

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Taíse de Mello Goulart

**Comparação entre Etest® e microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade à polimixina B em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC**

Porto Alegre, dezembro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Taíse de Mello Goulart

**Comparação entre Etest® e microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade à polimixina B em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Farmácia como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki  
Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2017

“Nada na vida é para ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais, para então podermos temer menos.”

Marie Curie

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Alexandre Prehn Zavascki, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho e pela orientação. À Cibele e à Laura, por todo o conhecimento que compartilharam comigo, pela convivência e pelo apoio e confiança em mim não apenas durante a elaboração desta monografia, mas durante todo o tempo em que fui aluna de iniciação científica de vocês. Às minhas ex-colegas de laboratório e futuras colegas de profissão Amanda, Marina, Luíza e Helena por todos os momentos de trabalho e cooperação, bem como pelos momentos de descontração (e cafés!) entre um teste de susceptibilidade e outro. Ao pessoal do Laboratório de Pesquisa Bacteriana (LABRESIS) como um todo: vocês não tem noção do quanto eu cresci profissional e pessoalmente graças a vocês.

Aos meus amigos, pelas muitas vezes que ouviram meus desabafos sobre as dificuldades da faculdade, por entenderem a minha ausência nos períodos de provas, pelo apoio, incentivo e por toda a alegria que sempre compartilhamos quando conseguimos marcar de nos vermos. À Daniela e ao Rafael, por terem encarado a faculdade junto comigo do início ao fim e por todos os momentos de apoio, de alegria e de desafios que compartilhamos juntos nessa trajetória. Vocês se tornaram muito mais do que colegas para mim e contribuíram muito para deixar a faculdade um pouquinho mais leve. Essa conquista com certeza não teria a mesma emoção se eu não tivesse vocês comigo.

Ao meu amor Matheus, por todas as vezes em que conseguiu me fazer sorrir nos momentos de desânimo, pela parceria, pelos abraços quando eu mais precisava, por sonhar junto comigo e por acreditar mais em mim do que eu mesma. É muito bom saber que eu posso sempre contar contigo ao meu lado.

Aos meus pais, Carlos e Zoila, agradeço por todo o carinho, incentivo, compreensão e, principalmente, paciência que tiveram comigo durante toda a graduação. Sinceramente não sei como vocês me aguentaram, mas espero que pelo menos eu tenha conseguido retribuir vocês com um pouco de orgulho. À minha madrinha Cristiane, por sempre me dar os melhores conselhos, por ser a profissional de saúde a qual eu sempre admirei e me espelhei, e também pela especial ajuda na revisão do texto. À minha avó Clélia, por ser uma das minhas maiores “fãs”, sempre demonstrando entusiasmo e curiosidade em saber de cada aprendizado novo da faculdade que eu lhe contava durante os almoços entre as aulas. À minha família, de uma forma geral, por ser a minha base e por todo o suporte emocional que sempre me deram.

Obrigada de verdade a todos. Sem vocês eu com certeza não teria chegado até aqui.

## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno oportunista presente em infecções comunitárias e nosocomiais. Nos últimos anos, a resistência à carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* tem aumentado de forma alarmante no mundo todo. *K. pneumoniae* resistente à carbapenêmicos já é um achado endêmico no Brasil, de forma que as polimixinas, antes abandonadas devido a sua nefro e neurotoxicidade, ressurgiram como opções de tratamento frente a estes isolados multirresistentes. Apesar da técnica de microdiluição em caldo ser considerada o método de referência para detecção da susceptibilidade às polimixinas, ela acaba sendo impraticável na rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia, de forma que métodos mais reprodutíveis e mais comumente utilizados na rotina laboratorial, como o Etest®, necessitam ter sua confiabilidade comprovada de forma a gerar resultados seguros, uma vez que auxiliam no monitoramento epidemiológico e nas decisões terapêuticas do tratamento destas infecções multirresistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) entre os métodos de microdiluição em caldo e Etest® em isolados de *K. pneumoniae* produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KP-KPC). 85 amostras de *K. pneumoniae* foram isoladas de diferentes sítios de infecção durante um estudo epidemiológico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de abril até junho de 2017. A presença de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) nestas amostras foi confirmada através de PCR em tempo real. O método da microdiluição em caldo foi realizado conforme as orientações do CLSI e EUSCAST, enquanto o método do Etest® foi executado conforme as orientações do fabricante. Utilizou-se, para a categorização das amostras, o ponto de corte de resistência de  $>2\mu\text{g/mL}$  recomendado pelo BrCAST para polimixina B em enterobactérias. Foi observado, por comparação do Etest® com o método de referência, 1,7% de resultados falso-resistentes (*major error*), 3,5% de resultados falso-suscetíveis (*very major error*), 60% de concordância essencial entre as CIM e 95,3% de concordância de classificação entre os métodos. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o Etest® não é um método confiável para a determinação exata da susceptibilidade à polimixina B em KP-KPC, tanto devido a baixa concordância essencial entre as CIM quanto pelo índice de resultados falso-susceptíveis relatados. Considerando os resultados apresentados até o momento, aconselha-se utilizar o Etest® apenas como método de *screening* para classificação dos isolados em resistentes ou sensíveis, confirmando as CIM obtidas por meio da microdiluição em caldo.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, KPC, polimixina B, microdiluição em caldo, Etest, testes de susceptibilidade antimicrobiana.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> e carbapenemases .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Polimixinas .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1. Mecanismo de ação das polimixinas .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3. Mecanismos de resistência às polimixinas .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Testes de susceptibilidade .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1. Disco-difusão .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2. Microdiluição em caldo .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.3. Macrodiluição em caldo .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.4. Diluição em ágar .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.5. Etest®.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.6. Sistemas Automatizados.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>17</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Das amostras .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Identificação dos isolados quanto à espécie e produção de KPC .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Microdiluição em Caldo .....</b>	<b>18</b>
<b>4.5. Etest®.....</b>	<b>19</b>
<b>4.6. Critério de classificação dos isolados .....</b>	<b>19</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno oportunista e está entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* mais comumente isolada em infecções hospitalares. As infecções por este micro-organismo vêm se tornando de difícil tratamento atualmente, já que a maioria dos isolados clínicos exibem resistência a várias classes de antibióticos.<sup>1-4</sup>

Os  $\beta$ -lactâmicos são considerados a classe de antimicrobianos com maior sucesso terapêutico para tratamento de infecções bacterianas causadas por diferentes espécies e representam a classe de agentes antibacterianos mais frequentemente prescritos, porém, na década de 80, surgiram os primeiros relatos de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), sendo resistentes à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos, que se demonstraram estáveis frente à ação destas enzimas.<sup>2,5-9</sup> Entretanto, o uso intensivo dos carbapenêmicos levou a uma pressão seletiva e consequente surgimento de enterobactérias resistentes a estes antimicrobianos, principalmente devido a produção de carbapenemases.<sup>9,10</sup>

Nos últimos anos, a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), uma enzima serino  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeos capaz de hidrolisar carbapenêmicos e outros  $\beta$ -lactâmicos, tem se demonstrado um achado crescente mundialmente. Embora esta enzima seja mais frequentemente relatada em isolados de *K. pneumoniae*, ela já foi identificada em diversas espécies clinicamente relevantes de enterobactérias, sendo a carbapenemase mais frequentemente observada em *Enterobacteriaceae*.<sup>9,11,12</sup> Os plasmídeos que carregam a KPC geralmente também são portadores de genes de resistência para outras classes de antibióticos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.<sup>11</sup>

Atualmente, a KPC está entre as três  $\beta$ -lactamases de maior importância clínica e epidemiológica mundiais, juntamente com NDM e OXA-48.<sup>9</sup> No Brasil, o primeiro caso de KPC ocorreu em 2006, dez anos após o primeiro relato mundial desta enzima, em 1996. Atualmente, enterobactérias produtoras de KPC já são um achado endêmico no país, sendo a *K. pneumoniae* a espécie mais frequente relatada dentre as produtoras desta enzima. Outros países que apresentam uma elevada prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de KPC (KP-KPC) incluem Estados Unidos, Colômbia, Itália, Grécia e China.<sup>7,9,12</sup>

Considerando a rápida e ampla disseminação de isolados produtores de KPC e a falta de recursos terapêuticos para tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos, as polimixinas, que tiveram o seu uso abandonado na década de 70 principalmente devido a sua nefrotoxicidade, ressurgiram como opções terapêuticas no tratamento destes isolados

multiresistentes.<sup>10</sup> Em 2009, o programa de vigilância epidemiológica SENTRY realizou uma pesquisa global que reportou baixos índices de resistência às polimixinas em patógenos Gram-negativos. Todavia, um crescente aumento a resistência para *K. pneumoniae* a estes antibióticos já vem sendo observado, provavelmente devido ao uso extensivo de polimixinas no tratamento de isolados multirresistentes. Apesar de estarem disponíveis para uso há décadas, ainda não há consenso sobre os pontos de corte de susceptibilidade destes agentes e nem sobre o método ideal para testagem da susceptibilidade.<sup>13</sup> A microdiluição em caldo é considerada o método de referência para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e do perfil de susceptibilidade às polimixinas, porém é laboriosa e requer pessoal especializado, de forma que esta técnica pode não ser adequada para o emprego na rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia.<sup>14</sup> Embora não seja considerado um método de referência, o Etest® é largamente usado nos laboratórios clínicos, por ser de fácil execução.<sup>15,16</sup>

Dessa forma, considerando a situação epidemiológica atual, há uma necessidade eminente de comprovar a confiabilidade dos diferentes testes de susceptibilidade às polimixinas disponíveis, não apenas para guiar o tratamento clínico, mas também para monitorar os níveis de resistência a esse antimicrobiano e implementar medidas de controle de infecção.<sup>16,17</sup> Neste trabalho, comparou-se a performance do Etest® com a microdiluição em caldo para a avaliação do perfil de susceptibilidade à polimixina B em isolados de KP-KPC.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Klebsiella pneumoniae* e carbapenemases

*Klebsiella pneumoniae* são bacilos Gram-negativos presentes normalmente na microbiota humana e ubíquos na natureza, sendo encontrados no solo, vegetação e água. São integrantes da família *Enterobacteriaceae* e se caracterizam por serem fermentadores de glicose, anaeróbios facultativos, imóveis, catalase positivos e oxidase negativos, possuindo exigências nutricionais simples que permitem o crescimento rápido em uma variedade de meios de cultura.<sup>1,2,10</sup>

Em infecções comunitárias são agentes infecciosos importantes, mas pouco frequentes, sendo responsáveis por infecções do trato urinário, respiratório e abscessos. Entretanto, são patógenos oportunistas e consequentes agentes comuns de infecções nosocomiais, principalmente em pacientes usuários de aparelhos respiratórios e cateteres urinários. De fato, as espécies de *Klebsiella* (*K. pneumoniae* e *K. oxytoca*) foram os terceiros patógenos mais comumente relatados ao *National Healthcare Safety Network* vinculado ao *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) no período de 2011 a 2014, dentre todos os casos de infecções da corrente sanguínea, pneumonia associada a aparelhos respiratórios, infecções do trato urinário associadas a catéter e infecções de sítio cirúrgico. O CDC, ainda, indicou as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, dentre as quais a espécie mais frequente é *K. pneumoniae*, como uma das três maiores ameaças de resistência bacteriana no ano de 2013.<sup>1,3,8</sup>

Em meados dos anos 80, emergiram os primeiros relatos de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos, levando a ineficácia terapêutica destes agentes. Nesse contexto, os carbapenêmicos foram instituídos como tratamento de escolha para estes isolados multirresistentes.<sup>2,6-8</sup> Todavia, o uso extensivo de carbapenêmicos nas últimas décadas levou ao surgimento de resistência a estes antimicrobianos, principalmente por carbapenemases.<sup>10</sup>

Dentre as carbapenemases, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) destaca-se como uma das mais clinicamente importantes presentes em enterobactérias, tanto pela elevada taxa de hidrólise aos carbapenêmicos quanto pela preocupante disseminação global. É uma

enzima mediada por plasmídeo, primeiramente descoberta nos Estados Unidos, em 1996. Embora sua denominação esteja associada à *K. pneumoniae*, micro-organismo no qual foi detectado pela primeira vez, esta enzima já foi relatada em diversas espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Por serem capazes de hidrolisar todas as cefalosporinas, monobactâmicos, penicilinas e carbapenêmicos, restam poucas opções terapêuticas de antimicrobianos que apresentem eficácia frente a isolados portadores desta enzima. A maioria ainda é sensível às polimixinas, tigeciclina e alguns aminoglicosídeos, mas já existem relatos de resistência mesmo a estas últimas opções terapêuticas.<sup>2,10,18</sup> No Brasil, o primeiro relato de detecção de KPC ocorreu em 2006. Até o momento, dentre as 21 variantes já descritas desta enzima, a KPC-2 é a única descrita no país, sendo relatada em múltiplas espécies de enterobactérias e disseminada por todo o território nacional.<sup>7,18</sup>

A disseminação de isolados produtores de KPC é preocupante, visto que uma maior mortalidade é relatada em infecções causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, quando comparada a infecções causadas por isolados sensíveis a estes antibióticos. Segundo dados de vigilância epidemiológica do SENTRY, *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos já se mostraram um achado endêmico no Brasil, de forma que a polimixina B atualmente é amplamente utilizada no combate a infecções causadas por esse patógeno. Um estudo de Bartolleti *et. al* demonstrou que, em São Paulo, houve um aumento significativo da resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* no período de 2011 a 2015, saltando de 6,8% para 35,5%.<sup>18,19</sup> Infecções hospitalares relacionadas a estes microrganismos resistentes também estão associadas a uma maior morbidade, tempo de hospitalização e custo, configurando um alarmante problema de saúde pública mundial.<sup>3,10,18</sup>

## 2.2. Polimixinas

As polimixinas são um grupo de antimicrobianos polipeptídicos catiônicos originalmente isolados de *Paenibacillus polymyxa*, em 1947. O grupo é composto de cinco compostos distintos (denominados polimixina A, B, C, D e E), mas apenas a polimixina B e a colistina (polimixina E) são utilizados na prática clínica e estão comercialmente disponíveis, em virtude da grande toxicidade das demais.<sup>10,20-24</sup> Possuem rápida atividade bactericida e espectro de ação contra diversas espécies de bactérias Gram-negativas, não sendo efetivas contra germes anaeróbios, gram-positivos e fungos. Alguns micro-organismos como *Moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Proteus spp.*, *Burkholderia capacia*, *Neiseria*

spp., *Vibrio* spp. e *Brucella* spp. são intrinsicamente resistentes à esta classe de antibióticos.<sup>13,20,22,25</sup>

Estruturalmente, as polimixinas possuem como estrutura básica um anel polipeptídico contendo uma cadeia lateral tripeptídea ligada a um ácido graxo pela porção N-terminal. A diferença estrutural entre a polimixina B e a colistina é de apenas um aminoácido no anel polipeptídico: uma D-fenilalanina está presente na polimixina B, enquanto na colistina há uma D-leucina na posição 6 do anel.<sup>2,13,20,24,26</sup> A polimixina B é composta por cinco grupos amino primários e se apresenta positivamente carregada em pH fisiológico. É encontrada na forma de mistura de pelo menos quatro componentes, polimixina B1 a polimixina B4, diferindo estas apenas pelo ácido graxo ligado à molécula, sendo as polimixinas B1 e B2 de composição majoritária.<sup>23,25</sup> A polimixina B é administrada como um fármaco ativo, na forma de sulfato de polimixina, enquanto a colistina é administrada na forma do pró-fármaco colimestimato de sódio, sendo convertido no composto ativo *in vivo* através de hidrólise.<sup>13,20,22,27</sup>

O caráter anfipático das polimixinas permite que estas atinjam boas concentrações séricas e também que interajam com a membrana externa de LPS dos organismos Gram-negativos. São submetidas à extensa reabsorção tubular, com baixas concentrações detectadas na urina e possuem vias de eliminação não-renal como predominante.<sup>6,10,13,23,25</sup>

As polimixinas possuem atividade bactericida concentração-dependente, assim como toxicidade.<sup>20</sup> O uso desta classe de antibióticos é limitado principalmente pela nefrotoxicidade, acarretando insuficiência renal aguda, que pode emergir como efeito adverso em mais da metade dos usuários.<sup>22,28</sup> Dois estudos recentes, que utilizaram uma grande amostragem de pacientes, demonstraram que os índices de toxicidade renal são menores na polimixina B do que na colistinina.<sup>13</sup> Supõe-se que o mecanismo de lesão renal ocorra de forma semelhante ao mecanismo de ação da droga com a membrana externa bacteriana. Ocorreria um aumento da permeabilidade da membrana das células tubulares renais, levando ao edema e lise celular.<sup>20,22</sup> A neurotoxicidade é outro efeito adverso importante, que se dá através da ativação de apoptose múltipla e vias inflamatórias neuronais, e em alguns casos pode levar ao bloqueio muscular com insuficiência respiratória. Assim como na nefrotoxicidade, o quadro é revertido com a suspensão da droga. Suspeita-se que o mecanismo de neurotoxicidade esteja relacionado com uma inibição competitiva da acetilcolina na fenda pré-sináptica, levando a depleção de cálcio intracelular que conseqüentemente induziria uma despolarização prolongada.<sup>20,22,27</sup>

### 2.2.1. Mecanismo de ação das polimixinas

O mecanismo de ação das polimixinas tem como alvo os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana celular externa dos organismos Gram-negativos. Por meio de uma interação eletrostática entre a parte positivamente carregada da molécula e a porção negativamente carregada de LPS da membrana externa, ocorre o deslocamento competitivo dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , responsáveis pela estabilidade da estrutura celular da membrana. Dessa forma, ocorre um rápido aumento de permeabilidade devido à desestabilização do LPS, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e conseqüente morte celular. O ácido graxo presente na cadeia lateral também contribui para a ação bactericida, uma vez que sua interação com o LPS favorece a inserção da polimixina na membrana externa. O mecanismo de ação das polimixinas também propicia uma atividade antiendotoxina, visto que o lipídeo A, um dos componentes do LPS e responsável pela endotoxicidade em bactérias Gram-negativas, acaba sendo neutralizado pela ligação do fármaco com o LPS quando este é liberado durante a lise celular. Além dos mecanismos já citados, as enzimas respiratórias vitais NADH-quinona oxireduases II presentes na membrana interna bacteriana também são inibidas pelas polimixinas.<sup>6,10,13,17,20-22,25,29</sup>

### 2.2.3. Mecanismos de resistência às polimixinas

Múltiplos mecanismos moleculares envolvendo resistência às polimixinas já foram caracterizados em diversas espécies bacterianas. Dentre as enterobactérias, mecanismos de resistência adquiridos já foram identificados em diversos gêneros, como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Enterobacter*. A maioria desses mecanismos envolve alterações no lipídeo A que dificultam a interação deste com as polimixinas, de forma semelhante ao que ocorre nas espécies que possuem resistência intrínseca a esse antibiótico, como *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens*. Polimixina B e colistina apresentam resistência cruzada.<sup>6,10,13,17,25</sup>

As alterações no LPS são reguladas por dois sistemas de dois componentes: PhoP-PhoQ e PmrA-PmrB. Esses sistemas estão envolvidos com a adição de fosfoetanolamina e de L-4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) às porções negativamente carregadas do LPS, diminuindo assim a sua carga aniônica e a sua afinidade de ligação às polimixinas. Ambos os sistemas estão relacionados com a proteína PmrD e são ativados em resposta a estímulos de diminuição de pH, diminuição da concentração de magnésio e aumento das concentrações de

ferro e alumínio, permitindo que a célula sobreviva a fagocitose pelos macrófagos. O sistema PmrAB é ativado via fosforilação, e logo em seguida ativa a transcrição do óperon pmrCAB, seguido do óperon pmrHFIJKLM e por fim do gene pmrE. O sistema PhoP-PhoQ, além de também ativar a transcrição do óperon pmrHFIJKLM, pode ativar uma pequena proteína ligada a ele, a proteína PmrD, que protege PmrA da desfosforilação, promovendo a adição de fosfoetanolamina ao LPS.<sup>10,13,25</sup>

As porinas também possuem um papel determinante na resistência às polimixinas. Em *Salmonella enterica*, já foi relatado que uma interação entre a proteína periplasmática *YdeI*, regulada pelos sistemas PhoPQ e PmrAB, e a porina OmpD pode aumentar a resistência às polimixinas nessa espécie.<sup>13</sup>

Em *Klebsiella pneumoniae*, já foi constatado que a presença de cápsula possui um papel importante na resistência às polimixinas. Um polissacarídeo capsular atua como uma barreira protetora, e sua hiperprodução mascara os sítios de ligação às polimixinas, reduzindo as interações destas drogas com a superfície bacteriana e, conseqüentemente, contribuindo para a resistência a estes antimicrobianos.<sup>6,10,13,25</sup>

Ainda em *K. pneumoniae*, a hiperexpressão do regulador intrínseco *ramA* está associada com a regulação da permeabilidade celular. Essa alteração é responsável por modular bombas de efluxo, diminuir a síntese de porinas, além de levar a modificações no lipídio A de LPS. Estas alterações não apenas parecem estar relacionadas com uma maior resistência às polimixinas, mas também a tigeciclina, outro antibiótico utilizado como último recurso no tratamento contra isolados resistentes à carbapenêmicos.<sup>13,30</sup>

Pode-se ainda citar como mecanismo de resistência a aquisição do gene mediado por plasmídeos *mcr-1*, responsável pela transmissão horizontal de resistência às polimixinas, descrito primeiramente em isolados chineses de enterobactérias e reportado mundialmente na atualidade. A enzima codificada a partir deste gene adiciona uma fosfoetanolamina ao lipídeo A, tornando o LPS mais catiônico e levando a uma menor interação com as polimixinas, de forma similar ao descrito para os sistemas PhoPQ e PmrAB.<sup>3,13,17</sup>

No Brasil, até o momento, o mecanismo de resistência às polimixinas mais frequentemente observado em *K. pneumoniae* se dá através de mutações *missence* ou da inserção de sequências que interrompem o gene *mgrB*.<sup>7</sup> Entretanto, é muito provável que a resistência às polimixinas em isolados clínicos seja consequência de não apenas um, mas de vários mecanismos de resistência atuando em conjunto.<sup>13</sup>

### 2.3. Testes de susceptibilidade

Apesar das polimixinas estarem clinicamente disponíveis para uso há décadas, apenas em 2005 o CLSI aprovou o primeiro documento oficial para testes de susceptibilidade para estes antimicrobianos.<sup>15,31</sup>

Atualmente, já foram publicados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) pontos de corte para *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacteriaceae*, mas apenas para a colistina. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicou pontos de corte de polimixina B e colistina para as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., não possuindo indicações de pontos de corte para *Enterobacteriaceae*, apesar de ter publicado valores epidemiológicos de *cutoff* de colistina para algumas enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.<sup>13,26,32</sup> O *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) possui um ponto de corte para polimixina B em enterobactérias, estabelecido como de  $>2\mu\text{g/mL}$  para isolados resistentes.<sup>33</sup>

Existem vários desafios envolvendo a avaliação da susceptibilidade às polimixinas, incluindo sua propriedade catiônica inerente, pouca difusão do fármaco no ágar e a presença de heteroresistência às polimixinas em diversos micro-organismos.<sup>13</sup>

#### 2.3.1. Disco-difusão

Método qualitativo, primeiramente descrito por Kirby Bauer, que fornece resultados definidos em três categorias: sensível, intermediário e resistente.<sup>15</sup> Semeia-se uniformemente um inóculo da bactéria desejada, na concentração padronizada na escala 0,5 de McFarland, sobre a superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Após a semeadura da placa, aplica-se sobre o ágar um disco de papel comercial que contém uma concentração definida do antimicrobiano a ser avaliado. As placas então devem ser incubadas em estufa bacteriológica, normalmente a 35°C, onde, durante a incubação, ocorre a difusão da droga, que forma um gradiente de concentração decrescente em torno do disco. Caso a bactéria seja sensível ao antibiótico, é observado um halo de inibição do crescimento na região onde a droga estiver presente em concentração adequada para tal. Após terminado o tempo de incubação, que varia para diferentes germes, mede-se o diâmetro da zona de inibição e este é comparado com os

pontos de corte estabelecidos, definindo se o isolado se enquadra na categoria de sensível, intermediário ou resistente ao antibiótico.<sup>15,32</sup>

É um teste barato e de fácil execução, que não necessita de aparelhagem específica, e por esses motivos geralmente é utilizado como método primário para realizar *screening* em um grande número de isolados, sendo o método mais empregado na rotina dos laboratórios de microbiologia.<sup>13,15</sup> Entretanto, para as polimixinas, há evidências de que esse não é um teste confiável para avaliação da susceptibilidade, pois essas difundem fraca e vagarosamente no ágar, levando ao surgimento de zonas mínimas de inibição. Estudos anteriores mostram que esse método pode constatar um alto índice de falsa susceptibilidade, também denominado *very major error*, de até 35% comparado com outros métodos de diluição.<sup>13,31</sup>

### **2.3.2. Microdiluição em caldo**

Técnica quantitativa, na qual uma suspensão bacteriana a uma concentração predefinida, geralmente ajustada a 0,5 de McFarland, é diluída em caldo Mueller-Hinton e testada contra diferentes concentrações do antimicrobiano de interesse. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, pipeta-se 50µl da suspensão bacteriana e 50µl de diferentes concentrações do antimicrobiano em cada poço da placa. Após preparação, as placas são submetidas à incubação em estufa bacteriológica por tempo e temperatura adequados, procedendo-se então a leitura visual da CIM. A visualização de poços límpidos indica a eficácia do antimicrobiano em inibir o crescimento bacteriano, enquanto que os poços turvos indicam crescimento bacteriano. A leitura da CIM é a correspondente ao poço de menor concentração de antimicrobiano que apresente ausência de crescimento bacteriano.<sup>13,15</sup>

É considerado o método de referência para determinação da CIM, e até o momento é o único recomendado pelo CLSI e EUCAST para testes de susceptibilidade às polimixinas. Todavia, é um método trabalhoso, e a sua preparação, caso não se faça uso de um método automatizado, pode levar a erros significativos. Por esses motivos, acaba sendo um método não adaptável à rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia.<sup>13,26</sup>

### **2.3.3. Macrodiluição em caldo**

Técnica quantitativa, também conhecida como método da diluição em tubos. É muito semelhante à microdiluição em caldo, tanto na leitura dos resultados quanto na preparação da

técnica e nos materiais necessários para a realização da mesma, com a única diferença que são utilizados tubos de ensaio ao invés de microplacas, e dessa maneira, o volume de caldo utilizado é maior, sendo de aproximadamente 1mL. Cada tubo deve possuir uma concentração diferente do antimicrobiano a ser avaliado para possibilitar a leitura da CIM.<sup>13,15</sup>

#### **2.3.4. Diluição em ágar**

Técnica quantitativa, semelhante às diluições em caldo, tendo como principal diferença o fato de que o antimicrobiano é adicionado ao meio de cultura antes da solidificação deste na placa de Petri. Placas com diferentes concentrações do antimicrobiano são preparadas e logo em seguida, semeadas com a bactéria de interesse e submetidas à incubação em estufa bacteriológica por tempo e temperatura determinados. Após, realiza-se a inspeção visual das placas, sendo que a ausência de crescimento bacteriano indica inibição pelo antimicrobiano.<sup>15</sup>

Uma vantagem desse método é a possibilidade de testar vários isolados por placa. Entretanto, é um método muito laborioso caso não seja automatizado, além de que as placas produzidas para o teste devem ser usadas em até uma semana após o preparo.<sup>13</sup>

#### **2.3.5. Etest®**

Técnica quantitativa, na qual finas tiras de plástico, impregnadas com um gradiente de concentração de determinado antimicrobiano são colocadas sobre uma placa de Mueller-Hinton, anteriormente semeada com uma suspensão bacteriana na concentração de 0,5 de McFarland. A semeadura é realizada com o auxílio de um *swab* de algodão estéril em toda a placa, por três vezes em diferentes direções, para assegurar um crescimento confluyente. Após a secagem do inóculo, que leva aproximadamente dez minutos, coloca-se a fita de Etest® na placa com o auxílio de uma pinça. A CIM é então determinada após a incubação das placas em tempo e temperatura adequados, geralmente por 16 a 24 horas sob temperatura de  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . Durante a incubação, ocorre a difusão do antibiótico no meio, mantendo os gradientes de concentração correspondentes aos impressos na fita. Observa-se então um halo de inibição de crescimento em forma de elipse, no qual o valor da CIM corresponde ao ponto de intersecção entre a fita de Etest® e a menor zona de inibição do crescimento bacteriano. Trata-se de um método de simples e rápida execução, porém apresenta um custo maior em comparação aos métodos quantitativos de diluição.<sup>13,15</sup>

### 2.3.6. Sistemas Automatizados

O uso de equipamentos automatizados pode diminuir o tempo de realização dos testes em comparação com os métodos manuais, já que os sistemas de detecção óptica destes equipamentos são capazes de detectar diferenças muito sutis no crescimento bacteriano. Estes equipamentos são acoplados a *softwares* eletrônicos para interpretar os resultados dos testes.<sup>13,15</sup> Estão disponíveis, até o momento, quatro sistemas automatizados capazes de mensurar a susceptibilidade às polimixinas.<sup>13</sup>

O sistema Vitek 2® (bioMérieux) realiza medidas cinéticas para mensurar o crescimento bacteriano frente a agentes antimicrobianos, através de cartões plásticos que já contém em seus poços diferentes concentrações do antibiótico de interesse liofilizado juntamente com o meio de teste. Após o preparo da suspensão bacteriana, a inoculação é feita por meio de uma microtubulação por aspiração, e direcionada aos cartões. Estes são incubados por tempo e temperatura controlada, no qual o equipamento realiza a leitura do crescimento bacteriano a cada 15 minutos por meio de turbidimetria. Dessa forma, a determinação da CIM pode ocorrer em até 6 a 8 horas para maioria dos patógenos significantes.<sup>13,15</sup>

O sistema MicroScan® (Beckman Coulter Diagnostics) faz uso de um painel semelhante a microplaca da diluição em caldo, sendo inoculados manualmente e incubados na unidade de leitura e incubação do equipamento, obtendo-se os resultados entre 16 a 20 horas após a incubação, ou até mesmo antes. É capaz de comportar 40 ou no máximo 96 painéis.<sup>13,15</sup>

O sistema Phoenix® (BD Diagnostics) possui um grande leitor-incubador, podendo acomodar até 100 painéis simultâneos de testes. Estes contêm 136 pequenos poços, que possibilitam a testagem de 16 a 25 antimicrobianos, sendo possível também, concomitantemente, realizar a identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizando poços que contenham substratos bioquímicos para este fim. Emprega um indicador de oxidação-redução para medir o crescimento bacteriano, que é incorporado ao caldo, e os resultados de CIM são obtidos entre 6 a 16 horas.<sup>13,15</sup>

O sistema Sentitire® (Thermo Fisher Scientific) é um sistema de incubação e leitura automatizada, no qual os testes de susceptibilidade são feitos através do uso de placas semelhantes às utilizadas no método da microdiluição em caldo, contendo o antimicrobiano de interesse liofilizado em uma série de diferentes diluições nos poços da placa. O crescimento bacteriano é analisado após uma incubação de 18 a 24 horas.<sup>13</sup>

### 3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é determinar o perfil de susceptibilidade de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC frente à polimixina B, comparando os resultados obtidos pelo Etest® com a microdiluição em caldo, atual método de referência para determinação da CIM de polimixinas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Das amostras

Foram utilizados isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos por meio de um estudo de vigilância epidemiológica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Até o presente momento da realização deste trabalho, foram analisados 85 isolados, obtidos do período de abril a junho de 2017. As amostras são provenientes de diferentes sítios infecciosos, como urina, sangue, secreções respiratórias e outros.

### 4.2. Identificação dos isolados quanto à espécie e produção de KPC

A identificação dos isolados foi realizada pelo setor de microbiologia do hospital, pelo sistema Vitek 2®. Todas as amostras foram identificadas como produtoras de KPC por meio da técnica de PCR em tempo real segundo Monteiro *et al* (2012).<sup>34</sup>

### 4.3. Microdiluição em Caldo

A técnica de microdiluição em caldo foi realizada segundo as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Utilizou-se *Escherichia coli* ATCC® 25922 como controle de qualidade do teste. Tanto as amostras quanto o controle foram realizados em duplicata.

50µL de caldo Mueller-Hinton cátion ajustado foi pipetado em uma placa estéril de microtitulação de 96 poços, nos poços das colunas numeradas de 3 a 11. Na 12ª coluna, pipetou-se 100µL do mesmo caldo para servir de controle negativo do teste. Logo após, pipetou-se 100µL de solução de polimixina B previamente preparada na concentração de 128µg/mL nos poços da 2ª coluna e procedeu-se a diluição seriada, pipetando 50 µL da solução anterior do antibiótico por 10 vezes nos poços seguintes em ordem crescente, até o 11º, a fim de obter concentrações de polimixina B variáveis de 64 a 0,125 µg/mL. Após o preparo das placas, realizou-se os inóculos de cada amostra, ajustando estas com solução salina para corresponderem a concentração a 0,5 da escala de McFarland (1 a 2 x10<sup>8</sup> UFC/mL), com o auxílio de densitômetro. 50µL desses inóculos foram pipetados nos poços

da coluna 2 a 11 na placa, sendo que na 1<sup>o</sup> pipetou-se 100 µL para servir de controle positivo do teste.

O resultado do teste foi lido após incubação da placa em estufa a 35±2°C por um período de 16 a 20 horas. Avaliou-se visualmente qual o primeiro poço que não apresentasse crescimento visível e a concentração relacionada a este foi definida como a CIM da amostra. No caso de discrepância dentre as duplicatas, considerou-se a concentração de maior valor.

#### 4.5. Etest®

Foi realizado teste de susceptibilidade através da técnica da fita de Etest® (bioMérieux), conforme as recomendações do fabricante para todas as amostras clínicas. A partir de uma colônia fresca, procedeu-se a inoculação da amostra em meio salino para ajuste da concentração ao equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1 a 2 x10<sup>8</sup> UFC/mL), com o auxílio de densitômetro. Após, fez-se a semeadura desta utilizando um *swab* em placa de ágar Mueller-Hinton em três direções diferentes. Aguardou-se alguns minutos para que o inóculo fosse absorvido completamente pelo ágar e então se adicionou a fita de Etest® com o auxílio de uma pinça. As placas foram encubadas em estufa a 35±2°C por um período de 18 a 22 horas e o resultado da CIM foi analisado através da visualização do ponto de intercessão entre a zona de inibição de crescimento do micro-organismo e a zona da fita de concentração correspondente. Nos casos em que houve dúvida na leitura, leu-se a concentração logo acima.

#### 4.6. Critério de classificação dos isolados e tipos de erros

Para classificação das amostras quanto à sensibilidade ao antimicrobiano, como a atual edição do CLSI ainda não dispõe de pontos de corte específicos de polimixinas para enterobactérias, utilizou-se os valores recomendados de polimixina B para *Enterobacteriaceae* fornecidos pelo BrCAST, equivalentes ao recomendado para colistina pelo EUCAST, que estabelece como sensíveis os isolados que apresentam CIM ≤2µg/mL, e como resistentes os que apresentam CIM >2µg/mL, não classificando, desta forma, nenhum isolado como intermediário.

Consideraram-se como *major error* os resultados em que o Etest® apresentou falsa resistência em relação à microdiluição em caldo, e como *very major error* os resultados apresentados pelo Etest® como falsamente sensíveis frente ao método de referência. Não há como calcular o índice de *minor error*, visto que é definido como a discrepância entre os

métodos em classificar as amostras entre sensível e intermediária ou entre resistente e intermediária, e o critério de classificação adotado permite apenas diferenciar os isolados como sensíveis ou resistentes. Considerou-se como concordância essencial quando o Etest® apresentou um valor de CIM igual ou com apenas uma diluição de diferença, para mais ou para menos, em relação ao método de referência.

## 5. RESULTADOS

No presente trabalho, 26 (30,6%) dos isolados de KP-KPC se mostraram resistentes à polimixina B e 59 (69,4%) dos isolados apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano segundo o método de referência. Já pelos valores de CIM fornecidos pelo Etest®, 24 (28,2%) dos isolados seriam classificados como resistentes à polimixina B e 61 (71,8%) como sensíveis.

**Tabela 1.** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest® quanto a categorização das amostras e índices de performance do Etest® em comparação com o método de referência.

Método	Categorização (%)		Nº de CC (%)	Nº de CE (%)	Nº de ME (%)	Nº de VME (%)
	R	S				
Microdiluição em caldo	26 (30,6)	59 (69,4)	81 (95,3)	51 (60,0)	1 (1,2)	3 (3,5)
Etest®	24 (28,2)	61 (71,8)				

R: resistente; S: sensível; CC: concordâncias categóricas; CE: concordância essencial entre os valores de CIM, ME: *major error*, VME: *very major error*

O índice de concordância categórica entre os métodos mostrou-se adequado (95,3%). Houve um pequeno e aceitável índice de *major errors* (1,2%), porém foi encontrado um índice de *very major errors* (3,5%) acima do recomendado. A concordância essencial do Etest® mostrou-se consideravelmente baixa (60%).

A partir dos resultados obtidos, observou-se neste estudo que o Etest® não atingiu os níveis de performance recomendados pelo CLSI para sistemas comerciais de avaliação da susceptibilidade antimicrobiana ( $\geq 90\%$  de concordância categórica,  $\geq 90\%$  de concordância essencial,  $\leq 1,5\%$  de *very major errors*,  $\leq 3,0\%$  de *major errors*).

As estatísticas referentes aos valores de MIC encontrados podem ser visualizados na tabela 2.

**Tabela 2.** Estatísticas referentes aos valores obtidos de CIM para a microdiluição em caldo e Etest®, juntamente com o coeficiente de correlação de Spearman do Etest® para a microdiluição em caldo.

	Microdiluição em caldo (µg/mL)	Etest® (µg/mL)	Coeficiente de correlação de Spearman
CIM modal	0,125	0,5	
Menor CIM	0,125	0,19	
Maior CIM	32,0	48,0	0,562*
CIM <sub>50</sub>	0,25	0,5	
CIM <sub>90</sub>	32,0	24,0	

\*Utilizando P < 0,001

O coeficiente de correlação de Spearman encontrado (0,562) indica que há uma correlação moderada a forte entre os valores de CIM obtidos pelo Etest® em relação aos da microdiluição em caldo.

Pelos dados apresentados na tabela acima, percebe-se que há, na maioria dos casos, uma aparente superestimação dos resultados de CIM apresentados pelo Etest® em comparação com os resultados da microdiluição em caldo. De fato, dentre os resultados entre os métodos que foram discrepantes, 73,5% das discordâncias foram devido a superestimações, enquanto apenas 26,5% das discordâncias entre CIM foram devido a subestimações.

Entretanto, dentre as amostras classificadas como resistentes a polimixina B, observou-se uma tendência a subestimação dos resultados de CIM, enquanto para as amostras sensíveis houve uma maior tendência a superestimação dos resultados de CIM pelo Etest®.

A relação completa das CIM de cada teste para todas as amostras deste estudo e suas respectivas classificações quanto à susceptibilidade apresenta-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Relação completa de tipo de amostra, CIM e categorização quanto à resistência ou sensibilidade à polimixina B pela microdiluição em caldo e Etest® em todos os isolados do estudo.

Nº da Amostra	Tipo de amostra	CIM (µg/mL)	Categoria pela CIM	CIM Etest® (µg/mL)	Categoria pelo Etest®
1	Urina	1	S	0,5	S
2	Urina	8	R	8	R
3	Urina	1	S	0,75	S
4	Urina	16	R	16	R
5	Urina	0,125	S	0,5	S
6	Urina	4	R	12	R
7	Urina	0,25	S	0,5	S
8	Hemocultura de catéter	16	R	16	R
9	Urina	0,25	S	0,38	S
10	Urina	0,25	S	0,38	S
11	LBA	0,5	S	0,5	S
12	Urina	0,5	S	1,5	S
13	Escarro	2	S	0,5	S
14	Urina	0,25	S	0,5	S
15	Urina	0,5	S	0,75	S
16	Urina	0,25	S	0,5	S
17	Urina	0,125	S	0,75	S
18	Líquido folicular	0,25	S	1,5	S
19	Escarro	0,25	S	2	S
20	Urina	0,25	S	0,75	S
21	Urina	0,25	S	0,5	S
22	Hemocultura	16	R	16	R
23	Urina	16	R	16	R
24	Hemocultura	32	R	32	R
25	Urina	0,25	S	0,5	S
26	Urina	0,25	S	1,5	S
27	Secreção abdominal	4	R	12	R
28	Urina	0,25	S	1	S
29	Urina	0,125	S	1	S
30	Urina	2	S	0,38	S
31	Urina	2	S	0,5	S
32	Urina	0,5	S	0,5	S
33	Urina	32	R	24	R
34	Urina	2	S	0,5	S
35	Secreção do quadril	0,5	S	0,5	S
36	Urina	0,125	S	0,38	S
37	Urina	32	R	32	R
38	Secreção traqueal	0,5	S	0,38	S
39	Líquido de ascite	0,125	S	0,75	S
40	Urina	0,125	S	0,5	S
41	Urina	0,25	S	0,38	S

*continua*

**Tabela 4.** Relação completa de tipo de amostra, CIM e categorização quanto à resistência ou sensibilidade à polimixina B pela microdiluição em caldo e Etest® em todos os isolados do estudo

*continuação*

Nº da Amostra	Tipo de amostra	CIM (µg/mL)	Categoria pela CIM	CIM Etest® (µg/mL)	Categoria pelo Etest®
42	Escarro	32	R	12	R
43	Urina	0,125	S	0,31	S
44	Urina	0,25	S	0,38	S
45	Sangue	32	R	0,38	S
46	Urina	0,25	S	0,75	S
47	Urina	0,25	S	0,5	S
48	Urina	8	R	0,38	S
49	Escarro	8	R	0,38	S
50	Ascite	32	R	16	R
51	Urina	16	R	24	R
52	Urina	0,25	S	0,38	S
53	Urina	16	R	32	R
54	Sangue	0,125	S	0,38	S
55	Sangue	0,5	S	0,75	S
56	Fibrose	0,125	S	0,5	S
57	Urina	0,125	S	0,19	S
58	Urina	0,125	S	0,5	S
59	Hemocultura	0,125	S	0,5	S
60	Urina	0,125	S	0,38	S
61	Hemocultura	0,125	S	0,38	S
62	Urina	16	R	16	R
63	Urina	32	R	48	R
64	Hemocultura	0,125	S	24	R
65	Urina	16	R	12	R
66	Urina	32	R	24	R
67	Escarro cateter	0,125	S	0,5	S
68	Hemocultura	0,125	S	0,5	S
69	LBA	32	R	24	R
70	Urina	32	R	8	R
71	Urina	0,25	S	0,38	S
72	Urina	0,25	S	0,5	S
73	Aspirado traqueal	0,125	S	0,5	S
74	Fragmento de biópsia	16	R	12	R
75	Hemocultura	0,125	S	1,5	S
76	Urina	0,125	S	2	S
77	Urina	0,25	S	0,38	S
78	Urina	0,125	S	0,38	S
79	Líquido de Ascite	1	S	0,5	S
80	Urina	16	R	8	R
81	Urina	32	R	32	R
82	Escarro	0,125	S	0,5	S
83	Urina	0,125	S	0,5	S
84	Urina	0,125	S	0,5	S
85	Urina	0,125	S	0,5	S

LBA: lavado brônquio-alveolar; R: resistente; S: sensível.

## 6. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar uma discrepância entre os resultados de CIM obtidos pela microdiluição em caldo e Etest®.

Utilizando-se do método de referência, um total de 26 (30,6%) dos isolados foram classificados como resistentes, enquanto que 24 (28,2%) dos isolados enquadraram-se nesta categoria segundo os resultados obtidos pelo Etest®. Como possíveis responsáveis pela variabilidade dos métodos, pode-se citar o impacto dos materiais utilizados na determinação da CIM. A resistência a polimixina B nos microorganismos é regulada pelo sistema de dois componentes PhoPQ-PmrAB, que é modulado conforme fatores como pH e concentração iônica, como já descrito anteriormente. Por este motivo, e também devido ao caráter catiônico da polimixina B, o CLSI recomenda o uso de caldo Mueller-Hinton cátion ajustado para realização do teste de microdiluição em caldo.<sup>13</sup> A diminuição nos valores de resistência observada neste trabalho para o Etest® pode, em teoria, ser devido ao fato de que as moléculas de polimixinas, pelo seu tamanho e carga catiônica inerente, não difundem adequadamente pelo ágar.<sup>35</sup> Assim, teoricamente, a utilização de um ágar que também tivesse ajuste de cátion para os testes de susceptibilidade do Etest® poderia melhorar a difusão das polimixinas no meio, de forma a contornar este problema.

Alguns estudos ainda indicam que as polimixinas podem aderir as cargas negativas das placas utilizadas na microdiluição em caldo, influenciando assim nos resultados da CIM.<sup>13,36</sup> Contudo, não há nenhuma recomendação do CLSI quanto a natureza e tratamento das placas utilizadas para a microdiluição em caldo, podendo haver variabilidade significativa entre diferentes laboratórios quando na utilização deste método de referência.<sup>13</sup>

Apesar da porcentagem encontrada de *very major errors* (3,5%) estar acima do recomendado pelo CLSI ( $\leq 1,5\%$ ), isso pode ter ocorrido devido ao número limitado de isolados resistentes (26) nesse estudo, de forma que uma amostragem maior poderia ser analisada para observar se esse índice se manteria constante, aumentaria ou diminuiria. Além disso, é importante ressaltar que os pontos de corte fornecidos pelo BrCAST levam a uma classificação dicotômica (resistente ou sensível) dos isolados, visto que a inexistência da categoria intermediária poderia diminuir a porcentagem encontrada de *very major error* e de *major errors*, uma vez que os *minor errors* passariam a também ser contabilizados. Todavia, o baixo índice de concordância essencial (60%) inviabiliza a aprovação do Etest® como método comercial para testagem da susceptibilidade à polimixina B nestes isolados segundo os critérios de performance estabelecidos pelo CLSI ( $\geq 90\%$  de concordância categórica,

$\geq 90\%$  de concordância essencial,  $\leq 1,5\%$  de *very major errors*,  $\leq 3,0\%$  de *major errors*), de forma que, se é necessário conhecer o valor exato da CIM para polimixina B em isolados de KP-KPC, ainda é necessário utilizar o método de referência.

Tem-se ciência, ainda, das limitações deste trabalho. Não foi determinada a relação clonal dos isolados, de forma que a presença de diferentes clones contribuiria para uma melhor avaliação da performance e robustez do teste. Além disso, não foi realizada uma comparação intra-laboratorial dos resultados, de forma a avaliar a reprodutibilidade da análise.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que, apesar do Etest® ser um método de fácil execução,<sup>13,15</sup> a confirmação dos resultados de CIM para polimixina B pelo método da microdiluição em caldo em isolados de KP-KPC ainda é recomendada, uma vez que o Etest® não apresentou uma concordância essencial adequada com os valores de CIM obtidos pelo método de referência. Entretanto, devido à alta concordância categórica entre os métodos e a tendência do Etest® em superestimar o valor das CIM, poderia-se adotar este método como *screening* para classificação dos isolados em sensíveis ou resistentes à polimixina B, de forma que os resultados próximos ao ponto de corte de resistência adotado devam ser confirmados pela microdiluição em caldo.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, esse trabalho comparou Etest® e a microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade à polimixina B em isolados de KP-KPC. Apesar de terem sido encontrados índices de falsa-sensibilidade (3,5%) acima do recomendado pelo Etest®, houve uma boa concordância categórica (95,3%) entre os métodos, de forma que o Etest® pode ser utilizado como teste de *screening* para categorização destes tipos de isolados, mas deve ter seus resultados de CIM confirmado pelo método de referência quando necessário, principalmente nos casos em que a CIM encontrar-se muito próxima ao ponto de corte utilizado.

É sabido que são necessários estudos complementares para uma maior elucidação deste tema. A variabilidade intra-exames não foi avaliada, sendo que a repetição das técnicas em outro laboratório é uma das perspectivas futuras deste trabalho. Além disso, um número maior de isolados será analisado, a fim de verificar se os índices de performance reportados até então mantêm o mesmo padrão.

Ainda, é importante ressaltar que são necessários maiores estudos quanto à correlação entre as CIM de polimixinas e o desfecho clínico para guiar o tratamento destas infecções multirresistentes.<sup>26</sup> A falta de consenso entre o BrCAST, EUCAST e o CLSI<sup>13,30,33</sup> quanto a uma padronização dos pontos de corte utilizados na análise da susceptibilidade às polimixinas dificulta a interpretação dos resultados, podendo levar a diferentes interpretações do perfil de susceptibilidade segundo o critério utilizado e impactando assim na decisão clínica quanto ao tratamento destas infecções multirresistentes. As infecções causadas por KP-KPC ainda não possuem um tratamento ideal preconizado pela comunidade médica, de maneira que as decisões clínicas dependem frequentemente dos resultados de testes de susceptibilidade antimicrobiana.<sup>11</sup> Diante da crescente resistência antimicrobiana a carbapenênicos, levando ao uso da polimixina B como uma das últimas opções terapêuticas, ressalta-se a importância da avaliação da confiabilidade de diferentes métodos de susceptibilidade para este antibiótico, a fim de garantir a reprodutibilidade e exatidão das CIM em diferentes realidades laboratoriais.

## REFERÊNCIAS

1. CDC. *Klebsiella pneumoniae in Healthcare Settings*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>>. Acesso em 31. out. 2017.
2. BART, Natália. Avaliação do sinergismo entre polimixina B com tigeciclina, imipenem e meropenem em isolados de enterobactérias produtoras de KPC. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
3. CALFEE, DP. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae* [version 1; referees: 2 approved.] **F1000Research**, 6(F1000 Faculty Rev):1760. set. 2017.
4. CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N.. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p.1-17, 2 fev. 2016. American Society for Microbiology.
5. SUÁREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. Antibióticos betalactâmicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p.116-129, fev. 2009. Elsevier BV.
6. CARNEIRO, Marcelo. Terapia com polimixina B em infecção de corrente sanguínea por bacilos Gram-negativos multirresistentes. 2015. 74f. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
7. SAMPAIO, Jorge Luiz Mello; GALES, Ana Cristina. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, p.31-37, dez. 2016. Elsevier BV.

8. XU, Liangfei; SUN, Xiaoxi; MA, Xiaoling. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p.1-12, 29 mar. 2017. Springer Nature.
9. IOVLEVA, Alina; DOI, Yohei. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Clinics In Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p.303-315, jun. 2017. Elsevier BV.
10. LUZ, Daniela Inocente. Heterorresistência e resistência adaptativa à polimixina B em isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase (KPC). 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
11. LAT, A. et al. Comparison of Polymyxin B, Tigecycline, Cefepime, and Meropenem MICs for KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* by Broth Microdilution, Vitek 2, and Etest. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p.1795-1798, 2 mar. 2011.
12. SRITHARAN, V et al. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). **Indian Journal Of Medical Research**, v. 144, n. 1, p.21-31, 2016. Medknow.
13. POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p.557-596, abr. 2017
14. SIMAR, S. et al. Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. **The Ochsner Journal**, v. 17, n. 3, p. 239-242, 2017.
15. PAIVA, Rodrigo Minuto. Concentração inibitória mínima de vancomicina para *Staphylococcus sp.* coagulase negativa resistente à meticilina: comparação entre os métodos de microdiluição em caldo e Etest e correlação com falha terapêutica em pacientes com bacteremia. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia: Ciências

- Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
16. PEREZ, Leandro Reus Rodrigues. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system. **Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinava**, v. 123, p.951-954, jul. 2015.
  17. YUAN, Zhe; TAM, Vincent H. Polymyxin B: a new strategy for multidrug-resistant Gram-negative organisms. **Expert Opinion On Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p.661-668, 2008.
  18. MUNOZ-PRICE, L. Silvia et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infectious Disease**, v. 13, n. 9, p.785-796, set. 2015.
  19. BARTOLLETTI, Flávia et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p.1849-1851, out. 2016.
  20. PASTEWSKI, Andrew A. et al. Parenteral Polymyxin B Use in Patients with Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteremia and Urinary Tract Infections: A Retrospective Case Series. **Ann Pharmacother**, v. 42, p.1177-1187, set. 2008.
  21. MICHALOPOULOS, Argyris; FALAGAS, Matthew E.. Colistin and Polymyxin B in Critical Care. **Critical Care Clinics**, v. 24, p.377-391, 2008
  22. MENDES, Carlos Alberto Caldeira; BURDMANN, Emmanuel A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p.752-759, ago. 2009.
  23. ZAVASCKI, Alexandre P. et al. Pharmacokinetics of Intravenous Polymyxin B in Critically Ill Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 10, p.1298-1304, 15 nov. 2008. Oxford University Press (OUP)

24. BADER, Mazen S; LOEB, Mark; A BROOKS, Annie. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. **Postgraduate Medicine**, v. 129, n. 2, p.242-258, 21 out. 2016.
25. ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p.1206-1215, 3 out. 2007. Oxford University Press (OUP).
26. CHEW, Ka Lip et al. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 9, p.2609-2616, set. 2017.
27. VELKOV, Tony et al. Polymyxins for CNS infections: Pharmacology and neurotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, p.1-6, jul. 2017. Elsevier BV.
28. POGUE, Jason M.; ORTWINE, Jessica K.; KAYE, Keith S.. Are there any ways around the exposure-limiting nephrotoxicity of the polymyxins? **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p.622-626, dez. 2016. Elsevier BV.
29. CHUNG, Joon-hui et al. Combination therapy with polymyxin B and netropsin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-11, 16 jun. 2016.
30. GOMEZ-SIMMONDS, Angela; UHLEMANN, Anne-catrin. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 215, n. 1, p.18-27, 15 fev. 2017. Oxford University Press (OUP)
31. HEIJDEN, Inneke M van Der et al. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, v. 6, n. 1, p.1-7, 2007. Springer Nature.

32. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
33. BRCAST. **Tabela de pontos de corte clínicos BrCAST**. 2017. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos>>. Acesso em: 17. dez. 2017.
34. MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p.906-909, 9 jan. 2012. Oxford University Press (OUP).
35. GISKE, C.G.; KAHLMETER, G.. Colistin antimicrobial susceptibility testing—can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient? **Clinical Microbiology And Infection**, p.1-2, out. 2017. Elsevier BV.
36. ALBUR, Mahableshwar et al. Colistin susceptibility testing: time for a review. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p.1432-1434, 2014.