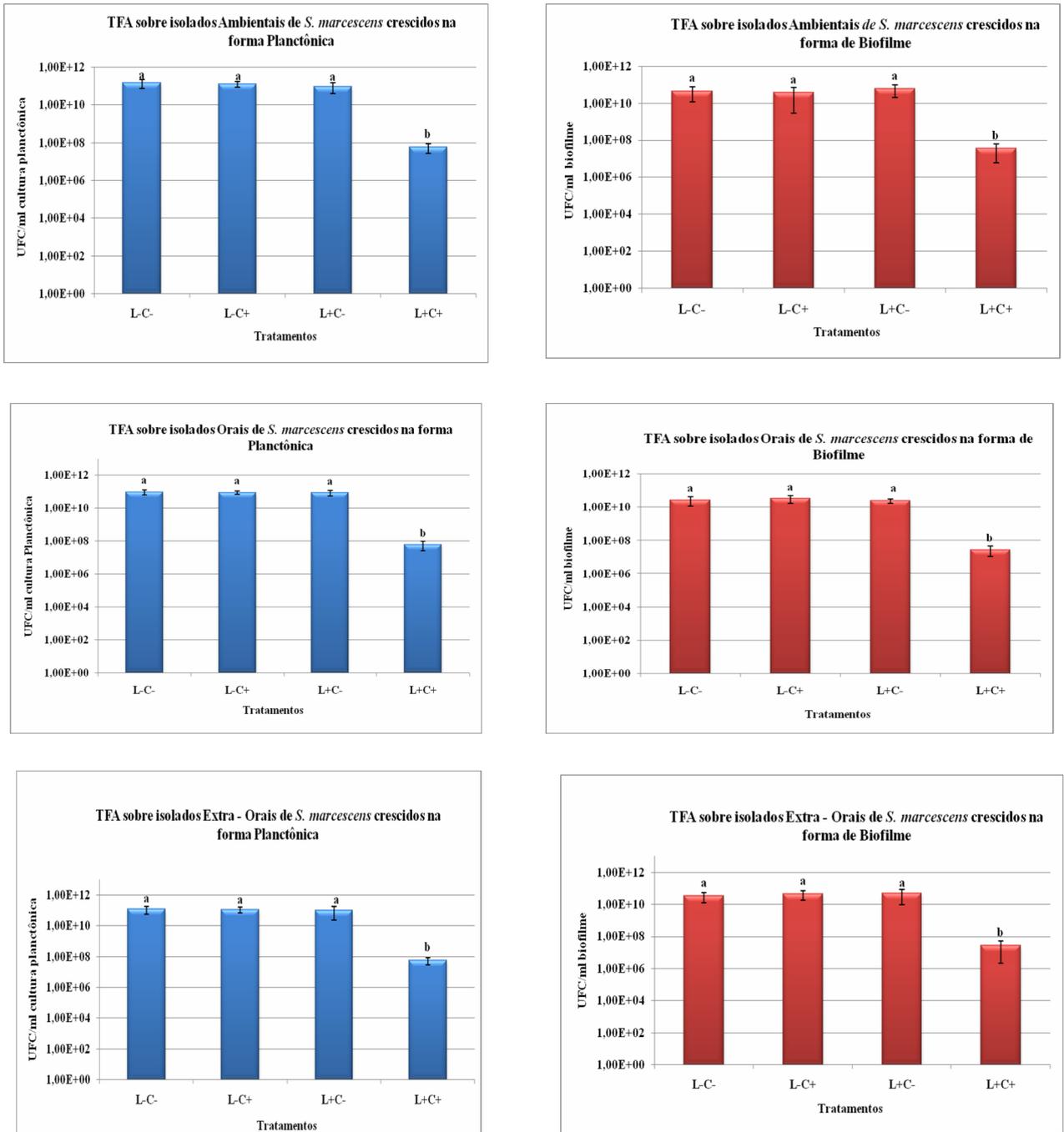


Figura 13- Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana a partir da associação do azul de orto- toluidina (TBO) e diodo emissor de luz (L+C+) em culturas planctônicas e biofilme iniciais formados por cepas ambientais, orais e extra-orais de *Serratia marcescens* comparado com os controles (L-C-), (L+C-) e (L-C+).

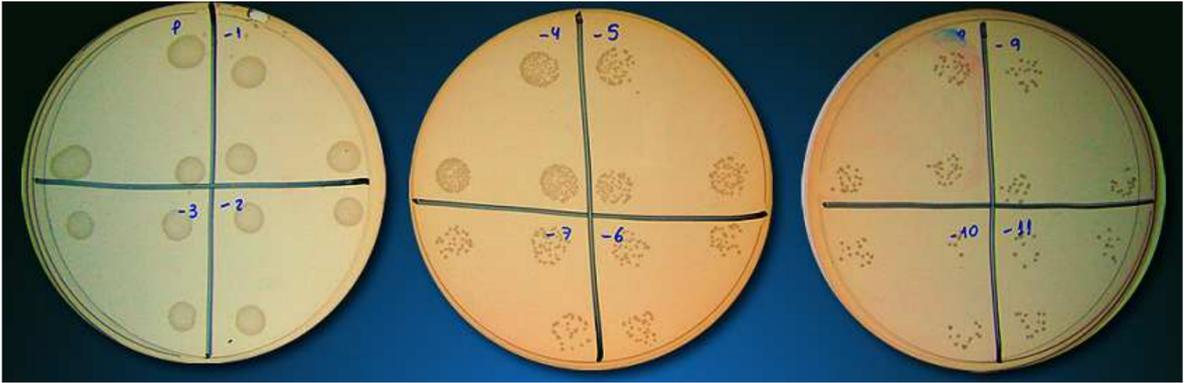


Figura 14- Imagem característica da contagem microbiológica observada nos grupos controles (L+C-), (L-C-), (L-C+) da cepa oral 86-A de *S. marcescens* crescidos na forma de biofilmes usando a técnica da gota em placas de BHI Agar.

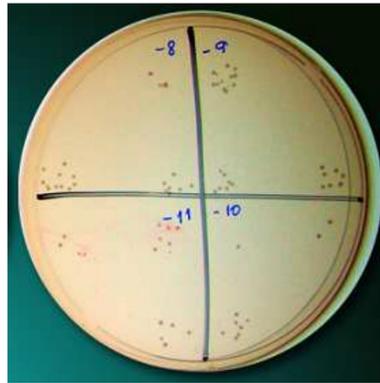


Figura 15- Contagem microbiológica após o TFA (L+C+) da cepa oral 86-A de *S. marcescens* crescida na forma de biofilme usando a técnica da gota em placa de BHI Agar.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos uma típica curva de crescimento bacteriano de *Serratia marcescens*. Foi realizada uma observação minuciosa das fases lag, log e estacionária, uma vez que a fase de morte celular não nos interessava. De acordo com Tortora (2005), a fase lag, em que ocorre pouca divisão celular e intensa atividade metabólica, pode durar uma hora ou até mesmo vários dias o que está de acordo com nossos resultados, nos quais obtivemos a fase lag após 2 horas de experimento.

Durante a fase log, também denominada fase de crescimento exponencial, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e o tempo de geração atinge um valor constante, daí o gráfico logarítmico dessa fase de crescimento ser uma linha reta. O tempo de duração dessa fase em nosso experimento foi de 18 horas, enquanto Barbosa (2005) encontrou 19 horas realizando a curva de crescimento sob as mesmas condições. Essa diferença pode ser considerada normal, encontrando-se dentro da faixa do desvio padrão de erro. Essa fase log é o período de maior atividade metabólica da célula, sendo o estágio preferido para fins industriais, pois o produto necessário seria produzido eficientemente (TORTORA, 2005). No entanto, os microorganismos podem ser particularmente sensíveis a muitos dos compostos antimicrobianos nesta fase de crescimento devido a alta taxa de metabolismo que favorece a captação da droga pelo microrganismo.

Foi exatamente no final da fase log e início da fase estacionária – 18 horas, que realizamos o E-test® e obtivemos o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) ideais para realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos ($1-3 \times 10^8$ UFC/ml), objetivo principal da nossa curva de crescimento. A fase estacionária inicia no momento em que a velocidade de crescimento diminui, o número de morte celular é equivalente ao número de células novas, e a população se torna estável. Entre os principais fatores relacionados temos a escassez de nutrientes e acúmulo de produtos de degradação que acabam por diminuir a taxa de metabolismo microbiano diminuindo dessa forma a captação de drogas pelos microrganismos. Por essa razão, alguns autores correlacionam a susceptibilidade das bactérias a drogas antimicrobianas nessa fase como sendo o mais próximo do observado em biofilmes (DONLAN e COSTERTON *et al.*, 2002).

Resistência antimicrobiana é a mais grave ameaça emergente para a saúde pública. Infecções devido a bactérias resistentes a antibióticos causam considerável mortalidade, assim como significantes custos nos cuidados com saúde e menor produtividade (Maragakis et al., 2008). Neste estudo, analisando a concentração inibitória mínima de antimicrobianos, observamos que os isolados de *Serratia marcescens* independentemente da origem apresentaram uma maior resistência à doxiciclina do que aos demais fármacos testados, surpreendentemente 30% dos isolados ambientais apresentaram resistência a essa droga, enquanto 26% dos isolados da cavidade bucal e apenas 18,18% das cepas de infecções extra-orais foram resistentes à doxiciclina. Diferentemente, Traub (2000) analisando a suscetibilidade antimicrobiana de 1.603 isolados clínicos de *S. marcescens* através da difusão em disco (Kirby-Bauer) observou um aumento na suscetibilidade à doxiciclina e uma diminuição na suscetibilidade dos isolados ao ciprofloxacino. Enquanto Stock *et al.* (2003) relataram uma menor suscetibilidade deste microrganismo aos aminoglicosídeos e natural resistência à tetraciclina, amoxicilina e amoxicilina associada ao ácido clavulânico. Este fato é preocupante uma vez que na clínica médica e odontológica diária esses antimicrobianos são prescritos com frequência.

As tetraciclinas têm sido tradicionalmente os antibióticos mais usados no tratamento das periodontites, são agentes bacteriostáticos de largo espectro, que inibem a síntese protéica pelo bloqueio da translação do RNAm.. Existem relatos de que a doxiciclina está mais concentrada no fluido do sulco gengival do que no soro, fornecendo concentrações maiores do medicamento no sítio local da inflamação. Provavelmente, a característica mais significativa da doxiciclina seja a capacidade de inibir as collagenases teciduais e outras metaloproteinases da matriz, sendo um auxílio no processo de cicatrização periodontal após o tratamento. Tendo sido esse fármaco até então, descrito como menos problemático em relação à evidência de resistência dentro da microbiota periodontal (ROSE *et al.*, 2007).

A maioria dos isolados de *S. marcescens* analisados neste estudo, independentemente da origem foram suscetíveis ao Ciprofloxacino, esses achados corroboram os dados observados por Barbosa (2005) que também analisou isolados desta bactéria de diferentes origens, tendo encontrado 96,38% de suscetibilidade a esta droga. Desde a introdução do ácido nalidíxico, em 1960, o antibiótico ciprofloxacino é considerado, entre a classe das quinolonas, o agente antimicrobiano mais consumido em todo mundo (CHENIA, 2006). Atualmente, estão sendo estudados genes plasmidiais que codificam proteínas que

protegem o DNA bacteriano impedindo a ação de quinolonas principalmente em cepas de ambiente hospitalar (DARINI, 2009).

Até meados de 1990, a resistência às quinolonas esteve presente em menos de 1% de enterobactérias isoladas na Europa e EUA (BAQUERO, 1990). Entretanto, esse perfil vem mudando nos últimos anos. O Brasil tem uma das mais altas percentagens de resistência às quinolonas entre os países da América Latina (SADER *et al.*, 2004).

Biendenbach *et al.* (2006), em um estudo realizado pelo “SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*” que analisou dados sobre o perfil de sensibilidade de vários patógenos isolados em países da América Latina, revelaram que a percentagem de resistência ao ciprofloxacino foi mais alta na América Latina (15%) comparada à América do Norte (6,3%), sendo considerada mais alta no México (50%) e no Brasil (33,6%). Confirmando este dado, Pereira *et al.* (2007) reportaram aumento significativo na taxa de resistência às quinolonas em um centro médico brasileiro, entre 2002 e 2003, que pode estar relacionado com aumento do uso deste medicamento nas infecções adquiridas na comunidade.

Em estudo realizado no Japão, Okimoto *et al.* (2005) observaram que o uso clínico de ciprofloxacino intravenoso em pacientes com pneumonia adquirida em ambiente hospitalar causada por *S. marcescens* apresentou uma taxa de eficiência de 65,6%, sendo portanto, a droga de escolha no tratamento dessas infecções. É notória a diferença do perfil de resistência antimicrobiana em diversas regiões e isso se deve a existência de políticas sérias voltadas para o uso racional de medicamentos.

Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação à suscetibilidade ao ciprofloxacino entre as cepas isoladas de diferentes origens, observamos uma menor suscetibilidade (95,5%) entre os isolados de infecções extra-orais comparados aos isolados do ambiente e do biofilme dentário, cuja totalidade das cepas foram suscetíveis a este fármaco. Neste estudo, a cepa resistente ao ciprofloxacino foi isolada de infecção do trato urinário (3963), Kim *et al.* (2006) ao analisarem a suscetibilidade de cepas de *S. marcescens* isoladas de infecção do trato urinário responsáveis por um surto em unidade de cuidados intensivos neurocirúrgica, também relataram presença de uma única cepa resistente ao ciprofloxacino. Por outro lado, Shih *et al.* (2005) observaram apenas 19% de suscetibilidade a essa droga entre isolados nosocomiais de *S. marcescens*.

Nossos dados estão de acordo com os Patzer *et al.* (2008), que relataram uma diminuição de suscetibilidade ao ciprofloxacino entre isolados clínicos de *S. marcescens* (86%) obtidos de crianças hospitalizadas em UTI, tendo encontrado susceptibilidade maior que 90% para as demais espécies de enterobactérias isoladas.

Em relação à Cefotaxima, a taxa de suscetibilidade encontrada neste estudo foi bastante elevada (98,18%), havia apenas um isolado oral (1,81%) resistente a esse antimicrobiano. Diferentemente, Shih *et al.* (2005) relataram baixa taxa de suscetibilidade à cefotaxima (9%) entre os isolados de *S. marcescens* de infecções nosocomiais.

As β – lactamases, enzimas capazes de clivar o sítio de ação dos β – lactâmicos, representam a maior ameaça à utilização terapêutica dessa classe de antimicrobianos (HAWKEY, 2008). O uso abusivo das cefalosporinas de amplo espectro, dentre elas a cefotaxima, em meados dos anos 80 favoreceu a seleção de bactérias produtoras de β - lactamases de espectro ampliado ESBL (PATERSON *et al.*, 2005). As enzimas CTX-M estão concentradas em certas áreas como América do Sul e algumas regiões da Europa (PALLECHI *et al.*, 2007).

As enzimas CTX-M têm sido detectadas em isolados clínicos, em bactérias comensais de humanos e animais e em produtos alimentícios e esgoto. Estas enzimas conferem maior resistência à cefotaxima e apresentam distribuição abrangente, sugerindo a presença de reservatórios ambientais destes determinantes de resistência (DARINI *et al.*, 2009). Em contrapartida, nossas amostras ambientais apresentaram 100% de sensibilidade. Encontramos uma maior taxa de resistência a cefotaxima para os isolados orais (4,5%), portanto esses isolados podem não estar associados ao consumo de água ou alimentos contaminados. Barbosa *et al.* (2006) demonstraram que isolados orais de *S. marcescens* apresentam maior similaridade genotípica com isolados de infecções extra-orais do que com isolados ambientais, podendo a cavidade bucal servir como reservatório de cepas capazes de causar severas infecções sistêmicas.

Na década de 90, o surgimento de bactérias produtoras de carbapenemases (KPCs) passou a ser observado, provavelmente como resposta a maior utilização de carbapenens na prática clínica (WALTHET - RASMUSSEN *et al.*, 2007). A emergência de isolados clínicos de enterobactérias resistentes aos carbapenens é o novo padrão de resistência observado entre os bacilos Gram-negativos (NORDMANN *et al.*, 2002). Em estudo recente

realizado na Turquia, Ekrem *et al.* (2009) verificaram a falha no tratamento com Imipenem em neonatos com sepsis por *Serratia marcescens* em UTI. Diferentemente, nossos achados demonstraram 100% de sensibilidade ao imipenem entre os isolados de *S. marcescens* com MIC < 2 µg/ml. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Patzer *et al.* (2008) e Kim *et al.* (2006) que encontraram 100% de sensibilidade ao imipenem em isolados de *S.marcescens* responsáveis por surtos em UTIs.

Analisamos também a CIM de tobramicina frente aos isolados clínicos e ambientais de *S. marcescens* e observamos uma suscetibilidade três vezes maior do que a relatada por Patzer *et al.* (2008) que analisaram isolados clínicos desta bactéria oriundos de UTI pediátrica. Nossos resultados também foram superiores ao encontrados por Tsai *et al.* (2007) ao analisarem a sensibilidade de isolados nosocomiais deste organismo, que descreveram 65% de suscetibilidade à tobramicina. Brito *et al.* (2000) e Traub (2000) também observaram um aumento na suscetibilidade de *S. marcescens* à tobramicina, enquanto Doi *et al.* (2004) relataram alto nível de resistência a aminoglicosídeos, incluindo tobramicina em isolados clínicos deste organismo.

Os aminoglicosídeos são usados extensivamente na prática clínica, apresentando boa atividade contra bacilos Gram-negativos aeróbios, incluindo *Enterobacteriaceae* e bacilos Gram- negativos não fermentadores. Entretanto, cepas resistentes a esses agentes, ambos por redução ou aumento da permeabilidade celular através de enzimas, têm se expandido nos últimos vinte anos levando a necessidade de drogas mais potentes (TSAI *et al.*, 2006).

Proteção ribossomal por metilação de 16S RNAr é conhecido como o principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos entre organismos produtores de metilase, como *Streptomyces* spp. e *Micromonaspora* spp. Embora a produção de 16S RNAr metilase confira alto nível de resistência a aminoglicosídeos pelos organismos produtores, é pensado que este mecanismo esteja confinado a espécies bacterianas ambientais sem relevância clínica. Contudo, Doi *et al.* (2004) identificaram cepa clínica de *S. marcescens* produtora de 16S rRNA metilase, esta nova enzima RmtB conferiu alto nível de resistência a vários aminoglicosídeos.

No nosso estudo, apenas uma (1,81%) cepa oriunda de infecção extra-oral (secreção de ferimento) apresentou resistência à tobramicina, pode ser que esta resistência também esteja associada à produção de metilase. Adicionalmente, esta mesma cepa foi

resistente a doxiciclina. Kim *et al.* (2006) também relataram isolados nosocomiais deste organismo que apresentaram resistência a múltiplos antibióticos, incluindo aminoglicosídeos e cefalosporinas.

A análise da literatura nos permite afirmar que enquanto *S. marcescens* pode ser raramente detectada em indivíduos saudáveis, pacientes hospitalizados podem ser colonizados ou infectados por esta espécie. Muito frequentemente, essa bactéria causa infecções no trato respiratório de pacientes entubados, infecções no trato urinário de pacientes com cateteres, infecções em feridas cirúrgicas, superinfecções, osteomielite e septicemia em pacientes com cateterização intravenosa (HURRELL *et al.*, 2009).

De acordo com Zanin e colaboradores (2006), biofilme microbiano é uma comunidade de microorganismos aderida a uma superfície, usualmente envolta por uma matriz de polissacarídeos. O ambiente hospitalar oferece uma série de subsídios a formação de biofilmes como a instrumentação invasiva. Estima-se que 60% das infecções bacterianas envolvam biofilmes e a maioria das infecções hospitalares está relacionada a biofilmes em cateteres médicos (TORTORA, 2005).

No presente estudo, observamos que *S. marcescens* isolados do ambiente, de infecções orais e infecções extra-orais foram capazes de crescer de forma planctônica e como biofilmes iniciais em placas de poliestireno conforme metodologia descrita por Di Poto e colaboradores (2009). A comparação do crescimento entre as cepas de diversas origens demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre elas, tanto para o crescimento na forma planctônica quanto para os biofilmes.

Em face do generalizado e crescente aumento da resistência de patógenos bacterianos a terapêuticos e terapias antimicrobianas comuns, a necessidade de alternativas eficientes e tratamentos acessíveis à infecções e doenças causadas por esses patógenos vem se tornando imperativa (WINCKLER, 2007). A natureza estrutural do biofilme e seus atributos fisiológicos como atraso na penetração do antimicrobiano através da matriz do biofilme, dentre outros, conferem uma inerente resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN e COSTERTON, 2002; RICE *et al.*, 2005; DAI *et al.*, 2010). A terapia fotodinâmica antimicrobiana aparece nesse contexto, com redução da possibilidade de surgimento de resistência microbiana, uma vez que o dano ou morte bacteriana é obtido em curto período de tempo (WAINWRIGHT *et al.*, 2003) através da ação de oxigênios moleculares reativos

gerados nas reações fotoquímicas, os quais podem interagir com proteínas mitocondriais da célula alvo alterando sua estrutura e atividade, provocar desnaturação de proteínas e lipídios da membrana e modificar a estrutura do DNA celular (MITRA, 2004).

A aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em nosso trabalho foi capaz de matar cepas sensíveis e resistentes a drogas antimicrobianas discutidas anteriormente, crescidas tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme inicial. Esses achados corroboram com outros autores, mesmo trabalhando com outras espécies bacterianas.

Muitos estudos avaliam o efeito antimicrobiano da TFA envolvendo o uso de lasers convencionais em diferentes comprimentos de onda. A opção de usar o LED é devido principalmente a vantagem econômica quando comparada com a fotossensibilização usando o laser convencional. Adicionalmente, a menor colimação e coerência observada nesse tipo de luz resultam em otimização do processo fotodinâmico, uma vez que bandas de emissão mais largas podem interagir com todo o espectro de absorção dos fotosensibilizadores utilizados. Zanin *et al.* (2005) demonstraram que o uso de laser HeNe ou luz LED em associação com TBO apresentou o mesmo efeito antibacteriano na viabilidade do biofilme de *S. mutans*.

Segundo Dai *et al.*(2010), o uso de TFA em *S. aureus* metilicina resistente isolados de modelos de abrasão de pele de rato infectada demonstrou redução de 2,7 logs na viabilidade bacteriana e acelerou a cura em 8,6 dias em comparação com o controle não tratado. Adicionalmente, a associação da TFA com Vancomicina realizada por Di Poto *et al.*(2009) em *S. aureus* promoveu uma inativação na aderência no biofilme estafilocócico nas superfícies estudadas potencializando o efeito da foto inativação bacteriana.

Análises de parâmetros usados para matar bactérias em suspensões de culturas demonstraram que a TFA é mais efetiva na eliminação de culturas planctônicas que em biofilmes (WILLIAMS *et al.*, 2006). Porém, em nossos achados nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi encontrada, o que pode ser explicada pelo uso de um biofilme em estágio inicial de formação em contraste com os biofilmes estudados por GAD *et al.*(2004) que encontraram diferenças significativas na redução da viabilidade bacteriana em culturas planctônicas e biofilme.

Lipovsky *et al.*(2008) demonstraram uma redução de 56% na viabilidade bacteriana em *Serratia marcescens*, 83% em *S. aureus* e 62% em *E. coli* após uso da TFA

utilizando uma luz branca de 400-800 nm. Embora esses resultados sejam positivos, os autores não esclarecem a redução de viabilidade em logs e o crescimento na forma de biofilme não foi testado. Adicionalmente, a utilização de porcentagem para expressar os resultados podem levar a impressões equivocadas, uma vez que reduções de apenas um log poderiam expressar 90% de redução o que pode muitas vezes ser estatisticamente significativo (Ex: $9,0 \times 10^{11}$ para $0,9 \times 10^{11}$), sem no entanto ser clinicamente relevante. No entanto, mais importantes que dados estatisticamente significativos, seria a obtenção de dados clinicamente relevante no que se refere a retirar o paciente de risco em relação ao número de microrganismos patogênicos presentes no local da infecção. Com relação a *S. marcescens* são considerados pacientes com alto risco de infecções aqueles que apresentam contagens maiores ou iguais a 10^5 UFC mL⁻¹ (RNA, 2010), o que deixa claro a relevância clínica do nosso trabalho, uma vez que foram observadas reduções de (10^{11} UFC mL⁻¹ para 10^7 UFC mL⁻¹), ou seja, redução de 3 a 4 logs, resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Dessa forma, a terapia fotodinâmica apresenta-se como uma promissora ferramenta biotecnológica no controle das resistências bacterianas, problema de saúde pública mundial, uma vez que entre as vantagens da utilização dessa terapia em relação ao uso de agentes antimicrobianos, temos: o confinamento do efeito ao local da lesão pela aplicação tópica do fotossensibilizador e a irradiação restrita à área de interesse, oferecendo baixo risco a outras células do hospedeiro (ZANIN *et al.*, 2005); dano ou morte bacteriana obtido em curto período de tempo, reduzindo a possibilidade de surgimento de resistência microbiana (WAINWRIGHT *et al.*, 2003); e, finalmente, a inexistência de reações sistêmicas, mesmo após repetido uso (BACKHAUS *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÕES

Baseado nas condições experimentais empregadas no presente estudo podemos concluir que:

- ✓ Os resultados desse estudo demonstraram não haver diferenças significativas no perfil de resistência das amostras de diferentes origens em relação as drogas DOX, CTX e IPM.
- ✓ Considerando a resistência a CIP, as amostras ambientais foram significativamente mais resistentes do que as amostras orais e extra-orais.
- ✓ Para a droga TOB, as amostras orais foram significativamente mais sensíveis do que as demais amostras.
- ✓ A cepa proveniente de secreção de ferimento que apresentou perfil de multiresistencia as drogas tobramicina e doxiciclina foi susceptível a terapia fotodinâmica antimicrobiana nos parâmetros testados.
- ✓ A associação de TBO e LED, com densidade de energia de $4,72 \text{ J cm}^{-2}$, foi efetivo na redução da viabilidade bacteriana em cepas ambientais, orais e extra-orais de *S. marcescens* podendo ser uma ferramenta biotecnológica útil no controle da resistência bacteriana.

7 REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. *et al.* Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **J. Endod.**, v. 31, n. 1, p. 30-36, 2005.
- ADAMS, J. L.; MELED, R. J. Impact of detection on *Escherichia coli* biofilms. **Applied Edvison**, v. 65, p. 4285-4287, 1999.
- AKILOV, O. E.; O'RIORDAN K.; KOSAKA S.; HASAN T. Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. **Med. Laser Appl.**, v. 21, p. 251-260, 2006.
- ALFIZAH, H.; NORDIAH, A.J.; ROZAIDI, W. S. Using pulsed-field electrophoresis in the molecular investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* infection in an intensive care unit. **Singapore Med. J.**, v. 45, p. 214–218, 2004.
- ANDERSON, D.J.; KAYE, K. S. Controlling antimicrobial resistance in the hospital. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, n.4, p. 847-864, Dec. 2009.
- ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.
- BACKHAUS, R.; TRASSIEIRA, M.; VILLA, M.; VERA DONOSCO, C. D.; CRUZ, J. F. Terapia fotodinâmica em El cáncer de próstata localizado. **Actas. Urol. Esp.**, v. 31, n. 6, p. 633-641, jun. 2007.
- BAQUERO, F. Resistance to quinolones in Gram-negative microorganisms: mechanisms and prevention. **Eur. Urol.**, v. 17, p. 3-12, 1990.
- BARBOSA, F. C. B. **Estudo comparativo de isolados de *Serratia marcescens* do biofilme subgengival de indivíduos com diferentes condições periodontais com isolados do ambiente e de infecções extra-orais.** 2005. 114f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BARBOSA, F.C.B.; IRINO, K.; CARBONELL, G. V.; MAYER, M.P. Characterization of *Serratia marcescens* isolates from subgingival biofilm, extraoral infections and environment by prodigiosin production, serotyping and genotyping. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 21, n.1, p. 53-60, Feb. 2006.
- BHATTI M.; MACROBERT A.; MEGHJI S.; HENDERSON B.; WILSON M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. **Photochem. Photobiol.**, v. 65, n. 6, p. 1026-31, 1997.
- BIEDENBACH, D.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.; JONES, R. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 54, p. 13-21, 2006.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Lasers and non-lasers light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v. 17, p. 173-186, 2002.

BURNS, T., WILSON, M., PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v. 29, n. 3, p. 192-197, 1995.

CALIN, M. A, PARASCA, S.V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 3, p. 453-460, 2009.

CARNIOL, K.; GILMORE, M. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 186, n. 24, p. 8161-8163, 2004.

CARVALHO, C. M. B.; Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 88, n. 3, p. 112-118, 2007.

CASTANO, A. P.; DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.

CHAMBRIER-ROSELLÓ, Y.; FOSTER, T. H.; PEREZ-NAZARIO, N.; MITRA, S.; HAIDARIS, C. G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 10, p. 4288-4295, 2005.

CHENIA, H. Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 1274- 1278, 2006.

CIMOLAI, N.; TROMBLEY, C., WENSLEY, D.; LEBLANC, J. Heterogeneous *Serratia marcescens* genotypes from a nosocomial pediatric outbreak. **Chest.**, v. 111, p. 194-197, 1997.

COSTERTON, J. W. The application of biofilm science to study to study and control chronic bacterial infection. **J. Clin. Investigations**, v. 112, p. 1466-1477, 2003.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. **Infecção Hospitalar: epidemiologia e controle**. 2 ed. Belo Horizonte: Medsi, 1999.

DAI, T.; TEGOS, G. P.; ZHIYENTAYEV, T.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers Surg. Med.**, v. 48, n. 1, 2010.

DARINI, A. L. C.; MINARINI, L. A. R. Mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology in focus**, v. 8, p. 31-38, 2009.

DI POTO A.; SBARRA M. S.; PROVENZA G.; VISAI L.; SPEZIALE P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biomaterials**, v. 30, p. 3158-3166, 2009.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archs. Oral Biol.**, v. 37, n. 11, p. 883-887, 1992.

DOI, Y.; YOKOYAMA, K. Y.; WACHINO, J.; SHIBATA, N. Y. T. Y.; SHIBAYAMA, K.; KATO, H. and ARAKAWA, Y. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 2, p. 491-496, 2004.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

EKREM, G.; MEHMET, D.; HASAN, U.; HAMZA, K.; OMER, F. K. An outbreak of *Serratia marcescens* septicemia in neonates. **Ind. ped.**, v. 46, p. 61, 2009.

FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M. O. V.; FILHO, N. R. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000.

FEUERSTEIN, O.; PERSMAN, N.; WEISS, E. I. Phototoxic effect of visible light on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: an *in vitro* study. **Photochem. Photobiol.**, v. 80, p. 412-415, 2004.

FISCHER, F.; GRASCHEW, G.; SINN, H. J.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W. J.; SCHLAG, P. M. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clin. Chim. Acta.**, v. 274, n. 1, p. 89-104, June 1998.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 1074p.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; HAMBLIN, M. R. Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

GENNARO, Afonso R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 2208p.

GIUSTI, J. S. M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A. C.; HELMERSON K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, n. 4, p. 279-285, Aug. 2008.

GIWEREMAN, B. *et al.* Induction of β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 1418-1430, 1991.

GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Ciências Farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. 1 ed. São Paulo: Medsi, 2001.

GRIFFITHS M.A., WREN B.W., WILSON M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro* using Aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. **J. Antimicrobial Chemother.**, v. 40, n. 6, p. 873-876, 1997.

- HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, n. 5, p. 436-450, May 2004.
- HAWKEY, P. M. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 1, p. 406-413, 2008.
- HEJAZI, A.; KEANE, C. T.; FALKINER, F. R. The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 913-919, 1997.
- HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **J. Microbiol. Methods.**, v. 44, n. 2, p. 121-129, Mar. 2001.
- HEYDORN, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbio.**, v. 146, p. 2395-2407, 2000.
- HUME, E.B.; WILLCOX, M. D. Emergence of *Serratia marcescens* as an ocular surface pathogen. **Arch. Sociedad. Españ^{ol} .Oftalmol.**, v. 10, p. 1-3, 2004.
- HURRELL, E.; KUCEROVA, E.; LOUGHLIN, M.; CAUBILLA-BARRON, J.; HILTON, A.; ARMSTRONG, R.; SMITH, C.; GRANT, J.; SHOO, S.; FORSYTHE, S Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 146, 2009.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 236, p. 163-173, 2004.
- JORI, G and COPPELLOTTI, O. Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications. **Anti-infective agent. in Med. Chem.**, v. 6, p. 119-131, 2007.
- JORI, G *et al* .Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, p. 468-481, 2006.
- JORI, G.; BROWN S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 403-405, 2004.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005. 991 p.
- KESSEL, D and LUO, Y. Photodynamic therapy: A mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Dif.** v. 6, p. 28 -35, 1999.
- KIFFER, C.; HSIUNG, A. C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C., and the MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 218-224, 2005.
- KIM, B.; CHOI, S.; RYOO, N. Three-year follow-up of an outbreak of *serratia marcescens* bacteriuria in a neurosurgical intensive care unit. **J. Korean Med. Sci.**, v. 21, n. 6, p. 973-978, 2006.

- KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.
- KONOPKA, K.; GOLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 8, p. 694-707, Aug. 2007.
- KRISTOFFERSSON K, GRÖNDAHL HG, BRATTHALL D. The more Streptococcus mutans, the more caries on approximal surfaces. **Dent. Res.**, v. 64, n. 1, p. 58-611, 1985.
- KUBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Med. Laser Appl.**, v. 20, p. 37-45, 2005.
- LEMONICK, M. D. The killers all around. **Time**. v. 144, n. 11, p. 34-41, Sept. 1994.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LIMA, J. P. M. **Estudo *in situ* do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em lesões de cárie dentinária**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; LUBART, R. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. **Lasers Surg. Med.**, v. 40, p. 509-514, 2008.
- LOPES, A C.S.; RODRIGUES, J.F.; MARAIS, J. R., M.A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiol. Res.**, v. 160, p. 37-46, 2005.
- MACROBERT, A. J.; BOWN, S.G.; PHILLIPS, D. What are the ideal properties of a photosensitizer? *In*: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use. **Chichester: Wiley**, p. 4-16, 1989.
- MAH TC, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trend. Microbiol.**, v. 9. p. 34-39, 2001.
- MAISCH, B. Treat. paths. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 3, p. 453-460, 2009.
- MALIK, Z.; HANANIA, J.; NITZAN, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 5, n. 4, p. 281-293, May 1990.
- MANFREDI, R.; NANETTI, A.; FERRI, M.; CHIODO, F. Clinical and microbiological survey of *Serratia marcescens* infection during HIV disease. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 248-253, Apr. 2000.
- MARAGAKIS, L. L. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 6, p.751-763, 2008.
- MENDES, C.; OPLUSTIL, C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; KIFFER, C. and the MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.

MENEZES, E. A. *et al.* Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 34, n. 3, p. 151-4, 2002.

MITRA, S. **Photodynamic therapy: biophysical mechanisms and molecular responses.** 2004. PhD Thesis (Doctor of Philosophy) – Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Rochester, NY, 2004. Disponível em: <http://www.urmc.rochester.edu/smd/Rad/foster/people/Soumya_PhDthesis.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2009.

MOTEGI, M.; TAKAGI, Y. H.; HANADA, J.; TERAJIMA, H. W. and SENPUKU, H. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 6277–6287, 2006.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationship between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURRAY, B. E. The Life and time of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Documento:** M2-A8, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard –8 ed., 2003.

NOGUEIRA, P. S. F.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO, W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Ver. Enferm. UERJ**, v. 17, n 1, 2009.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002.

OKIMOTO, N.; YAMATO, K.; HONDA, Y.; KURIHARA, T.; OSAKI, K.; ASAOKA, N.; FUJITA, K.; OHBA, H. Clinical effect of intravenous ciprofloxacin on hospital- acquired pneumonia. **J. Infect. Chemother.**, v. 11, n. 1, p. 52-54, Feb. 2005.

OKUNAKA *et al.* Correlation between photodynamic efficacy of differing porphyrins and membrane partitioning behavior. **Laser Surg. Med.**, v. 12, p. 98-103, 1992.

OLIVEIRA, A. C.; HORTA, B.; MARTINHO, G.H.; DANTAS, L. V.; RIBEIRO, M. M. Infecção hospitalar e resistência bacteriana em pacientes de um centro de terapia intensiva de um hospital universitário. **Online Braz. J. Nurs.**, v. 6, n. 2, 2007.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 449-461, May. 1998.

PALLECCHI, L.; BARTOLONI, A.; FIORELLI, C.; MANTELLA, A.; GAMBOA, H.; GOTUZZO, E.; KRONVALL, G.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G. M. rapid dissemination and diversity of CTM-X extended- spectrum β - lactamase genes in commensal *E. coli* isolates from healthy children from low- resource settings in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 2720-2725, 2007.

- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended- spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.
- PATZER, J. A.; DZIERZANOWSKA, D.; TURNER, P. J. Trends in antimicrobial susceptibility of Gram-negative isolates from a paediatric care unit in Warsaw: results from the MYSTIC programme (1997-2007). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, p. 369-375, 2008.
- PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K. F.; THEDEI JR, G.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 3, p. 353-359, Mar. 2005.
- PELOI, L. S.; SOARES, R. R. S.; BIONDO, C. E. G.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.**, v. 33, n. 2, p. 231-237, June 2008.
- PEREIRA, A. S.; ANDRADE, S. S.; MONTEIRO, J.; SADER H. S.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of qnr gene in *E. coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, p. 40-43, 2007.
- PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The modes of cell death induced by PDT: An Overview. **Med. Laser Appl.**, v. 18. p. 7-19, 2003.
- PRATES, R. A.; YAMADA JR, A. M.; SUZUKI, L. C.; HASHIMOTO, M. C. E.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite Green and red laser on *actinobacillusactinomycetemcomitans*. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 86, n. 1, p. 1-7, Jan. 2006.
- RAAB, V. O. Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infosurien. **Archiv. f. klin. Med.**, v. 39, p.524-546, 1900.
- RAJASEKAR, A.; BABU, T. G.; PANDIAN, S. T.; MARUTHAMUTHU, S.; PALANISWAMY, N.; RAJENDRAN, A. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, n. 9, p. 589-598, 2007.
- RANG e DALE. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829p.
- RNA Laboratórios. **Culturin**. Disponível em www.rna.com.br. Acesso em: 02 de março de 2010.
- RICE, S. A.; KOH, K. S.; QUECK, S. Y.; LABBATE, M.; LAM, K. W.; KJELLEBERG, S. Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum sensing and Nutrient Cues. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 10, p. 3477-3487, May 2005.
- ROSE, L. R.; MEALEY, B. L.; GENCO, R. J.; COHEN, D.W. **Periodontia: Medicina, Cirurgia e Implantes**. São Paulo: Santos, 2007. 990 p.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2006. 118p.

- ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, N. A.; SOLE, P. M.; FRIEDEN, D. M.; ROTHSTEIN., S. P. Photoactive porphirin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 12, p. 3364-3367, 2000.
- RYTER, S.T.; TYRRELL, M. Singlet molecular oxygen: A possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1520-1534, June 1998.
- SADER, H. S.; JONES, R. N.;GALES, A. C.; SILVA, J. B. PIGNATARI, A. C. Sentry participants group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 25-79, 2004.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfem.**, v. 13, p. 64-70, 2004.
- SANTOS, N. Q. **Infecção Hospitalar**: uma reflexão histórico-ética. Florianópolis: Editora da UFSC, 1997.
- SCHABERG, D.R.; ALFORD, R. H.; ANDERSON, R.; FARMER, J. J.; MELLY, M. A.; SCHAFFNER, W. An outbreak of nosocomial infection due to multiply resistant *Serratia marcescens*: Evidence of interhospital spread. **J. Infect. Dis.**, v.134, p. 181–188, 1976.
- SEAL, G. J.; SPRATT, D.; BHATTI, M.; GULABIVALA, K. An *in vitro* comparasion of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hyphochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **Intern. Endod. J.**, v. 35, p. 268-74, 2002.
- SHEMESH, M.; TAM, A.; STEINBERG, D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. **Microbiol.**, v. 153, p. 1307–1317, 2007.
- SHIH, H.; LEE, H.; LEE, N.; CHANG, C.; WU, C.; WANG, L.; Nai-Ying, K.O. *Serratia marcescens* bacteremia at a medical center in southern Taiwan: high prevalence of cefotaxime resistance. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 38, p. 350-357, 2005.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006. 1367p.
- SMITH, P. J.; BROOKFIELD, D. S. K.; SHAW, D. A.; GRAY, J. An outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal unit. **Lancet.**, v. 21, p. 151–153, 1984.
- SPENCER, R. C. Epidemiology of infection in ICUs. **Intensive Care Med.**, v. 20, n. 5, p. 2-6, 1994.
- STEINBERG, D.; MOREINOS, D.; FEATHERSTONE, J.; SHEMESH, M.; FEUERSTEIN, O. Genetic and physiological effects of noncoherent visible light combined with hydrogen peroxide on *Streptococcus mutans* in biofilm. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 7, p. 2626-2631, Jul. 2008.
- STOCK, I.; GRUEGER, T.; WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. **Int .J. Antimicrob. Agents**, v. 22, p. 35–47, 2003.

STOODLEY, P. *et al.* The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. **Env. Microbiol.**, v. 1, p. 447-455, 1999.

SWARTZ, M. N. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 2009-2016, Dec. 2000.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Ver.. Soc Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TOCARS, J. L. *et al.* The prevalence of colonization with vancomycin-resistant Enterococcus at a Veterans Affairs institution. **Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 171-175, 1999.

TOLKER-NIELSON, T. *et al.* Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* Biofilm. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 6482-6489, 2000.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 869 p.

TRAUB, W.H. Antibiotic susceptibility of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* **Chemother.**, v. 46, n. 5, p. 315-321, 2000.

TRIPATHI, K. D. **Farmacologia Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006. 774p.

TSAI, T.; CHANG, S.; HSUEH, P.; FENG, N.; WANG, J. In vitro activity of isepamicin and other aminoglycosides against clinical isolates of Gram-negative bacteria causing nosocomial bloodstream infections. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, p. 481-486, 2007.

TSEGG, S. P.; TENG, I. J.; CHEN, C.T.; LO, T. H.; HUNG, W.C.; CHEN, H. J., HSUEH, P. R.; TSAI, J. C. Toluidine blue o photodynamic inactivation on multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa. **Lasers Surg. Med.**, v. 41, n. 5, p. 391-39, 2009.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, C. M.; BIEL, M. A. Comparison of methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, v. 29. p.165-173, 2001.

VALDIVIESO-GARCIA, A.; IMGRUND, R.; DECKERT, A.; VARUGHESE, B. M.; HARRIS, K.; BUNIMOV, N.; REID-SMITH, R.; MCEWEN, S. Cost analysis and antimicrobial susceptibility testing comparing the E-test and the agar dilution method in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 65, p.168-174, 2009.

WAINWRIGHT, M. An alternative view of the early history of microbiology. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 52, p. 333-355, 2003.

WAINWRIGHT, M. **Drugs Fut.** Ed. Prous Science, 2004.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.16, n. 4, p. 381-94, 2000.

WAINWRIGHT, M. Photoantimicrobials - a PACT against resistance and infection. **Drugs Fut.**, v. 29, n. 1, p. 85, 2004.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 1, p.13-28, 1998 .

WAINWRIGHT, M.; AMARAL, L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 10, n. 6, p. 501-11, 2005.

WALTHER- RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, n.3, p. 470-482, 2007.

WEI, Y. H.; LAI, H. C.; CHEN, S. Y.; YEH, M. S.; CHANG, J. S. Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SMDR defective in SpnR, a quorumsensing LuxR family protein. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p. 799–802, 2004.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, n. 5, p. 412-418, 2004.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES M. J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus Mutans*. **Caries Res.**, v. 37, n. 3, p. 190-193, May/June 2003.

WILSON M., YIANNI C. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 62-6, 1995.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, n. 5, p. 412-418, May 2004.

WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G. J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, n. 5, p. 569-574, May 1995.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 77-81, Aug. 1992.

WINCKLER, K. D. Focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT). **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 8, p. 43- 44, 2007.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 7, 2006.

WOOD, S.; NATTRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S.; GRIFFITHS, J.; ROBINSON, C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

YAVARI, N. Optical spectroscopy for tissue diagnostics and treatment control. (Doctoral Thesis) – **Department of Physics and Technology, the University of Bergen**, Bergen, 2006.

ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA-JR, A.; GONÇALVES, R. B. *In vitro* study of bactericidal effect of low level laser therapy in the presence of photosensitizer on cariogenic bacteria. Proceedings of SPIE, **Lasers Dent. VIII.**, v. 4610, p. 154-161, 2002a.

ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA-JR, A.; HÖFLING, J. F.; ZANIN, F. A. A.; GONÇALVES, R. B. Antimicrobial effect of low-level laser therapy in the presence of photosensitizer in human saliva bacteria. **Lasers in Dentistry VIII.**, v. 4610, p. 162-169, 2002b.

ZANIN, I. C. J.; GONCALVES, R. B.; BRUGNERA-JR, A.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of Streptococcus mutans biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, n. 2, p. 324-330, 2005.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L.K., PIMENTA, L. A.; HOFLING J. F.; GONCALVES, R. B. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 114, n. 1, p. 64-69, Feb. 2006.

APÊNDICE A

Teste de suscetibilidade pelo E-test® para 5 antimicrobianos*

Cepa	Grupo	CT**	TM**	DX**	IP**	CI**
I	Ambiental	0,19	4	8	0,19	0,64
II	Ambiental	6	12	12	0,19	0,75
III	Ambiental	0,25	3	8	0,19	0,064
IV	Ambiental	0,25	0,38	4	0,25	0,19
V	Ambiental	0,125	4	12	0,19	1
VI	Ambiental	0,38	6	12	0,38	1
VII	Ambiental	0,19	3	16	0,25	1
VIII	Ambiental	0,125	6	16	0,25	0,64
IX	Ambiental	0,5	4	16	0,19	1
X	Ambiental	0,125	4	12	0,25	0,064
131-A	Oral	1,5	2	24	0,25	0,125
274-A	Oral	0,25	2	8	0,19	0,064
274-C	Oral	0,38	2	12	0,19	0,064
76-A	Oral	0,25	2	24	0,25	0,125
387-C	Oral	0,75	1	32	0,25	0,125
307-A	Oral	0,25	4	4	0,25	0,094
32-B	Oral	0,75	3	4	0,25	0,064
312-B	Oral	0,75	1,5	16	0,25	0,19
54-A	Oral	0,19	2	8	0,19	0,032
312-C	Oral	0,5	1	16	0,19	0,125
387-B	Oral	0,125	1,5	8	0,25	0,47
385-C	Oral	0,047	3	3	0,25	0,047
338-C	Oral	0,25	2	4	0,19	0,064
86-A	Oral	0,5	3	4	0,19	0,094
85-A	Oral	0,19	1,5	24	0,5	0,064
124-A	Oral	0,094	1,5	4	0,25	0,064
26-B	Oral	0,125	2	2	0,19	0,032
217-C	Oral	0,064	1	2	0,19	0,047
240-C	Oral	0,125	3	8	0,25	0,023
130	Oral	0,38	2	4	0,19	0,047
273-C	Oral	0,032	1,5	8	0,19	0,064
274-B	Oral	0,064	1,5	8	0,19	0,047
217-A	Oral	>32	2	4	0,19	0,032

*** S = sensível; I = sensibilidade intermediário; R = resistente.

* CT(0,002-32 µg/ml), TM(0,016-256 µg/ml), DX(0,016-256 µg/ml), IP(0,002-32 µg/ml), CI(0,002-32 µg/ml)

Os valores de suscetibilidade (µg/ml) foram interpretados de acordo com as normas do NCCLS (2003): Cefotaxima (CT) S≤8, 16≤I≤32, R≥64; Tobramicina (TM) S≤4, I=8, R≥16; Doxiciclina (DX) S≤4, I=8, R≥16; Imipenem (IP) S≤4, I=8, R≥16; Ciprofloxacina (CI) S≤1, I=2, R≥4.

Cepa	Grupo	CT**	TM**	DX**	IP**	CI**
3963	Extra-Oral	2	2	8	0,25	>32
341	Extra-Oral	0,19	2	16	0,125	0,094
636	Extra-Oral	0,064	3	4	0,19	0,094
480	Extra-Oral	0,38	6	8	0,38	0,19
821	Extra-Oral	0,094	6	12	0,25	0,125
3202	Extra-Oral	2	4	12	1	0,5
458	Extra-Oral	0,38	4	24	0,38	0,125
3838	Extra-Oral	0,19	2	8	0,25	0,064
10	Extra-Oral	0,19	2	24	0,25	0,125
266	Extra-Oral	0,19	4	8	0,19	0,032
901	Extra-Oral	0,5	16	24	2	0,25
CDC	Extra-Oral	0,25	3	12	0,38	0,032
Karol	Extra-Oral	0,19	2	4	0,25	0,064
833	Extra-Oral	0,25	1,5	4	0,25	0,032
1103	Extra-Oral	0,38	2	8	0,5	0,032
654	Extra-Oral	0,125	2	12	0,25	0,047
3303	Extra-Oral	0,19	3	12	0,25	0,094
380	Extra-Oral	0,19	2	4	0,19	0,064
WF	Extra-Oral	0,05	3	4	0,19	0,064
631	Extra-Oral	0,094	3	8	0,25	0,047
4479	Extra-Oral	0,38	2	6	0,25	0,125
651	Extra-Oral	0,5	2	3	0,25	0,023

*** S = sensível; I = sensibilidade intermediário; R = resistente.

* CT(0,002-32 µg/ml), TM(0,016-256 µg/ml), DX(0,016-256 µg/ml), IP(0,002-32 µg/ml), CI(0,002-32 µg/ml)

Os valores de suscetibilidade (µg/ml) foram interpretados de acordo com as normas do NCCLS (2003): Cefotaxima (CT) S≤8, 16≤I≤32, R≥64; Tobramicina (TM) S≤4, I=8, R≥16; Doxiciclina (DX) S≤4, I=8, R≥16; Imipenem (IP) S≤4, I=8, R≥16; Ciprofloxacina (CI) S≤1, I=2, R≥4.