

Recebido em 03/2016. Aceito para publicação em 07/2018.

TESTE DE HODGE MODIFICADO EM ÁGAR CLED PARA TRIAGEM DE *Proteus mirabilis* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE

MODIFIED HODGE TEST WITH CLED AGAR FOR SCREENING CARBAPENEMASE-PRODUCING *Proteus mirabilis*

Gabrielli Stefaninni Santiago¹

Laura Ribeiro²

Irene da Silva Coelho³

Miliane Moreira Soares de Souza⁴

Shana de Mattos de Oliveira Coelho⁵

Resumo: *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase vêm sendo descritas em todo o mundo. Uma detecção precisa de bactérias produtoras de carbapenemase é necessária, pois essa classe de antibióticos é usada no tratamento de infecções severas. Em nível laboratorial, o método fenotípico para a detecção de produtores de carbapenemase é o teste de Hodge modificado. Entretanto, algumas enterobactérias têm grande motilidade, dificultando a leitura e interpretação dos resultados dessa técnica. O objetivo deste estudo foi validar um meio para se obter resultados confiáveis em bactérias com grande motilidade, como é o caso de *Proteus mirabilis*. O meio ágar Müller-Hinton, preconizado pelo CLSI, foi comparado ao ágar CLED que demonstrou ser um bom meio para análise da produção de carbapenemase em *Proteus mirabilis* suspeitos de produzirem essa enzima, embora todos os isolados tenham sido negativos no teste.

Palavras-chave: Ágar CLED; ágar Müller-Hinton; carbapenemase; *Proteus mirabilis*; véu de *Proteus*.

Abstract: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* have been reported worldwide. An accurate detection of bacteria producing carbapenemase is necessary since this antimicrobial class is used to treat severe infections. At a laboratory level, the standardized phenotypic method for the detection of carbapenemase production is the modified Hodge test. However, some enterobacteria have high motility, hampering the reading and interpretation of the results of this technique. The objective of this study was to validate a medium to obtain reliable results in bacteria with great motility, such as *Proteus mirabilis*. Compared to the medium recommended by CLSI, Müller-Hinton agar, CLED agar was observed to be a good medium when *Proteus mirabilis* isolates suspected of producing carbapenemase were analyzed, although it has not confirmed the production in all these isolates.

Keywords: Carbapenemase; CLED agar; Müller-Hinton agar; *Proteus mirabilis*; swarm.

¹ Doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: gabriellissantiago@outlook.com.

² Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: lauraribro@yahoo.com.br.

³ Doutorado em Microbiologia Agrícola, Professor adjunto na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: irenecs@yahoo.com.

⁴ Doutorado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: milianemss@gmail.com.

⁵ Doutorado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: shana_mattos@hotmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Os carbapenemas são comumente usados no tratamento de infecções causadas por enterobactérias multirresistentes. O aumento de relatos de enterobactérias produtoras de carbapenemase tem causado preocupação em todo o mundo (ANDERSON et al., 2007; HIRSCH; TAM, 2010; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2011).

As carbapenemases têm capacidade hidrolítica versátil. Essas enzimas são hábeis em hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas e, geralmente, não são inibidas pelo ácido clavulânico. KPC, VIM, IMP, NDM e OXA-48 são os principais tipos de carbapenemases (NORDMANN et al., 2012). A enzima KPC é frequentemente encontrada em *Klebsiella pneumoniae* e o gene codificador da enzima está presente em plasmídios transferíveis (ANDERSON et al. 2007; QUEENAN; BUSH, 2007). Esse tipo de carbapenemase também é encontrado em outras enterobactérias, como *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp. e *Proteus mirabilis* (ANDERSON et al. 2007; HIRSCH; TAM, 2010).

Proteus spp. pode ser isolado de muitos ambientes, como solo, água e trato intestinal de mamíferos e vem sendo isolado em animais de produção (WANG et al., 2014; YEH; LINE; HINTON JUNIOR, 2018). *P. mirabilis* tem sido descrito em muitos países como produtores de β -lactamases, especialmente de carbapenemase (BONNET et al., 2002; TIBBETTS et al., 2008; HU et al., 2012; DATTA et al., 2014).

O teste de Hodge modificado é reconhecido pelo CLSI como ferramenta fenotípica que auxilia na detecção de enterobactérias produtoras de carbapenemases (HIRSCH; TAM, 2010; LEE et al., 2010; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2011). Em algumas espécies com grande motilidade, como as do gênero *Proteus*, a interpretação fica prejudicada pela formação do *swarm*, uma deformação na área em torno do crescimento bacteriano.

Com o propósito de identificar *Proteus mirabilis* produtores de carbapenemase por meio do teste de Hodge modificado, foram utilizados dois meios distintos para a avaliação de quatro isolados suspeitos de produzirem essa enzima. A partir da comparação das leituras dos meios de cultura, foi possível validar um meio para detecção de carbapenemase em *Proteus mirabilis* e em outras espécies que, também, apresentam grande motilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos

Foram utilizados quatro isolados de *Proteus mirabilis* provenientes de leite cru mastítico. Esses isolados foram previamente identificados por testes bioquímicos e

MALDI-TOF MS, e caracterizados como resistentes a imipenem e ertapenem por difusão em disco (CLSI, 2017).

2.2 Cepas controle

Como controles para o teste de Hodge modificado convencional e sugerido no estudo foram utilizados: *Escherichia coli* ATCC25922 sensível aos β -lactâmicos; *Klebsiella pneumoniae* BAA1705, produtor de carbapenemase; e *K. pneumoniae* BAA1706, não produtor de carbapenemase.

2.3 Meios e Antibióticos

O crescimento dos isolados suspeitos de produzirem carbapenemase e as cepas controle foram cultivadas em ágar MacConkey (AMC) (Himedia). Os ajustes de turbidez foram feitos em solução salina 0,9% (Vetec). O teste de Hodge modificado foi realizado segundo o CLSI (2017) e para a realização do método convencional foi usado ágar Müller-Hinton (MH) e para o método sugerido foi usado ágar CLED. As placas foram preparadas segundo orientações dos fabricantes (Himedia). Os discos de antibiótico utilizados para a observação da produção enzimática nos dois métodos foram do carbapenema ertapenem 10 μ g (Sensidisc, DME).

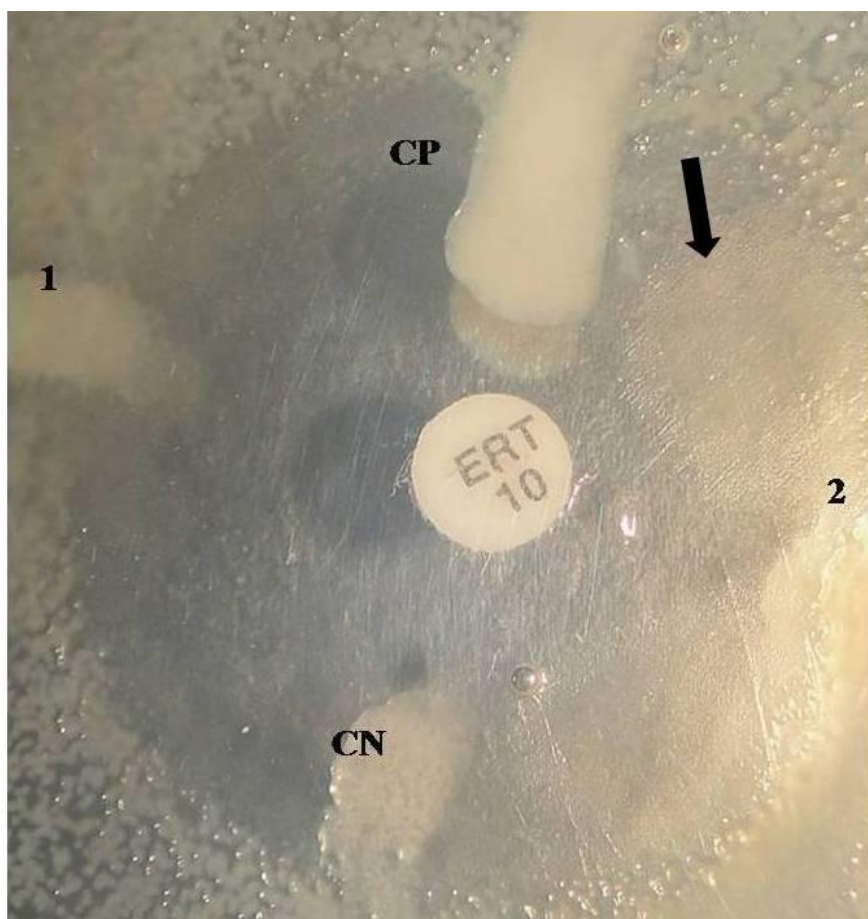
2.4 Teste de Hodge Modificado

Uma cultura crescida por 24h em ágar MacConkey da cepa controle *E. coli* ATCC25922 foi ajustada de acordo com a escala de turvação 0,5 de McFarland e foi inoculada com um suabe sobre a superfície da placa de CLED. O mesmo procedimento foi realizado para a inoculação da bactéria na placa de MH. No centro da placa, foi depositado o disco de antimicrobiano ertapenem. Em seguida, os isolados *Proteus mirabilis* suspeitos de produzirem a enzima e os controles *K. pneumoniae* BAA1705 e BAA1706 foram semeados da borda do disco antimicrobiano até a borda da placa do meio de cultura, após terem sido ajustados segundo a escala 0,5 de McFarland. As placas foram incubadas, em estufa bacteriológica, por 24h a 35°C. O teste foi interpretado como positivo quando houve distorção da zona de inibição, se comparado com a distorção ocorrida na cepa padrão produtora de carbapenemase *K. pneumoniae* BAA 1705. O teste de Hodge modificado foi realizado em triplicata para cada isolado em ágar MH e em ágar CLED (CLSI, 2017).

3. RESULTADOS

Primeiramente, o teste convencional preconizado pelo CLSI (2017) foi realizado inoculando a cepa *Escherichia coli* ATCC25922 nas placas de ágar MH e, em seguida, os isolados *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* inoculados em linhas desde o disco de ertapenem até a borda da placa. Após a incubação, observou-se que na região interna do halo formado ao redor do disco de antimicrobiano havia um sombreado característico do crescimento de *Proteus* spp., conhecido como “véu” ou *swarm*. Neste caso não foi possível realizar uma leitura confiável do teste de produção de carbapenemase nestes isolados (Figura 1).

Figura 1 - *Proteus mirabilis* inoculado em ágar MH. A seta aponta para o véu de *Proteus* que dificulta a leitura deste teste. Legenda: 1 e 2 – isolados *P. mirabilis* (provenientes do estudo de detecção de enterobactérias produtoras de β -lactamases); CN – controle negativo, *Klebsiella pneumoniae* BAA1706; CP – controle positivo, *K. pneumoniae* BAA1705.

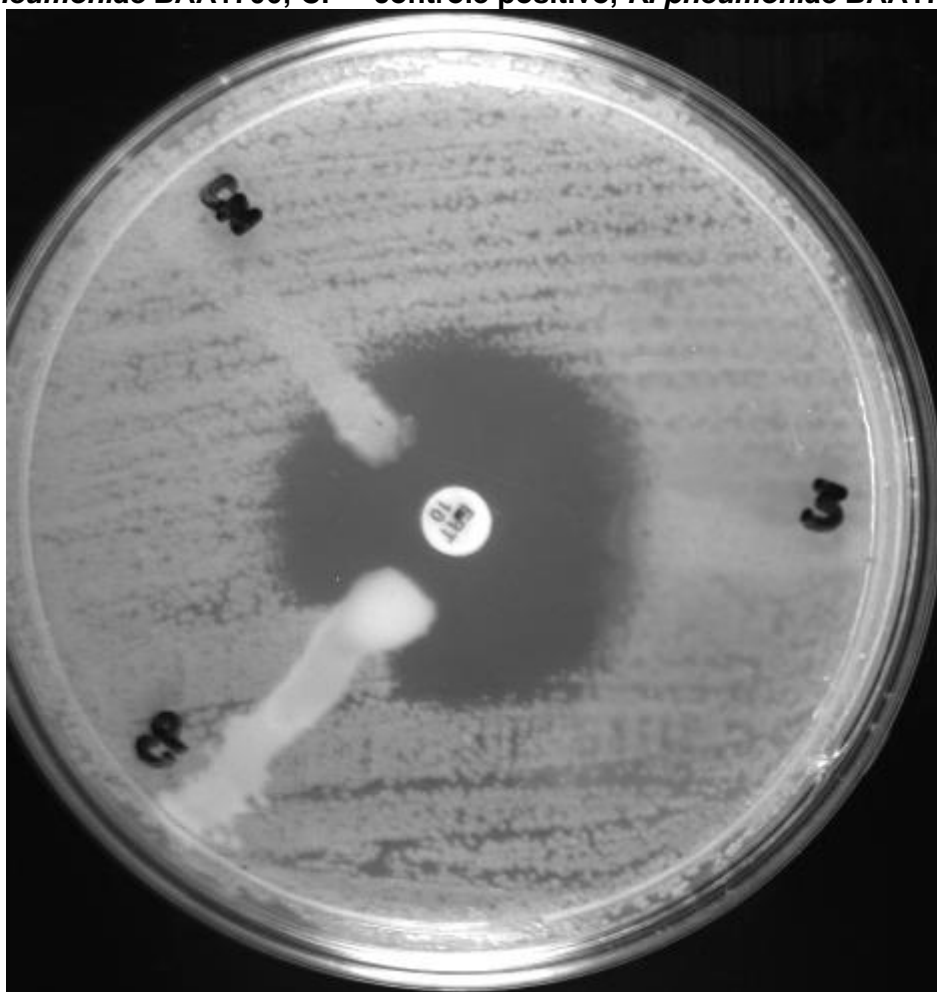


Fonte: Os autores.

No teste proposto neste trabalho, selecionou-se o meio CLED para substituição do ágar MH no teste de Hodge modificado, como forma de conter a motilidade do isolado

suspeito. Assim, pode-se realizar a leitura da produção de carbapenemase nos quatro isolados de *P. mirabilis*. Comparado ao resultado apresentado pela cepa padrão *K. pneumoniae* BAA1705, não houve confirmação da produção da enzima (Figura 2).

Figura 2 - Teste de Hodge Modificado realizado em ágar CLED. A ausência do “véu” de *Proteus* nesse meio de cultura possibilita a leitura correta do teste: a observação da presença ou ausência da distorção no halo formado em torno do disco de ertapenem. No isolado em estudo, não foi confirmada a produção de carbapenemase, apenas a cepa padrão usada como controle positivo demonstrou a deformação no halo, característico da produção da enzima. Legenda: 3 – *P. mirabilis* (isolado estudado); CN – controle negativo, *K. pneumoniae* BAA1706; CP – controle positivo, *K. pneumoniae* BAA1705.



Fonte: Os autores.

4. DISCUSSÃO

P. mirabilis tem grande motilidade e forma uma nuvem sobre a placa onde é inoculado, sendo denominada “véu” ou *swarm*. A motilidade é devido à presença de flagelos peritríquios, aos fatores ambientais, como a presença de alguns nutrientes no meio de cultivo e à presença de lipopolissacarídeos em sua superfície celular (LIAW et al., 2003; KWIL; KAZMIERCZAK; RÓZALSKI, 2013).

O teste de Hodge modificado tem o objetivo de auxiliar no diagnóstico de cepas produtoras de β -lactamase carbapenemases (HIRSCH; TAM, 2010; LEE et al., 2010; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2011). A detecção de carbapenemase pelo teste de Hodge modificado é confirmada quando se observa o crescimento da cepa padrão sensível aos β -lactâmicos para o interior do halo de sensibilidade formado em torno do disco de ertapenem (CLSI, 2017).

Esse teste foi realizado com MH, de acordo com o preconizado pelo CLSI, e demonstrou-se ineficiente para a análise da produção da enzima em *Proteus mirabilis* isolados de leite cru mastítico. Pois observou-se uma nuvem de *Proteus* sobre o crescimento da cepa *E. coli* ATCC25922, dificultando a visualização do evento.

O CLSI (2017) preconiza a utilização do ágar MH, um meio que contém: infusão de carne bovina, caseína hidrolisada e amido. Esses nutrientes são usados para o desenvolvimento bacteriano durante a realização do teste de suscetibilidade antimicrobiana. Entretanto, o ágar MH não tem características limitantes de motilidade, importantes para avaliação do teste em bactérias muito móveis, como é o caso da espécie estudada. Porém, outras espécies com essa característica também podem apresentar um resultado pouco confiável.

Especificamente sobre *Proteus*, não foi encontrado outro artigo demonstrando a mesma problemática, talvez devido à inexistência de trabalhos sobre esse comportamento em isolados provenientes de bovinos suspeitos de produzirem carbapenemases. Dessa forma, pesquisou-se um meio capaz de limitar a motilidade dessa espécie. O ágar CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient medium) foi selecionado para o teste por sua composição. A deficiência em eletrólitos nesse meio limita a proliferação de *Proteus* spp., de acordo com estudos sobre fatores limitantes da formação de véu, e, também, não influencia o desenvolvimento bacteriano, como demonstrado pelo crescimento e presença do evento na cepa padrão positiva para o teste (WILLIAMS; SCHWARZHOFF, 1978). O meio contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento bacteriano: lactose, peptona, extrato de carne, triptona e L-cistina. A lactose é uma fonte energética para organismos capazes de utilizá-la pela via fermentativa. L-cistina é adicionada como suplemento para o crescimento de coliformes que necessitam da cistina. Os demais componentes são responsáveis por suprir a necessidade de nitrogênio e carbono das bactérias. Além desses componentes, o CLED possui um indicador de pH, nesse caso o azul de bromotimol, que diferencia as bactérias fermentadoras de lactose das que não fermentam esse açúcar (Himedia).

No meio CLED, observou-se a ausência do “véu” produzido anteriormente pelos isolados suspeitos da produção de carbapenemase. O crescimento de *P. mirabilis* ocorreu apenas na linha onde foram inoculados e a leitura do teste pôde, então, ser realizada de forma segura. Não houve o crescimento da cepa controle sensível aos β -lactâmicos para o interior do halo formado em torno do ertapenem, característica de

isolados não produtores da enzima. Tanto no meio MH quanto em CLED houve produção de carbapenemase pela cepa *K. pneumoniae* BAA 1705 e não produção pela *K. pneumoniae* BAA1706, usadas como controle para os dois métodos. Com isso, pode-se dizer que não houve influência do meio sobre a produção da enzima ou sobre a leitura do teste. A detecção de carbapenemase foi visualizada tanto no teste preconizado pelo CLSI quanto no proposto neste trabalho.

Os quatro isolados de *P. mirabilis* não apresentaram deformação no halo de sensibilidade, no teste realizado em CLED, demonstrando que eles não produzem carbapenemase, embora tenham apresentado resistência a carbapenemas testados em outro momento do experimento.

Outros mecanismos podem estar relacionados à resistência observada aos carbapenemas nesses isolados, como a diminuição da permeabilidade da membrana bacteriana ou a coprodução de enzimas (TSAI; WANG; HSUEH, 2015; MOHAMMED et al., 2016; DAS et al., 2017). Esses dados são fundamentais para a escolha apropriada da antibioticoterapia que será utilizada no tratamento de infecções causadas por essas bactérias e para o monitoramento das cepas de *Proteus* resistentes circulantes (HARADA et al., 2014).

5. CONCLUSÃO

Dessa forma, o teste de Hodge modificado realizado em ágar CLED mostrou-se melhor do que o teste realizado em ágar MH para os isolados do estudo e pode ser utilizado para a detecção de carbapenemases em outras espécies com motilidade capaz de interferir na leitura do teste. Comprovou-se, também, que não há interferência do meio na produção da enzima nem no crescimento bacteriano.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

ANDERSON, K. F. et al. Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2723-2725, 2007.

BONNET, R. et al. Chromosome-Encoded Class D β -Lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 2004-2006, 2002.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27. ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

DAS, A. et al. Detection of emerging antibiotic resistance in bacteria isolated from subclinical mastitis in cattle in West Bengal. **Veterinary World**, v. 10, n. 5, p. 517-520, 2017.

DATTA, P. et al. Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase Production in *Proteus mirabilis*. **Jpn. J. Infect. Dis.**, n. 67, p. 44-46, 2014.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 477-479, 2011.

HARADA, K. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolates from dogs. **Journal of Medical Microbiology**, n. 63, p. 1561-1567, 2014.

HIRSCH, E.B; TAM, V.H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-7, 2010.

HU, Y.Y. et al. Emergence of *P. mirabilis* Harboring *bla*_{KPC-2} and *qnrD* in a Chinese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2278-2282. 2012.

KWIL, I.; KAZMIERCZAK, D.; RÓZALSKI, A. Swarming growth and resistance of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* strains to normal human serum. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, n. 22, v. 2, p. 165-175. 2013.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, p. 7, p. 88-102. 2000.

LEE, K. et al. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. **Journal of Microbiological Methods**, n. 83, p. 149-152, 2010.

LIAW, S.J. et al. Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. **Journal of Medical Microbiology**, n. 52, p. 19-28.

MOHAMMED, A. N. et al. Ecological study on antimicrobial-resistant zoonotic bacteria transmitted by flies in cattle farms. **Parasitology Research** n. 115, v. 10, p. 3889-3896, 2016.

NORDMANN, P. et al. European Network on Carbapenemases Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n. 18, p. 432-438, 2012.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile Beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 20, v. 3, p. 440-458, 2007.

TIBBETTS, R. et al. Detection of KPC-2 in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis* and First Reported Description of Carbapenemase Resistance Caused by a KPC Beta-Lactamase in *P. mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 46, v. 9, p. 3080-3083, 2008.

TSAI, Y. L.; WANG, M. C.; HSUEH, P. R. et al. Overexpression of an outer membrane protein associated with decreased susceptibility to carbapenems in *Proteus mirabilis*. **PLoS One**, n.10, v.3, e0120395. 2015.

YEH, H-Y.; LINE, J. E.; HINTON JUNIOR, A. Molecular analysis, biochemical characterization, antimicrobial activity, and immunological analysis of *Proteus mirabilis* isolates from broilers. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 770-779, 2018.

WANG, J.T. et al. TSAR Hospitals. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. **BMC Infectious Diseases**, n.14, p.486, 2014.

WILLIAMS, F. D.; SCHWARZHOFF, R. H. Nature of Swarming Phenomenon in *Proteus*. **Annual Review of Microbiology**, n. 32, p. 101-122, 1978.