



**CATÓLICA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA**

---

PORTO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA  
INIBITÓRIA AOS CARBAPENEMOS POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

por

Maria do Rosário Almeida Gomes

Julho 2018





**CATÓLICA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA**

---

PORTO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA  
INIBITÓRIA AOS CARBAPENEMOS POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada.

por

Maria do Rosário Almeida Gomes

Local: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Orientação: Professora Doutora Cidália Pina Vaz

Julho 2018



## RESUMO

Entre os beta-lactâmicos, os carbapenemos são os antimicrobianos mais eficazes contra bactérias Gram-negativo. O aparecimento de bactérias multirresistentes ameaça seriamente essa classe de fármacos que salvam vidas. A determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) aos antibióticos é atualmente considerada importante quer para o tratamento destas infeções quer para o controlo epidemiológico. Este estudo propõe um novo teste de suscetibilidade antimicrobiana baseado em citometria de fluxo para determinação rápida da CMI aos carbapenemos diretamente de hemoculturas positivas.

Noventa e sete isolados clínicos de bacilos de Gram-negativo e oito estirpes de referência (ATCC), incluindo 36 *Enterobacteriaceae*, 36 *Pseudomonas aeruginosa* e 33 *Acinetobacter spp.*, foram estudados. As hemoculturas (BD) foram inoculados com  $10^3$  bactérias/frasco e 8 mL de sangue fresco humano de dador saudável, e incubadas até positivarem. As células foram recuperadas do sangue de acordo com um protocolo previamente otimizado, incubadas durante 1 h a 37 °C, com concentrações variando entre 1 e 8 µg/mL de imipenem (IMI) e 1 e 8 µg/mL de meropenem (MRP), e um corante fluorescente indicador do potencial de membrana celular. As células foram analisadas num citómetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus. Para cada concentração foi calculado um índice de fluorescência (SI), que é tanto maior quanto maior for a lesão celular, e a menor concentração de fármaco que levou ao aumento da fluorescência (CFM: menor concentração do fármaco que produz um aumento do SI) foi estimada. A associação entre valores de CMI e dados citométricos foi realizada usando um modelo linear geral multivariado.

O modelo estatístico estimou os valores de corte e o respetivo intervalo de confiança para a avaliação da CFM para meropenem e imipenem. A análise dos dados mostrou uma associação significativa entre a CMI dos valores de MRP e IMI e CFM com uma elevada concordância (93,06% e 96,70%).

A menor concentração de fármaco que causou aumento da fluorescência, determinada por citometria de fluxo, é uma excelente abordagem para calcular os valores de CMI para carbapenemos, mostrando uma alta concordância com a metodologia clássica. Este valor foi obtido em cerca de 2 horas o que, comparando com o método padrão que demora 48h, se traduz num significativo progresso.

**Palavras-Chave:** Citometria de Fluxo, Carbapenemos, Teste de suscetibilidade antimicrobiana, Concentração mínima inibitória, Bacilos de Gram negativo.



## ABSTRACT

Among the beta-lactams, carbapenems are the most effective drugs against gram-negative bacteria. The emergence of multidrug-resistant pathogens seriously threatens this class of lifesaving drugs. Minimal inhibitory concentrations (MIC) is an important measure for infection treatment and epidemiological control. This study proposes a novel antimicrobial susceptibility testing based on flow cytometry for MIC determination to carbapenems directly from positive blood cultures.

Ninety-seven gram-negative bacilli clinical isolates and eight reference strains (ATCC), including 36 *Enterobacteriaceae*, 36 *Pseudomonas aeruginosa*, and 33 *Acinetobacter* spp., were studied. Aerobic BD blood cultures bottles were spiked with  $10^3$  bacteria/bottle and 8 mL of healthy fresh human blood, and incubated until a positive flag. Cells were recovered from the blood according to a previously optimized protocol and incubated during 1h at 37°C, with concentrations ranging between 1 and 8 µg/mL of imipenem (IMI) and 1 and 8 µg/mL of meropenem (MRP), and a membrane potential fluorescent dye. Cells were analyzed in a BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer. For each concentration a staining index (SI) was calculated, which is greater the more significant the cell injury, and a lower antimicrobial concentration leading to increased fluorescence (MFC: less concentration of the drug that produces an increase of the SI) was estimated. The association between MIC values and flow cytometric data was performed using a multivariate general linear model.

Statistical model estimated the cutoff values and the respective confidence interval for the evaluation of the MFC for meropenem and imipenem. Data analysis showed a significant association between MIC of MRP and IMI and MFC values with a high essential agreement (93.06% and 96.70%).

Lower antimicrobial concentration leading to increased fluorescence, determined by flow cytometry, is an excellent approach to calculate the MIC values for carbapenems, showing a high agreement with classic methodology. This value was obtained in about 2h which, when compared with the standard method that takes 48h, translates into a significant progress.

**Key-Words:** Flow cytometry, Carbapenems, Antimicrobial susceptibility testing, Minimum inhibitory concentration, Gram negative bacilli.





## **AGRADECIMENTOS**

Especialmente à minha orientadora, Professora Doutora Cidália Pina Vaz, que desde o início me recebeu de braços abertos, acreditou no meu potencial e que muito me ajudou a crescer no mundo da investigação. Pela forma como orientou o meu trabalho e por ter sempre uma palavra incentivante. Agradeço imenso todos os desafios e oportunidades que me lançou ao longo desta etapa.

A toda a equipa da FASTinov S.A. (Porto) pela forma como fui recebida, pelo incansável acompanhamento e apoio nos trabalhos de bancada, bem como também os momentos de descontração. O meu agradecimento especial à Doutora Rita Santos pelo seu apoio na elaboração deste trabalho, que sempre me estimulou a crescer cientificamente pelas inúmeras correções e comentários ao trabalho.

Deixo também uma palavra de agradecimento ao Professor Doutor Acácio Rodrigues, diretor do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, por me deixar utilizar as instalações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Bem como, a todos os funcionários e investigadores deste mesmo serviço, pela disponibilidade e boa disposição de todos os dias.

Desejo igualmente agradecer às professoras de Microbiologia do Instituto Universitário de Ciências da Saúde – Norte, por me inculirem o gosto pela microbiologia clínica e me darem as bases para conseguir chegar a este ponto do percurso académico.

Por último, quero agradecer à minha família o apoio incondicional, incentivo e força, por sempre me fazerem acreditar que consigo chegar onde quero.

A todos, o meu mais profundo **OBRIGADA!**



# ÍNDICE

RESUMO .....	III
ABSTRACT .....	V
AGRADECIMENTOS .....	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XIII
LISTA DE ABREVITURAS .....	XV
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Resistência aos Antibióticos: uma Ameaça a Nível Mundial .....	1
1.2. Carbapenemos .....	1
1.2.1. Mecanismo de Ação dos Carbapenemos .....	2
1.2.2. Espectro de Ação dos Carbapenemos.....	2
1.2.3. Estrutura Química dos Carbapenemos .....	3
1.2.4. Estabilidade dos Carbapenemos .....	3
1.3. Mecanismos de Resistência aos Carbapenemos .....	4
1.3.1. Modificações no Alvo de Ação .....	4
1.3.2. Aumento das Bombas de Efluxo .....	4
1.3.3. Diminuição da Permeabilidade da Membrana Externa .....	5
1.3.4. Inativação do Fármaco por Ação de Enzimas Hidrolíticas.....	5
1.4. Fenômeno de Hetero-Resistência nos Carbapenemos .....	6
1.5. Avaliação da Suscetibilidade aos Antibióticos .....	6
1.5.1. Métodos Manuais para a Determinação da Suscetibilidade .....	6
1.5.2. Sistemas Automatizados para a Determinação da Suscetibilidade.....	7
1.6 Citometria de Fluxo como uma Nova Abordagem na Determinação da Suscetibilidade .....	8
1.6.1 Constituição do Citometro de Fluxo .....	8
1.6.2 Capacidades do Citometro de Fluxo .....	9
1.6.3 Vantagens e Desvantagens da Citometria de Fluxo.....	9
1.6.4 Aplicações da Citometria de Fluxo na Microbiologia .....	10
1.6.4.1 Determinação do Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana por Citometria de Fluxo ....	10
1.7 Objetivos do Trabalho .....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1. Otimização do Protocolo Citométrico para Avaliação da Concentração Mínima Inibitória aos Carbapenemos .....	12
2.1.1. Estirpes Bacterianas.....	12
2.1.2. Antimicrobianos e Reagentes .....	12
2.1.3. Protocolo de Referência para a Determinação da Concentração Mínima Inibitória aos Carbapenemos .....	12

2.1.4. Protocolo Citométrico para Determinação da Concentração Mínima Inibitória aos Carbapenemos .....	13
2.2. Prova de Conceito em Hemoculturas.....	14
2.2.1. Produção dos Testes para Citometria de Fluxo .....	15
2.2.1.1. Estudo da Estabilidade dos Fármacos.....	15
2.2.2. Estirpes Bacterianas.....	16
2.2.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória por Citometria de Fluxo .....	16
2.2.4 Análise Estatística .....	16
3.RESULTADOS .....	18
3.1. Otimização do Protocolo Citométrico para Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias .....	18
3.1.1 Determinação da Região de Análise - Gate.....	18
3.1.2 Otimização das Condições de Marcação.....	19
3.1.2.1. Marcação com Marcador de Potencial de Membrana .....	20
3.1.2.2. Marcação com Marcador de Lesão de Membrana .....	25
3.2 Prova de Conceito .....	31
3.2.1. Caracterização da Amostra em Estudo.....	31
3.2.2. Estabilidade dos Antimicrobianos .....	32
3.2.3. Correlação entre os Valores de Concentração Mínima Inibitória e os Valores de Concentração Mínima Fluorescente .....	33
4. DISCUSSÃO .....	36
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	39
6. TRABALHO FUTURO .....	40
APÊNDICE 1 .....	41
REFERÊNCIAS.....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b>	Representação da estrutura química de alguns antibióticos beta-lactâmicos. Adaptado de: M. Papp-wallace K <i>et al.</i> 2011 <sup>10</sup> .....	3
<b>Figura 2.1.</b>	Fluxograma da otimização do protocolo citométrico.....	14
<b>Figura 2.2.</b>	Fluxograma de produção dos testes para citometria de fluxo.....	15
<b>Figura 3.1.</b>	<i>Scattergram</i> representativo da distribuição da população das estirpes de controlo de qualidade <i>K. pneumoniae</i> BAA 1705 e <i>E. coli</i> ATCC 35218, obtidas a partir de <b>(A)</b> uma colónia pura crescida em caldo e <b>(B)</b> de uma hemocultura positiva. SSC – <i>Side Scatter</i> ; FSC- <i>Foward Scatter</i> .....	18
<b>Figura 3.2.</b>	Gráfico representativo do número de células no <i>gate</i> de análise definido ao longo dos diferentes tempos de incubação, <b>(A)</b> estirpes bacterianas tratadas com meropenemo e <b>(B)</b> estirpes bacterianas tratadas com imipenemo. ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) ATCC 35218 (estirpe suscetível).....	19
<b>Figura 3.3.</b>	Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes <b>(A)</b> suscetíveis e <b>(B)</b> resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador de potencial de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B).....	20
<b>Figura 3.4.</b>	Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes <b>(A)</b> suscetíveis e <b>(B)</b> resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador de potencial de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B).....	21
<b>Figura 3.5.</b>	Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe <b>(A)</b> ATCC 35218 (estirpe suscetível) e pela estirpe <b>(B)</b> ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com meropenemo nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de potencial de membrana.....	22
<b>Figura 3.6.</b>	Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe <b>(A)</b> ATCC 35218 (estirpe suscetível) e pela estirpe <b>(B)</b> ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com imipenemo nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de potencial de membrana.....	23
<b>Figura 3.7.</b>	Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador do potencial de membrana durante 60 min.....	24
<b>Figura 3.8.</b>	Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador potencial de membrana durante 60 min.....	25
<b>Figura 3.9.</b>	Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes <b>(A)</b> suscetíveis e <b>(B)</b> resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B).....	26
<b>Figura 3.10.</b>	Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes <b>(A)</b> suscetíveis e <b>(B)</b> resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B).....	27

<b>Figura 3.11.</b>	Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe (A) ATCC 35218 (estirpe suscetível) e pela estirpe (B) ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com meropenemo nas concentrações de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de lesão de membrana.....	28
<b>Figura 3.12.</b>	Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe (A) ATCC 35218 (estirpe suscetível e pela estirpe (B) ) ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com imipenemo nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de lesão de membrana.....	29
<b>Figura 3.13.</b>	Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana durante 60 min.....	30
<b>Figura 3.14.</b>	Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com imipnemo e marcadas com marcador de lesão de membrana durante 60 min.....	31
<b>Figura 3.15.</b>	Distribuição da concentração mínima inibitória aos carbapenemos, meropenemo (MRP) e imipenemo (IMI), apresentada pela amostra em estudo.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b>	Planificação para o estudo da estabilidade do meropenemo e imipenemo.....	16
<b>Tabela 2.1.</b>	Distribuição fenotípica pormenorizada da amostra em estudo.....	32
<b>Tabela 2.2.</b>	Coeficiente de concordância entre os valores de concentração mínima inibitória avaliados ao longo do tempo para a condição de armazenamento a uma temperatura de -80°C.....	32
<b>Tabela 2.3.</b>	Coeficiente de concordância entre os valores de concentração mínima inibitória avaliados ao longo do tempo para a condição de armazenamento a uma temperatura de -20°C.....	33
<b>Tabela 2.4.</b>	Coeficiente de concordância entre os valores de concentração mínima inibitória avaliados ao longo do tempo para a condição de armazenamento a uma temperatura ambiente após processo de liofilização.....	33
<b>Tabela 2.5.</b>	Associação entre os valores de concentração mínima inibitória e os valores de concentração mínima fluorescente.....	34
<b>Tabela 2.6.</b>	Exemplo da associação entre os valores de concentração mínima inibitória ao meropenemo e os valores de concentração mínima fluorescente.....	34
<b>Tabela 2.7.</b>	Exemplo da associação entre os valores de concentração mínima inibitória ao imipenemo e os valores de concentração mínima fluorescente.....	35





## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>IMI</b>	Imipnemo
<b>DHP-1</b>	Enzima renal desidropeptidase
<b>MRP</b>	Meropenemo
<b>ERT</b>	Ertapenemo
<b>PBP</b>	Proteína de ligação à penicilina
<b>NAG</b>	Ácido N-acetilmurâmico
<b>NAM</b>	Ácido N-acetilglucosamina
<b>OMPs</b>	Proteínas de membrana externa
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>TSA</b>	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RND</b>	Família de sistemas de efluxo resistência-nodulação
<b>EPC</b>	Enterobactérias produtoras de carbapenemases
<b>KPC</b>	Carbapenemase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>OXA-48-Like</b>	Oxacilinase tipo 48
<b>IMP</b>	Imipenemase metalo-betalactamase
<b>VIM</b>	Verona integron-encoded metallo-β-lactamase
<b>APBA</b>	Ácido borónico
<b>DPA</b>	Ácido dipicolínico
<b>EDTA</b>	Ácido etilodiamino tetra-acético
<b>CLSI</b>	Clinical and laboratory standards institute
<b>EUCAST</b>	European committee on antimicrobial susceptibility testing
<b>S</b>	Fenótipo suscetível
<b>I</b>	Fenótipo intermédio
<b>R</b>	Fenótipo resistente
<b>CF</b>	Citometria de fluxo
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>BHB</b>	Meio líquido brain heart
<b>BHA</b>	Meio sólido brain heart
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PM</b>	Marcador de potencial de membrana
<b>LM</b>	Marcador de lesão de membrana
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>MHB-Ca<sup>2+</sup></b>	Meio líquido Muller Hinton cation adjusted
<b>SI</b>	Índice de fluorescência
<b>CMF</b>	Concentração mínima fluorescente
<b>SSC</b>	Side scatter
<b>FSC</b>	Foward scatter
<b>PC</b>	Proporção de concordância



# 1. INTRODUÇÃO

## Revisão da Literatura

### 1.1. Resistência aos Antibióticos: uma Ameaça a Nível Mundial

Nos últimos anos a resistência aos antibióticos atingiu níveis muito elevados em todo o mundo, constituindo um perigo para a saúde pública e uma prioridade para a Organização Mundial de Saúde<sup>1</sup>. O desenvolvimento de populações de bactérias patogênicas resistentes é uma consequência direta da grande pressão seletiva exercida pela terapêutica, muitas vezes prescrita de forma inadequada e abusiva<sup>2</sup>.

As bactérias ao serem confrontadas com um aumento da exposição aos antibióticos respondem a esta ameaça com o desenvolvimento de mecanismos que lhes permitem sobreviver à ação dos mesmos<sup>3</sup>. As mutações ao nível dos genes alvo dos antibióticos, foram descritas como a primeira causa do aparecimento de resistência. Contudo, rapidamente se percebeu que a aquisição de resistência é muitas vezes determinada pela transferência horizontal de genes através de plasmídeos<sup>2</sup>.

Nunca antes foi registado um número tão elevado de bactérias resistentes, quer em ambiente hospitalar, quer em ambiente comunitário. Muitos destes agentes infecciosos apresentam já resistências a mais de três classes de fármacos, o que os determina como microrganismos multirresistentes<sup>3</sup>.

Nos EUA estima-se que a cada ano pelo menos 2 milhões de pessoas sejam infetadas por bactérias resistentes, das quais cerca de 23 000 morrem como resultado direto destas infeções<sup>4</sup>. Na Europa, o total de mortes associada a infeções por bactérias resistentes é de 25 000 mortes por ano, sendo que estas infeções representam um custo anual de 1.5 biliões de euros<sup>5</sup>.

### 1.2. Carbapenemos

Os antibióticos beta-lactâmicos têm vindo a ser usados na prática clínica desde a introdução da Penicilina em 1940<sup>6</sup>. Esta família de antibióticos, que inclui as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos, é a mais prescrita em todo o mundo. Possuindo elevada eficácia terapêutica, apresentam um largo espectro de ação antibacteriano e baixa toxicidade<sup>7</sup>.

Os carbapenemos são considerados como a terapêutica de última linha, mais eficaz no combate a infeções por microrganismos multirresistentes e/ou infeções polimicrobianas. Por essa mesma razão, o uso destes fármacos tem aumentado substancialmente nos últimos anos, o que tem contribuído para o aparecimento e disseminação de resistência a nível mundial<sup>7,8</sup>.

O primeiro antibiótico desta classe a ser descoberto derivou de um composto produzido por *Streptomyces cattleya*, sendo posteriormente designado de imipenemo (IMI) (1987)<sup>6</sup>.

No entanto, observou-se que este fármaco era rapidamente degradado por uma enzima renal, a desidropeptidase (DHP-1). Para que esta molécula se tornasse estável o suficiente para a sua utilização na clínica, foi necessário realizar uma associação que inibisse a enzima DHP-1, como é o exemplo da Cilastatina<sup>6</sup>.

O meropenemo (MRP) (1996)<sup>6</sup> foi o segundo carbapenemo a ser utilizado na clínica. Este composto apresenta uma estabilidade intrínseca à DHP-1, não sendo necessário associações<sup>6</sup>.

Anos mais tarde, de forma a colmatar o facto dos carbapenemos usados até à data possuírem semi-vidas curtas que obrigavam a múltiplas tomas diárias, desenvolveu-se uma nova molécula com uma semi-vida sérica mais longa que apenas necessita de uma toma diária, o ertapenemo (ERT) (2001)<sup>6</sup>.

Os fármacos acima referidos são os que se encontram legalmente comercializados em Portugal no que diz respeito à classe dos carbapenemos, no entanto, existem outros fármacos desta classe que se encontram disponíveis noutros países.

### **1.2.1. Mecanismo de Ação dos Carbapenemos**

O mecanismo de ação descrito para os carbapenemos baseia-se na atividade bactericida estabelecida pela inibição irreversível das enzimas transpeptidases, também designadas de proteína de ligação à penicilina (PBP), proteínas que se localizam no espaço periplasmático da parede celular das bactérias<sup>9</sup>. Estas enzimas atuam na fase parietal da síntese do peptidoglicano, formando as pontes interpeptídicas entre os fragmentos de NAG-NAM-pentapeptídeo recém-formado e o peptidoglicano já existente na parede celular. Este complexo é responsável pela rigidez da parede celular<sup>9</sup>. A inibição das PBPs deve-se à analogia existente entre os carbapenemos (em particular o anel beta lactâmico) e o dipeptido D-alanil-D-alanina terminal do peptidoglicano que atua como um substrato para a enzima, evitando a transpeptidação do peptidoglicano (crosslinking), o que impede a síntese de uma parede bacteriana intacta, levando à lise celular<sup>6,8</sup>.

Os antibióticos beta-lactâmicos não se difundem facilmente através da parede celular bacteriana. Nas bactérias de Gram negativo, o antibiótico entra através das proteínas de membrana externas (OMPs) por difusão passiva, e após atravessar o espaço periplasmático acetila as PBP<sup>10</sup>.

### **1.2.2. Espectro de Ação dos Carbapenemos**

Os carbapenemos possuem o espectro de ação mais amplo dentro da família dos beta-lactâmicos, exibindo atividade bactericida contra inúmeras bactérias patogénicas aeróbias e anaeróbias. Esta classe de antibióticos apresenta também uma enorme estabilidade à maioria das enzimas bacterianas que degradam os antibióticos Beta-lactâmicos, as betalactamases<sup>6</sup>. Por esta razão, são antibióticos associados ao tratamento de infeções por bactérias multirresistentes<sup>6</sup>.

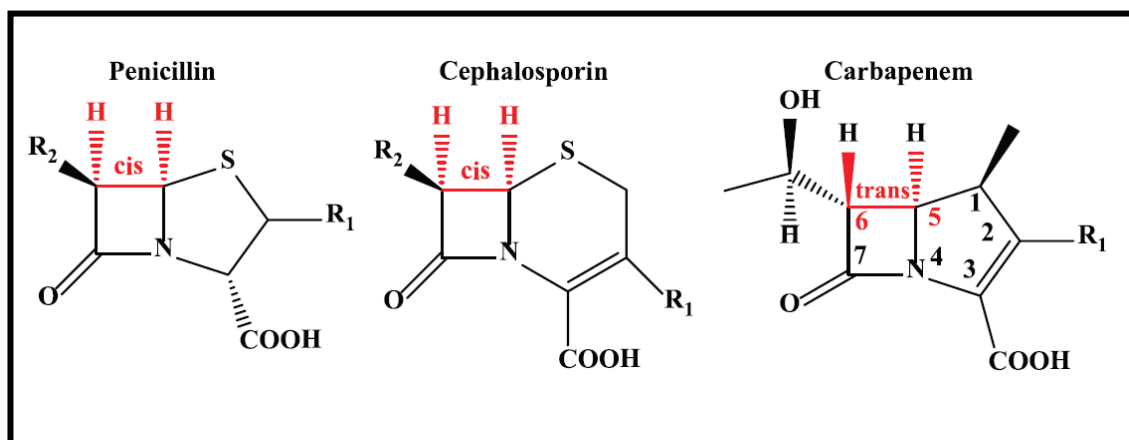
Dentro da classe dos carbapenemos, o espectro de ação de cada um dos fármacos é variável, sendo determinado pela afinidade da inibição dos diferentes subtipos de PBP<sup>9</sup>. Estudos microbiológicos, baseados na afinidade de inibição das PBP apontam que o IMI possui uma maior atividade na inibição de bactérias de Gram positivo, enquanto o MRP possui maior eficácia frente às bactérias Gram negativo<sup>6</sup>. Ambas as moléculas possuem atividade contra bacilos Gram negativo não-fermentadores, como a *Pseudomona aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*, bactérias geralmente causadoras de infeções associadas a cuidados de saúde<sup>6</sup>. Contudo, em termos de resposta clínica e bacteriológica o MRP é significativamente mais eficiente que o IMI associado à cilastatina<sup>11</sup>.

Por último, o ERT apresenta um espectro de ação mais reduzido pelo facto de não apresentar atividade contra bacilos Gram negativo não-fermentadores<sup>6</sup>. No entanto, este fármaco apresenta baixos valores de concentração mínima inibitória (CMI) para as *Enterobacteriaceas*, sendo recomendado

exclusivamente para esta família de bactérias<sup>6</sup>. Tendo em conta o espectro de ação do ERT, a sua utilização é mais vantajosa em infeções graves da comunidade, pois geralmente este tipo de infeção não é causada por bacilos Gram negativo não-fermentadores<sup>6</sup>.

### 1.2.3. Estrutura Química dos Carbapenemos

Os carbapenemos possuem um anel beta-lactâmico bem conservado, partilhado por todos os Beta-lactamicos<sup>8</sup>. As cadeias laterais ao anel beta-lactâmico são responsáveis pelas características de cada carbapenemo, bem como pelo seu espectro de ação. A estabilidade apresentada pelos carbapenemos às carbapenemases deve-se também à estrutura química apresentada por esta classe de fármacos. O grupo substituinte encontrado na posição 6, trans- $\alpha$ -1-hidroxi etilo com uma configuração *trans* (Figura 1.1.), confere esta vantagem aos carbapenemos<sup>8</sup>.



**Figura 1.1.** Representação da estrutura química de alguns antibióticos beta-lactamicos<sup>10</sup>. Adaptado de: M. Papp-wallace K *et al.* 2011<sup>10</sup>.

### 1.2.4. Estabilidade dos Carbapenemos

A atividade antibacteriana de alguns fármacos tem vindo a ser subestimada durante a realização de testes de suscetibilidade *in vitro* devido à instabilidade dos fármacos em determinadas condições<sup>12</sup>. A estabilidade dos antibióticos *in vitro* é afetada por fatores abióticos como: a luz, a composição do meio, o pH e a temperatura<sup>12</sup>. As alterações da atividade do antibiótico durante a incubação dos TSA (testes de suscetibilidade aos antimicrobianos) podem levar a erros na decisão clínica. É assumido que, as concentrações *in vitro* dos antibióticos testados não sofrem alterações durante o período de incubação. Contudo a degradação do fármaco que ocorre durante o período de incubação está associada a um aumento significativo da CMI<sup>12</sup>. No entanto, estudos demonstraram que a degradação que ocorre durante as 24 horas de incubação dos TSA standard é de apenas  $\frac{2}{3}$ <sup>12</sup>, sendo apenas o período de incubação crítico para isolados clínicos de crescimento lento.

Sabe-se ainda que, as condições de armazenamento dos testes de suscetibilidade previamente preparados podem exercer efeito sobre a atividade antimicrobiana dos antibióticos. Dependendo do fármaco em questão, a duração do armazenamento e a temperatura a que foi submetido pode comprometer a sua atividade<sup>13</sup>.

### **1.3. Mecanismos de Resistência aos Carbapenemos**

Os mecanismos de resistência requerem uma nova reprogramação genética da célula em resposta à presença dos antibióticos<sup>14</sup>.

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca aos microrganismos ou adquirida.

A resistência adquirida é essencialmente obtida com base em dois importantes mecanismos: mutações cromossômicas e pela transferência horizontal de genes.

A transferência horizontal de genes consiste na transferência de informação genética de um microrganismo para outros que não fazem parte da mesma descendência, por processos como conjugação, transformação ou transdução<sup>15</sup>. Os genes de resistência são incorporados nos genes-aceitadores através de recombinação, de onde podem resultar mutações pontuais ou mutações que acarretam alterações de sequências de bases<sup>15</sup>.

As mutações cromossômicas podem ser mutações espontâneas que ocorrem aleatoriamente na ausência de qualquer pressão seletiva, tais como os erros na replicação ou reparação incorreta de danos no ADN nas células em divisão, entre muitos outros erros que podem ocorrer durante todo o processo de divisão celular<sup>15</sup>.

As mutações são essenciais para que ocorra a evolução das espécies, no entanto, são também desvantajosas na medida em que permitem a geração de fenótipos de resistência. Quando o erro é vantajoso para a bactéria, como no caso das resistências aos antibióticos, ele tenderá a predominar.

Relativamente a Portugal, em 2014, o país encontrava-se com uma taxa de resistência relativamente baixa aos carbapenemos (1% a <5%)<sup>16</sup>. Já em 2015, o país adquiriu taxas de resistência intermédias a esta classe de antibióticos (10% a <25%)<sup>16</sup>.

Em geral, pode afirma-se que as resistências bacterianas se desenvolvem com base em quatro tipos fundamentais de modificações, as quais passarão a ser descritas.

#### **1.3.1. Modificações no Alvo de Ação**

Um dos mecanismos pelos quais ocorre o desenvolvimento de resistência aos antibióticos é a modificação do seu alvo de ação, havendo uma alteração da sensibilidade do alvo do antibiótico, que se traduz numa menor afinidade do antibiótico para esse local<sup>14,15</sup>. Esta alteração resulta por vezes de uma mutação espontânea num gene bacteriano, gerando PBPs alteradas<sup>17</sup>. No caso específico dos carbapenemos, as mutações no gene *MecA* levam a alteração do alvo, local de ligação destes fármacos<sup>17</sup>. Um exemplo de PBP alterada é a PBP3, que é responsável pela diminuição da afinidade do IMI no seu local de ação. No que diz respeito às bactérias patogénicas Gram positivo, a modificação do alvo dos beta-lactâmicos, as PBPs, é o principal mecanismo de resistência<sup>17</sup>.

#### **1.3.2. Aumento das Bombas de Efluxo**

O aumento das bombas de efluxo na superfície da célula bacteriana afeta diretamente a concentração intracelular de fármaco devido ao efluxo ativo destas moléculas. A eficácia do fármaco é assim comprometida pela diminuição da sua concentração no interior da célula bacteriana<sup>15,18,19</sup>. Embora existam várias famílias de sistemas de efluxo bacterianos envolvidas no efluxo bacteriano, a família que mais evidência o efluxo, e que por essa razão mais resistências causa em isolados clínicos,

é a família divisão de resistência-nodulação (RND); estas proteínas encontram-se distribuída pelas bactérias Gram negativo<sup>18</sup>.

### 1.3.3. Diminuição da Permeabilidade da Membrana Externa

A diminuição da permeabilidade da membrana externa constitui uma dificuldade à entrada do antibiótico na célula<sup>15,19</sup>. Mais uma vez, não se atinge uma concentração suficiente no interior da célula para que o fármaco exerça a sua função. Como por exemplo, no caso da *Pseudomonas aeruginosa* é frequente que ocorra a perda ou a mutação de porinas OprD que levam à resistência ao IMI, pela diminuição da permeabilidade<sup>18</sup>.

O sinergismo de um *uptake* reduzido, devido à baixa permeabilidade externa, e um efluxo aumentado, é um dos fatores que contribui para um alto nível de resistência em bactérias<sup>19</sup>.

### 1.3.4. Inativação do Fármaco por Ação de Enzimas Hidrolíticas

Um outro mecanismo de resistência consiste na inativação dos fármacos devido à síntese de enzimas hidrolíticas pelas bactérias, que inativam a molécula química antes que esta atinja o seu alvo. Esta inativação é facilitada devido à sensibilidade apresentada pelas moléculas farmacológicas ao nível das suas ligações químicas, nomeadamente ésteres e amidos. Relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos, existe um espectro amplo de enzimas, as betalactamases, com o poder de hidrolisar o anel beta-lactâmico inativando várias classes de B-lactâmicos<sup>19,20</sup>.

As carbapenemases representam a família das betalactamases mais versátil, apresentando um espectro de hidrólise superior às restantes famílias de betalactamases. Sendo que a maioria das carbapenemases são enzimas adquiridas, codificadas por genes em elementos móveis alojados em plasmídeos<sup>21</sup>. As carbapenemases, em especial nas bactérias Gram negativo patogénicas como é o exemplo nas *Enterobacteriaceas* produtoras de carbapenemases (EPC), são o principal determinante da sua resistência<sup>18</sup>.

Estas enzimas são incorporadas na classificação de Ambler nas seguintes categorias: A (como é exemplo da KPC – Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*), D (sendo a OXA-48-like – Oxacilinase tipo 48, uma representação dessa categoria); ambas as categorias representam enzimas do tipo serino-betalactamases, e a categoria B representa uma metalo-betalactamases possuindo Zinco no seu centro ativo (IMP – Imipenemase Metalo-betalactamase e VIM – *Verona* integron-encoded metallo-β-lactamase representam algumas das enzimas desta classe)<sup>22,23</sup>.

Sabe-se que as carbapenemases incluídas na classe A de Ambler, são geralmente inibidas pelo ácido borónico (APBA) associado ao MRP, e que as enzimas pertencentes à classe B de Ambler, são inibidas pelo ácido dipicolínico (DPA) e pelo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em associação com o MRP<sup>21</sup>. O meropenemo é o antibiótico que fornece o melhor balanço entre sensibilidade e especificidade na deteção das carbapenemases<sup>24</sup>.

Já as carbapenemases incluídas na classe D de Ambler, são inibidas pela associação de avibactam com a ceftazidima (cefalosporina de 3ª geração)<sup>21</sup>.

Devido à fácil transmissão destas enzimas entre bactérias, foram determinados valores de CMI para os quais se deve fazer screening de carbapenemases, de forma a evitar a propagação deste

mecanismo de resistência. Os valores de screenign determinados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) foi CMI  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  ao MRP e pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) foi CMI  $\geq 0.25\mu\text{g/mL}$  ao MRP<sup>24</sup>.

#### **1.4. Fenómeno de Hetero-Resistência nos Carbapenemos**

Ultimamente, tem vindo a ser verificada a emergência do fenótipo de hetero-resistência aos carbapenemos. Talvez devido à dificuldade de deteção pelos métodos automatizados atualmente disponíveis, a epidemiologia da resistência aos carbapenemos e de todo o seu processo evolutivo foi subestimada, resultando numa falha de tratamento<sup>20</sup>.

Embora o conceito de hetero-resistência seja ainda uma novidade, e na verdade ainda não exista nenhuma definição formalmente aceite para este termo, o mesmo pode ser descrito como uma mistura de subpopulações sensíveis e resistentes a um determinado antibiótico, verificada num único isolado<sup>25</sup>. Num sentido mais estrito da questão, hetero-resistência é um fenótipo exclusivo manifestado dentro de uma estirpe geneticamente homogénea<sup>25</sup>.

A emergência deste novo mecanismo de resistência, embora ainda descrito num pequeno número de casos e ainda mal estudado<sup>26</sup>, representa uma ameaça significativa na medida em que sempre que presente causará problemas tanto ao nível do diagnóstico como a nível terapêutico.

#### **1.5. Avaliação da Suscetibilidade aos Antibióticos**

Uma das tarefas mais importantes no laboratório de microbiologia é a realização de TSA em isolados clínicos<sup>27</sup>.

A realização dos TSA rege-se pelas normas do protocolo americano (CLSI) e europeu (EUCAST)<sup>21</sup>, os quais disponibilizam valores de referência para a classificação do fenótipo como sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R). Um resultado S, indica que o microrganismo deverá responder favoravelmente à terapia com administração do antibiótico na dose recomendada para o tipo de infeção em causa. Pelo contrário, organismos para o qual o resultado se apresenta R, não deverá ser inibido pela concentração de antibiótico geralmente prescrita, e implicará uma mudança de estratégia terapêutica. Um resultado I, indica que o microrganismo cai numa gama de suscetibilidade em que o CMI se aproxima ou excede o nível de antibiótico que normalmente pode ser alcançado e para o qual a resposta clínica será inferior do que para uma resposta suscetível<sup>27</sup>.

De seguida serão apresentados alguns dos métodos e alguns sistemas automatizados mais utilizados que possibilitam a realização dos TSA.

##### **1.5.1. Métodos Manuais para a Determinação da Suscetibilidade**

No que toca à realização de TSA em meio líquido existem duas alternativas; a técnica da macrodiluição ou a técnica da microdiluição, sendo esta última o processo miniaturizado da técnica anterior, envolvendo por essa razão uma menor quantidade de reagentes, bem como um menor espaço para a sua incubação, tornando-se o método *golden standard* dos TSA.

Ambas as técnicas envolvem a realização de diluições seriadas do fármaco a testar. A inoculação da estirpe bacteriana em soluções de concentrações crescentes de antibiótico e subsequente avaliação



visual do crescimento bacteriano após 16-24 horas de incubação a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ , permitindo a determinação da CMI<sup>27</sup>. A precisão destes dois métodos é considerada de  $\pm 1$  diluição<sup>27</sup>.

Relativamente aos métodos de avaliação de suscetibilidade em meio sólido, existe o método da difusão em disco que consiste na inoculação de uma suspensão bacteriana equivalente a 0.5 unidades de McFarland em tapete em meio sólido, sobre o qual serão colocados de 4 a 12 discos impregnados com uma concentração conhecida fixa de antibiótico, segue-se uma incubação overnight a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ , possibilitando a medição do halo de inibição fornecendo um resultado qualitativo após interpretação, levando 24h<sup>27</sup>.

Outro método de avaliação de suscetibilidade realizado em meio sólido, é o método de difusão em gradiente,  $\epsilon$ -Test (*Epsilon Test*), que estabelece um gradiente de concentração do fármaco a testar permitindo a determinação da CMI do fármaco para a suspensão bacteriana testada. Necessita de uma incubação overnight a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ , sendo o seu resultado determinado pela interseção da parte inferior da do halo de inibição com a tira do teste após 24h de incubação<sup>27</sup>.

### **1.5.2. Sistemas Automatizados para a Determinação da Suscetibilidade**

A utilização de instrumentos automatizados tem a capacidade de standardizar a leitura dos resultados, bem como a capacidade de realizar os testes de suscetibilidade e gerar os seus resultados num período de tempo inferior aos métodos manuais. Dentro de todos estes sistemas, existem aqueles que apenas necessitam de um curto período de incubação que se estende de 3,5-16 horas para que os resultados estejam disponíveis, e ainda aqueles que necessitam de uma incubação overnight<sup>27</sup>.

Irá ser feita referência a quatro dos sistemas automatizados mais representativos nos laboratórios clínicos de microbiologia.

*MicroScan WalkAway* (Siemens Healthcare Diagnosis), é um aparelho que faz uso das microplacas de 96 poços de microdiluição. Trata-se de um sistema de incubação e leitura que tem a capacidade de realizar simultaneamente 40 a 96 placas de microdiluição.

A leitura por este aparelho é realizada recorrendo à quantificação de fluorocromos e pela análise da densidade ótica para que se determine o crescimento bacteriano. O período de incubação é variável de 3,5 a 18 horas, fornecendo um resultado quantitativo<sup>27</sup>.

*BD Phoenix Automated Microbiology* (BH Diagnosis), trata-se igualmente de um sistema de incubação e leitura de placas de microdiluição inoculadas manualmente. Este aparelho monitoriza a cada 20 minutos o estado do crescimento bacteriano utilizando duas técnicas; avaliação turbidimétrica do meio e a reação colorimétrica despoletada pela reação de oxidação-redução, sendo o resultado gerado por este sistema qualitativo. O período de incubação até os resultados estarem disponíveis varia de 6-16 horas<sup>27</sup>.

*Vitek 2* (BioMérieux), é um aparelho automatizado bastante compacto dado que os testes de sensibilidade aos antibióticos ocorrem em cartões de plástico que contém quantidades reduzidas de antibióticos. A avaliação do crescimento é acompanhada por monitorização turbidimétrica durante um curto período de tempo de incubação de 4 a 10 horas. O aparelho pode ser organizado de forma a acomodar de 30-240 testes simultâneos. O seu resultado é qualitativo embora possa em certos casos indicar a CMI, sendo este um valor inferido<sup>27</sup>.

*Sensitive AIRS 2X* (Trek Diagnosis Systems), embora este seja um aparelho que necessite de uma incubação *overnight*, tem uma capacidade para 64 placas de microdiluição. A grande vantagem deste sistema é a sua capacidade de inoculação automática das placas com o auto-inoculador. Sendo o crescimento posteriormente determinado por fluorescência após 18 a 24 horas<sup>27</sup>.

Todos estes sistemas automatizados são providos de Softwares que facilitam a interpretação dos resultados obtidos pelos TSA. Todos estes Sistemas automatizados contribuem para o menor tempo despendido entre a realização do teste e a informação chegar ao clínico.

TSA aos quais se consegue obter os resultados em tempo útil, levam a uma maior probabilidade de mudanças apropriadas na terapêutica antimicrobiana do doente, a uma redução substancial de custos inerentes, bem como a diminuição do tempo de internamento.

Por esta razão os testes automatizados de sensibilidade aos antibióticos são fundamentais, e deve ser cada vez maior o investimento em novas ferramentas de deteção de resistências aos antibióticos e determinação dos seus mecanismos.

### **1.6 Citometria de Fluxo como uma Nova Abordagem na Determinação da Suscetibilidade**

A citometria de fluxo (CF) foi inicialmente desenvolvida em 1960, no entanto, ao nível da microbiologia esta nova ferramenta só começou a ser utilizada dez anos mais tarde, em 1970. Sendo a técnica usada pela primeira vez em 1980 num diagnóstico clínico para a deteção de microorganismos no sangue<sup>28</sup>. Apenas nos últimos anos da década de 90 é que as aplicação da CF na microbiologia se expandiram<sup>29</sup>.

Os métodos tradicionais da microbiologia requerem o isolamento do microrganismo para que posteriormente se proceda à sua identificação e outros possíveis testes necessários como os testes de suscetibilidade aos antibióticos. Embora se tratem de métodos sensíveis e específicos, o tempo necessário para o seu isolamento e posterior replicação tornam-se demasiado longos em alguns casos críticos<sup>29</sup>. Nas infeções potencialmente ameaçadoras é necessária a implementação de uma terapia antimicrobiana o mais rápido possível baseada em diagnósticos rápidos e precisos.

As técnicas de biologia molecular e mais recentemente a espectroscopia de massa forneceram novas ferramentas à microbiologia particularmente no que diz respeito à identificação mas não relativamente ao perfil de suscetibilidade aos antibióticos<sup>30</sup>.

Já a CF tem um forte potencial para mudar o paradigma do diagnóstico na microbiologia. Podendo esta ferramenta ser aplicada à maioria das necessidades de um laboratório de microbiologia, obtendo resultados de forma rápida, em menos de quatro horas<sup>29</sup>.

Em comparação com outras técnicas a CF facilita a rápida aquisição de resultados, além de realizar uma análise multiparamétrica célula a célula<sup>28</sup>.

#### **1.6.1 Constituição do Citometro de Fluxo**

Relativamente à constituição de um citometro, este envolve várias partes compostas por sistemas complexos.

i) Um sistema hidráulico que é responsável pela geração do líquido corrente "líquido sheat" que envolve a suspensão. Tendo como função fazer com que as partículas atravessem o ponto de deteção a uma

velocidade constante<sup>29</sup>.

ii) Um sistema de iluminação que consiste no laser incidente que irá posteriormente causar uma dispersão no sinal quando as partículas passam no ponto de detecção<sup>29</sup>.

iii) Um sistema ótico, que tem como objetivo a recuperação da luz dispersa, e a captação da fluorescência emitida pelas partículas, direcionando essa informação para os tubos fotomultiplicadores<sup>29</sup>.

iv) Um sistema eletrônico que se ocupa pela transformação da luz refletida e fluorescência emitida em pulsos elétricos (analógico), sendo esses pulsos elétricos distribuídos por canais, permitindo a elaboração de histogramas (digital)<sup>29</sup>.

v) Sistema de análise de resultados, consistindo no *software* que permite a análise da informação multiparamétrica obtida. Os resultados podem ser apresentados sobre a forma de: histogramas ou dot plots<sup>29</sup>.

### **1.6.2 Capacidades do Citometro de Fluxo**

A CF é um método analítico que permite a rápida quantificação de luz refletida bem como da emissão fluorescente por células previamente marcadas. As células encontram-se suspensas num líquido e produzem um sinal quando atingidas por um laser no ponto de detecção. As lâmpadas de mercúrio ou os lasers são utilizados para intensificar os marcadores, sendo que esta parte do processo é individual, e por isso, os resultados representam características citométricas individuais acumuladas<sup>29</sup>. A luz refletida e a emissão fluorescente de cada partícula é coletada por um detetor e quantificada por tubos fotomultiplicadores<sup>28</sup> e posteriormente enviada a um computador onde será analisada a população de acordo com os diferentes parâmetros analisados (tamanho, complexidade, fluorescência)<sup>29</sup>. Sendo este processo capaz de analisar mil eventos por segundo<sup>28</sup>.

O tamanho e a complexidade são considerados parâmetros intrínsecos das células, os quais não necessitam de marcadores para serem determinados. Para obter informação adicional, uma vez que as partículas abióticas também possuem a capacidade de refletir luz, para que uma detecção mais específica seja realizada, deverá ocorrer uma marcação com moléculas fluorescentes<sup>28</sup>, adequados ao objetivo da análise<sup>29</sup>.

Os efeitos dos antimicrobianos são detetados pela variação de fluorescência devido aos danos causados nas células durante a incubação com o antibiótico. Sendo ainda permitido a visualização da heterogenicidade de respostas por parte das células ao agente antimicrobiano. Sendo esta heterogenicidade determinada pela identificação de subpopulações que são menos suscetíveis ao agente de tratamento<sup>29</sup>.

A luz refletida/fluorescência emitida é um parâmetro fundamental para avaliar o efeito dos antibióticos independentemente do seu mecanismo de ação<sup>29</sup>.

### **1.6.3 Vantagens e Desvantagens da Citometria de Fluxo**

Como vantagens a CF apresenta o facto de realizar uma análise multiparamétrica, ser um processo célere e ao mesmo tempo preciso (<5% erro)<sup>28</sup>. Apresentar uma avaliação célula a célula, ou seja, a avaliação distingue-se dos restantes métodos por não ser uma avaliação ao nível da população

mas sim uma avaliação individualizada, tendo a capacidade de determinar subtis variações dentro de uma mesma população. O caso de não ser um método que dependa de sub-cultura prévia enaltece também a CF, bem como o facto de não ser necessária a extração de ADN nem a amplificação do material genético a analisar.

A terapia antimicrobiana adequada deve ser instituída o mais rápido possível, sendo este um ponto crucial, a rapidez do diagnóstico é um dos fatores mais essenciais na luta contra a infeção, seguindo este ponto de vista, a capacidade que CF possui em apresentar resultados dentro de duas horas torna-a num instrumento com enorme potencial no mundo da microbiologia clínica<sup>29</sup>. O citometro de fluxo é um instrumento que se depreende com um variado leque de aplicações no âmbito da microbiologia, dependendo apenas de um único aparelho.

No que toca as desvantagens apresentadas pela CF é de apontar o facto de esta técnica ser restrita à utilização de amostras líquidas para que se proceda à sua análise, embora amostras sólidas e sedimentadas possam também ser analisadas, necessitando de um tratamento prévio. O seu elevado custo associado, bem como o fato de envolver uma análise de resultados sofisticada são outros dos pontos que dificultam a expansão desta nova metodologia<sup>28</sup>.

#### **1.6.4 Aplicações da Citometria de Fluxo na Microbiologia**

Como aplicações desta nova ferramenta podem ser enumeradas as seguintes:

Contagem total de células, tendo por base a ideia de que <1% dos microrganismos presentes no meio ambiente podem ser cultivados em meio sólido, e posterior seleção de microrganismos não cultiváveis<sup>28</sup>.

Aprovisiona uma análise da fisiologia celular, possuindo a capacidade de distinguir os diversos estados fisiológicos<sup>28</sup>. Permite também a determinação do mecanismo de ação de certos antibióticos bem como mecanismos de resistências aos fármacos.

Permite ainda a identificação microbiológica através da utilização de marcadores fluorescentes específicos para antigénios. Contudo este é um método bastante dirigido<sup>30</sup>.

Tem também a capacidade de traçar um perfil de suscetibilidade antimicrobiana, fornecendo resultados qualitativos<sup>30</sup>.

##### **1.6.4.1 Determinação do Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana por Citometria de Fluxo**

Os testes convencionais baseados na viabilidade do microrganismos crescerem na presença de diferentes antibióticos são morosos, demorando até 24 horas. Já os mais recentes métodos automáticos levam de 8 a 24 horas a lançarem resultados, o que continua a ser demasiado tempo para um doente numa situação clínica crítica. Por esta razão, a terapia empírica, baseada em sintomas e casos clínicos semelhantes ocorridos anteriormente em outros doentes, necessita de ser iniciada muitas das vezes. Esta é frequentemente composta por mais de um antibiótico, com espectros alargados. Após a saída dos resultados laboratoriais deveria existir uma alteração à prescrição realizada inicialmente, de forma a tornar a terapêutica a mais dirigida possível, no entanto, esta alteração nem sempre ocorre<sup>30</sup>.

Apenas quando o tempo despendido na realização de TSA for realmente curto, irá ser possível a recomendação de uma terapia dirigida e eficaz o mais rapidamente possível, dispensando até as terapias empíricas.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana realizados por citometria de fluxo foram otimizados para que seja possível fornecer um fenótipo para a maioria dos microrganismos clinicamente relevantes aos antibióticos recomendados, para que os resultados sejam disponibilizados em tempo útil, isto é, num espaço de tempo em que seja possível prolongar a situação clínica do doente sem que se inicie qualquer terapêutica empírica. Uma análise fenotípica que ocupe apenas 2 horas fornece um suporte importante a uma terapia direcionada e permite ainda o isolamento atempado de doentes portadores de estirpes multirresistentes<sup>30</sup>.

A CF possibilita a realização de uma análise exclusivamente fenotípica que se baseia no teste das concentrações dos antibióticos tabelados em vários protocolos como EUCAST e CLSI, comumente designados de *breakpoints*. Sendo realizada uma análise por citometria das lesões causadas nas células, marcadas com fluorocromos adequados, para cada uma das “concentrações breakpoints” de fármacos. Posteriormente ocorre uma estimativa do fenótipo apresentado pela estirpe, esta estimativa baseia-se nos valores de fluorescência apresentados para cada uma das duas concentrações de fármacos testadas<sup>30</sup>.

### **1.7 Objetivos do Trabalho**

Em primeiro lugar e como o próprio título indica, será otimizado e testado um novo método que permita não só a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) mas também a categorização do fenótipo pela técnica de citometria de fluxo (CF) para os antibióticos da classe dos carbapenemos.

Este novo método de determinação da CMI através da citometria de fluxo será comparado com o método *gold standard* dos testes de suscetibilidade, a microdiluição em caldo.

Um outro ponto a abordar ao longo deste trabalho será a estabilidade a curto e longo prazo dos fármacos nas microplacas de poliestireno utilizadas tanto para a técnica da microdiluição, bem como para a técnica de citometria de fluxo. Dado existirem estudos no sentido de que as condições de armazenamento das microplacas previamente preparadas podem reduzir a atividade dos antibióticos podendo causar alterações que afetem diretamente a quantificação da CMI. De forma a entender qual o melhor método de armazenamento destes testes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Otimização do Protocolo Citométrico para Avaliação da Concentração Mínima Inibitória aos Carbapenemos

#### 2.1.1. Estirpes Bacterianas

Para a otimização do protocolo citométrico foram utilizadas 4 estirpes de referência pertencentes à coleção de cultura americana (ATCC), nomeadamente a ATCC BAA-1705 – *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 8739 – *Escherichia coli*, ATCC 35218 – *Escherichia coli* e ATCC 27853 – *Pseudomonas aeruginosa*. As estirpes encontram-se conservadas a -80°C, numa solução de meio líquido Brain Heart (BHB, Liofilchem, Itália) suplementado com 20% de glicerol (Biochem chemopharma, França). Previamente a cada experiência, as estirpes bacterianas foram sub-cultivadas em meio Brain Heart agar (BHA, Liofilchem, Itália), de forma a garantir a sua viabilidade.

#### 2.1.2. Antimicrobianos e Reagentes

Os antimicrobianos utilizados na realização deste estudo foram o meropenemo (MRP, I0090000) e o imipenemo (IMI, Y0001252), ambos adquiridos à *European Pharmacopoeia*. Foram armazenados e preparados de acordo com as instruções do fabricante, e dissolvidos numa solução 0.01 M de tampão fosfato (PBS) (Formedium Hunstanton, Inglaterra) pH 7.2<sup>31</sup>.

O protocolo citométrico foi otimizado com recurso a dois marcadores fluorescentes, um marcador indicador do potencial de membrana e um marcador indicador de lesão de membrana. O primeiro, marcador indicador do potencial de membrana (PM), aumenta a fluorescência verde quando a célula se encontra despolarizada<sup>32</sup>. O marcador indicador de lesão de membrana (LM), apenas penetra em células cuja membrana citoplasmática se encontra consideravelmente danificada, sendo por isso um indicador de morte celular<sup>32</sup>. A entrada deste composto nas células é acompanhada por um aumento da fluorescência no comprimento de onda do vermelho. Células com a membrana celular íntegra são impermeáveis a este composto<sup>32</sup>.

Ambos os marcadores fluorescentes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck KGaA, Alemanha) e diluídos em H<sub>2</sub>O tipo II autoclavada.

#### 2.1.3. Protocolo de Referência para a Determinação da Concentração Mínima Inibitória aos Carbapenemos

A concentração mínima inibitória (CMI) das estirpes bacterianas foi determinada pelo método de referência de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo para a realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos em bactérias aeróbias disponibilizado pelo CLSI<sup>31</sup>. O MRP e o IMI foram testados em concentrações entre 0.06 – 32 µg/mL; foram preparadas diluições seriadas de cada um dos antimicrobianos em meio de cultura líquido Muller-Hinton cation Adjusted Ca<sup>2+</sup> 12 (MHB-Ca<sup>2+</sup>, Sigma-Aldrich, Índia)<sup>31</sup>, tendo-se distribuído 50 µL de cada diluição nas placas de 96 poços (Thermo Scientific, Dinamarca).

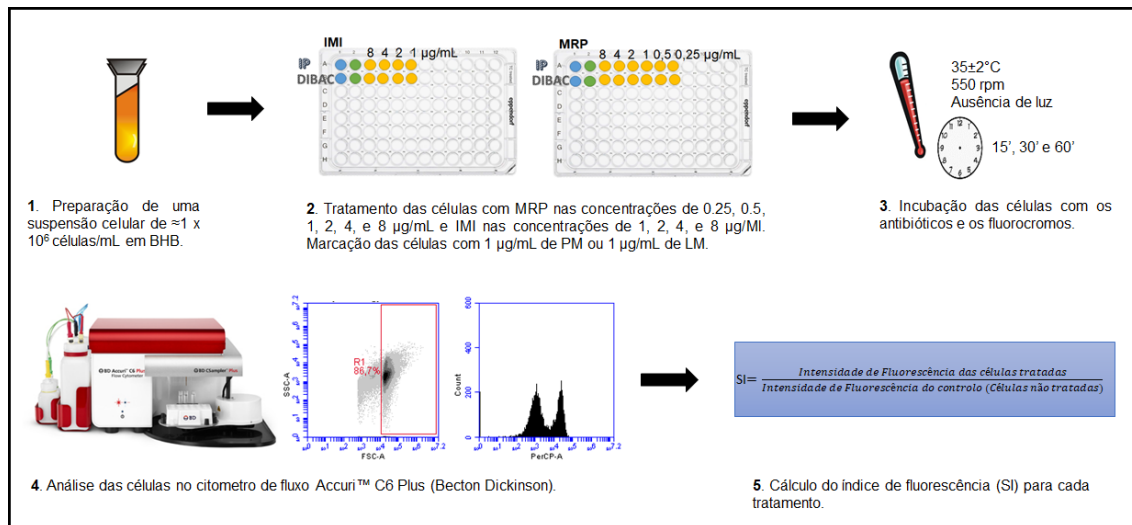
Em seguida procedeu-se à preparação do inóculo bacteriano contendo  $5 \times 10^6$  células/mL<sup>31</sup>. Para cada estirpe a testar foi incluído um controlo positivo, contendo apenas meio de cultura e o inóculo de maneira a verificar a viabilidade bacteriana, e um controlo negativo contendo o fármaco na sua concentração mais baixa e meio de cultura de forma a controlar a presença de possíveis contaminações. Ambos os controlos são necessários para a validação do ensaio.

Após a inoculação das microplacas, procedeu-se a uma incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16-24 horas, ao fim das quais se realizou a leitura ótica dos resultados. A concentração mínima inibitória foi considerada a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento bacteriano.

#### **2.1.4. Protocolo Citométrico para Determinação da Concentração Mínima Inibitória aos Carbapenemos**

Para otimização do protocolo citométrico foi realizado um estudo cinético da atividade antibacteriana do MRP e IMI por citometria de fluxo. Com este ensaio pretendeu-se selecionar o melhor marcador fluorescente para evidenciar no menor tempo possível as lesões celulares causadas pela exposição ao MRP e IMI, permitindo discriminar entre uma estirpe suscetível e uma estirpe resistente.

As estirpes bacterianas (2 suscetíveis e 2 resistentes aos respetivos fármacos), foram inoculadas em BHB e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  até atingir a fase exponencial ( $\pm 2$  h). Em seguida, preparou-se uma suspensão celular de cada estirpe contendo  $\approx 1 \times 10^6$  células/mL. As células foram tratadas com IMI nas concentrações de 1, 2, 4, e 8  $\mu\text{g/mL}$  e MRP nas concentrações de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, e 8  $\mu\text{g/mL}$  e marcadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  de PM e 1  $\mu\text{g/mL}$  de LM (**figura 2.1**). Para cada estirpe foram preparadas 3 placas de 96 poços, contendo os fármacos nas diferentes concentrações e os respetivos marcadores fluorescentes, as quais foram submetidas a diferentes períodos de incubação: 15, 30 e 60 minutos a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , com agitação (550 rpm) protegidas da luz. Para cada ensaio foram incluídos dois controlos, células viáveis e marcadas com cada um dos marcadores fluorescentes, PM e LM, e células viáveis não marcadas (controlo de autofluorescência). Após incubação, as células foram analisadas no citómetro de fluxo Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson), onde foi definido uma região de análise “*gate*” para populações de bactérias. Para análise dos resultados foram considerados vários parâmetros, tais como, tamanho e complexidade das células, intensidade de fluorescência e número de células no gate.



**Figura 2.1.** Fluxograma da otimização do protocolo citométrico.

Este protocolo foi também aplicado diretamente a partir de hemoculturas positivas. As mesmas estirpes bacterianas foram inoculadas numa concentração de  $1 \times 10^3$  células/mL<sup>33</sup> em hemocultura de aerobiose (Becton Dickinson, EUA), contendo  $\approx 8$  mL de sangue de dador humano e incubadas num equipamento próprio, Bactec 9050 (Becton Dickinson, EUA), até positivarem ( $\approx 5$  horas)<sup>33</sup>. As células bacterianas foram extraídas das garrafas de hemocultura através de um protocolo que consiste na transferência de 5 mL de sangue para um tubo de gel, Vacutainer® Barricor™ (Becton Dickinson, EUA), seguido de uma centrifugação que irá separar os componentes sanguíneos de acordo com o seu peso molecular, colocando as células bacterianas na superfície do gel. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* foi resuspenso em 1 mL de soro fisiológico. Em seguida, realizou-se uma outra centrifugação, onde o sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* foi resuspenso em 1 mL de MHB- $\text{Ca}^{2+}$ . A partir desta suspensão ajustou-se o inóculo a 0.5 McFarland e realizou-se uma diluição 1:10. Esta última suspensão celular foi então submetida aos tratamentos e marcações anteriormente descritos (**figura 2.1**), incubada nos diferentes tempos e analisada no citometro de fluxo.

Cada ensaio foi realizado em triplicado.

## 2.2. Prova de Conceito em Hemoculturas

A fim de demonstrar a validade deste novo protocolo citométrico para determinação dos valores de CMI ao meropenemo e imipenemo a partir de hemoculturas positivas foi realizada uma prova de conceito. A primeira etapa deste estudo consistiu na produção dos testes – microplacas contendo as diluições seriadas dos antimicrobianos e o respetivo fluorocromo que foram utilizadas após a sua produção.

Em seguida, procedeu-se aos estudos de estabilidade dos antimicrobianos submetidos a diferentes condições de armazenamento.

Por último, procedeu-se à validação dos testes por citometria de fluxo a partir de hemoculturas

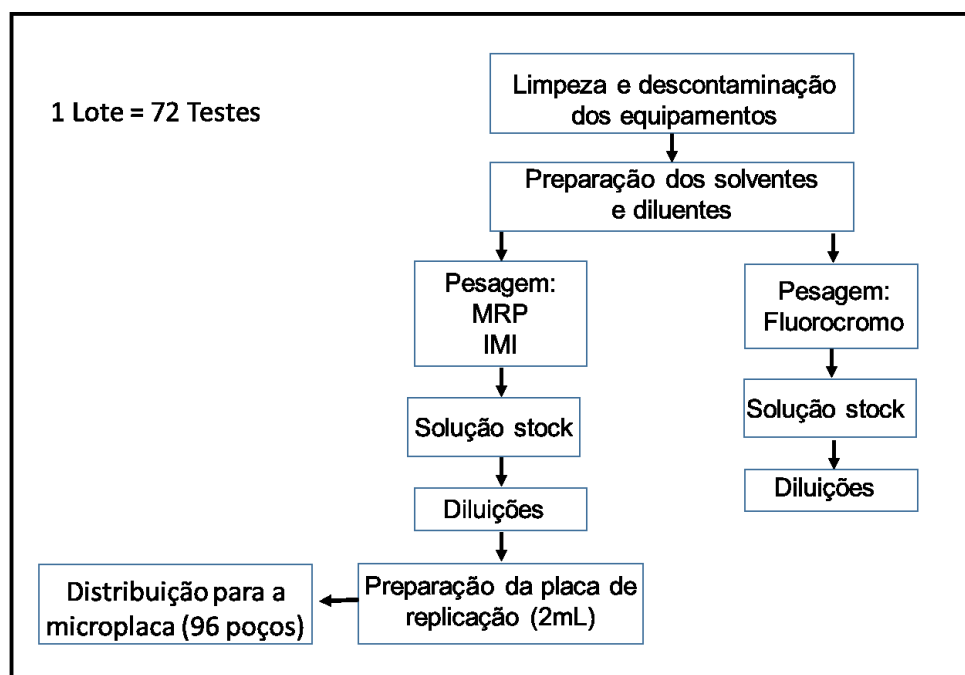


positivas, inoculadas com diferentes isolados clínicos e estirpes de controlo previamente caracterizadas relativamente aos antimicrobianos em estudo.

### 2.2.1. Produção dos Testes para Citometria de Fluxo

Os testes para determinação do CMI por citometria de fluxo foram preparados de acordo com o esquema representado na **figura 2.2**. Para cada antimicrobiano em estudo foram realizadas diluições seriadas com uma solução de manitol 5% (D-Mannitol, Sigma-Aldrich, Índia): MRP 1 – 8 µg/mL e IMI 1 – 8 µg/mL. Em seguida preparou-se uma “placa de replicação”, que consiste numa placa de poliestireno de 96 poços, com um volume de 2 mL por poço; as diluições de MRP e IMI e os respetivos controlos foram transferidos para esta placa. O conteúdo da “placa de replicação” foi distribuído com um pipetador automático para 72 microplacas (96 poços). Os testes para a prova de conceito foram armazenados a -80°C, de acordo com o protocolo CLSI, que refere que o congelamento das microplacas para teste deve ser feito a uma temperatura ≤ -60°C e nunca > -20°C<sup>31</sup>.

A marcação com o flurocromo foi apenas realizada no momento em que se pretende usar o teste, com 1µg/mL de PM.




**Figura 2.2.** Fluxograma de produção dos testes para citometria de fluxo.

#### 2.2.1.1. Estudo da Estabilidade dos Fármacos

Durante a produção das placas teste (ver ponto 2.2.1) foram produzidas 18 placas, as quais foram submetidas a diferentes processos de preservação: liofilização, congelamento a -80° e -20°, conforme se encontra descrito na **tabela 1.1**. A estabilidade dos antimicrobianos foi estudada através da determinação da CMI ao MRP e IMI a 8 estirpes de controlo cuja CMI era previamente conhecida, de acordo com o protocolo CLSI. Para este estudo não foi incluída a marcação com flurocromo, seguindo-se o protocolo clássico da microdiluição em caldo.

**Tabela 1.1.** Planificação para o estudo da estabilidade do meropenemo e imipenemo.

Condições de Armazenamento:	Dias de Avaliação					
	1	8	15	30	60	90
Liofilizadas e armazenadas a T <sub>amb</sub>						
Congeladas a - 80°C						
Congeladas a - 20°C						

### 2.2.2. Estirpes Bacterianas

Para a realização da prova de conceito foram estudados noventa e sete isolados clínicos e oito estirpes de referência de Gram negativo, que incluíram: 36 estirpes da família das *Enterobacteriaceae*, 36 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e 33 estirpes do género *Acinetobacter spp.* Os isolados clínicos estudados fazem parte da Coleção de bactérias do Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, os quais se encontram armazenados em BHB suplementado com 20% de glicerol, a -80°C. Antes de cada experiência, as estirpes foram cultivadas em meio sólido BHA.

O fenótipo de suscetibilidade ao MRP e IMI das estirpes incluídas neste estudo foi previamente determinado de acordo com o protocolo CLSI.

### 2.2.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória por Citometria de Fluxo

Cada estirpe bacteriana foi inoculada em uma hemocultura em aerobiose numa concentração de  $1 \times 10^3$  células/mL. As garrafas foram incubadas até positivarem e o protocolo para extração de bactérias descrito no ponto 2.1.4. foi realizado. As placas teste foram marcadas com 1µg/mL de PM e inoculados com uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^7$  células/mL e incubadas durante 1 hora, a 37°C, protegidas de luz. Após os 60 minutos de período de incubação, as placas de teste foram analisadas no citómetro de fluxo Accuri™ C6 Plus. Para cada concentração de antimicrobiano testado foi determinado um índice de fluorescência (SI), definido como a razão entre a intensidade de fluorescência das células tratadas e a intensidade de fluorescência das células não tratadas (controlo). Com base neste índice de fluorescência foi determinada a “Concentração Mínima Fluorescente” (CMF), que consiste na menor concentração de fármaco que despoleta um aumento de fluorescência. Com base na avaliação dos valores de CMF obtidos foi possível determinar o CMI para cada uma das estirpes bacterianas.

### 2.2.4 Análise Estatística

A distribuição das variáveis foi estudada através do teste de normalidade Shapiro-Wilk. Como se confirmou que as variáveis em estudo não seguiam uma distribuição normal, foram aplicados testes não paramétricos para o estudo dessas mesmas variáveis.

No estudo de otimização, as diferenças nas estirpes suscetíveis e resistentes, resultantes da exposição a cada antimicrobiano, MRP e IMI, ao longo do tempo (15, 30 e 60 min), foram avaliadas pela aplicação do Teste de Friedman. Sempre que o resultado do teste de Friedman mostrou existirem

diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados, foi utilizado o Teste de Wilcoxon para estudar em que período ocorreram essas diferenças, entre os 15 e os 30 min e/ou entre os 30 e os 60 min.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para estudar as diferenças entre as estirpes suscetíveis e as resistentes, causadas pela ação dos antimicrobianos, para o tempo de incubação escolhido para a avaliação da suscetibilidade. Foi considerado um nível de significância de 0.05 para todos os testes efetuados.

No estudo de estabilidade do meropenemo e do imipenemo, as diferenças nas concentrações mínimas inibitórias, ao longo do tempo (8, 15, 30, 60, 90 dias), para cada condição de armazenamento (congelação a  $-80^{\circ}\text{C}$ , congelação a  $-20^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas), foram estudadas pela aplicação do coeficiente de Kappa de Cohen.

Os valores de corte para cada concentração de MRP e IMI e os respectivos intervalos de confiança (95%), foram calculados através de modelos lineares multivariados. Como variáveis dependentes foram utilizados os valores de SI obtidos para cada concentração de MRP e IMI testadas e como fator fixo utilizou-se o valor de CMI determinado pelo método de referência. As variáveis dependentes foram categorizadas de acordo com os valores de corte gerados, permitindo a determinação da CMF. A proporção de concordância (PC) entre os valores de CMI e os valores de CMF foi determinada para cada fármaco em estudo.

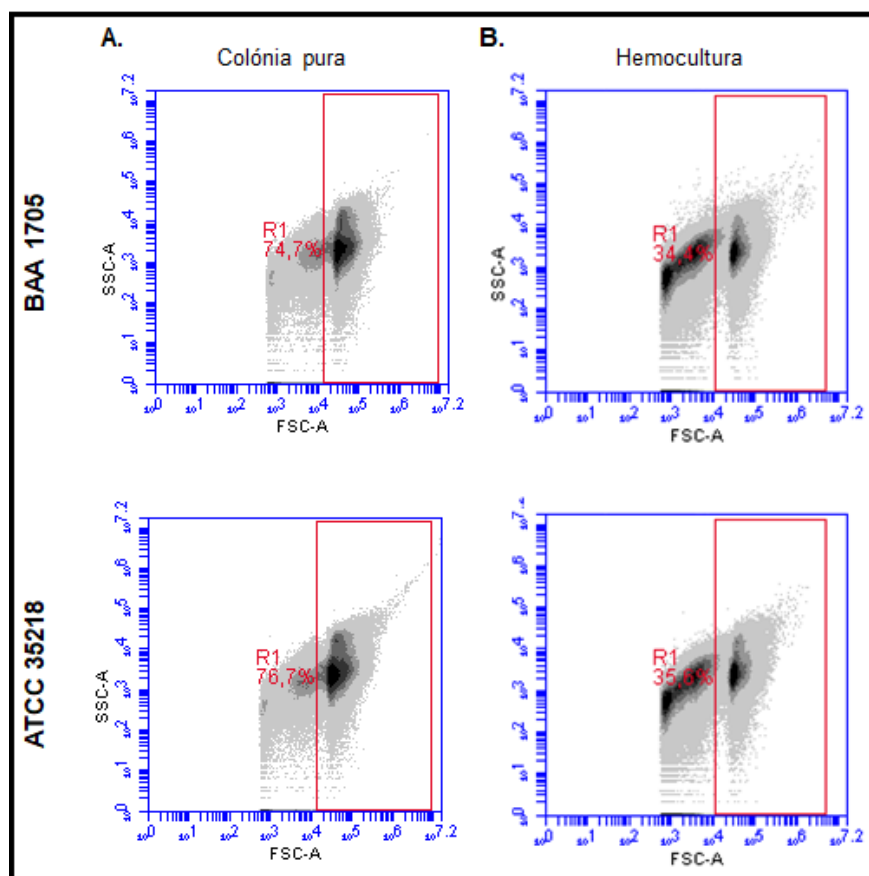
A análise estatística deste trabalho foi realizada com o programa IBM SPSS Statistics versão 24.0.

### 3.RESULTADOS

#### 3.1. Otimização do Protocolo Citométrico para Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias

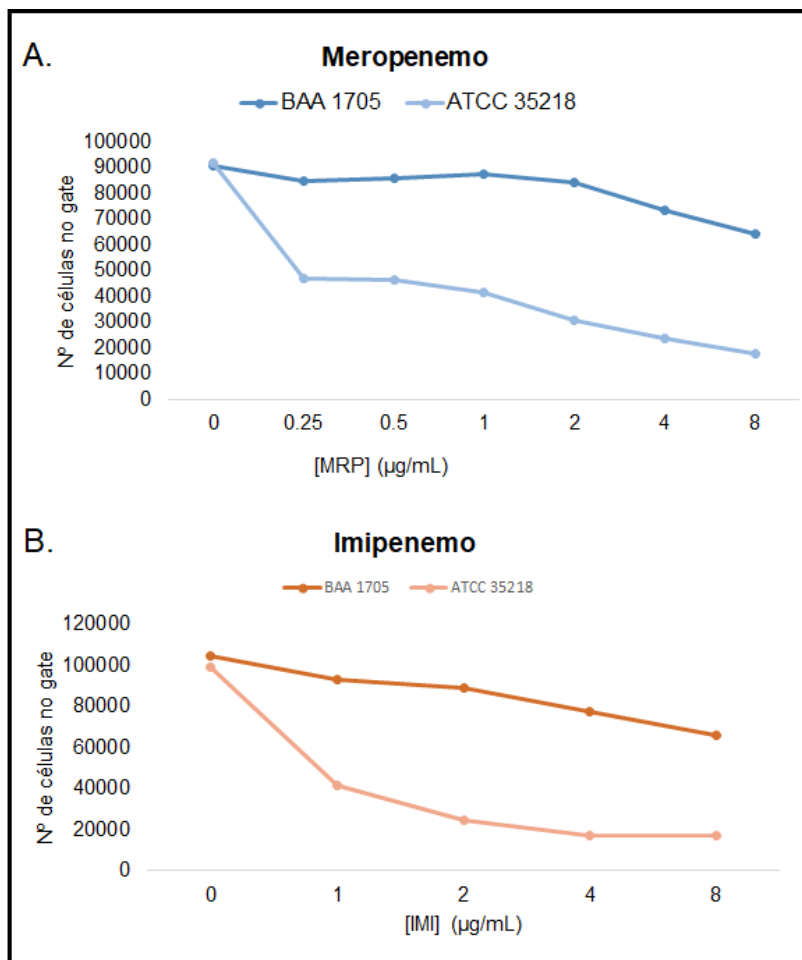
##### 3.1.1 Determinação da Região de Análise - Gate

A região de análise para a população bacteriana otimizada através de uma suspensão celular pura, definiu-se a partir da quarta década logarítmica no eixo do *forward scatter*, como representado pelo retângulo vermelho na **figura 3.1. – A**. As células bacterianas extraídas de uma hemocultura positiva, quando analisadas também se apresentaram no *gate* previamente definido **figura 3.1. – B**, embora evidenciando-se outras subpopulações celulares fora da região de análise.



**Figura 3.1.** Scattergram representativo da distribuição da população das estirpes de controle de qualidade *K. pneumoniae* BAA 1705 e *E. coli* ATCC 35218, obtidas a partir de (A) uma colônia pura crescida em caldo e (B) de uma hemocultura positiva. SSC – Side Scatter; FSC- Foward Scatter.

A monitorização do número de células presentes no interior do *gate* ao longo dos diferentes tempos de incubação para cada um dos antimicrobianos em estudo, revelou uma diminuição da quantidade de células no *gate* para ambas as estirpes ATCC 35218 (estirpe suscetível) e para a estirpe ATCC BAA 1705 (estirpe resistente). No entanto, a diminuição de células no *gate* é bastante mais acentuada no caso das estirpes suscetíveis, sendo essa diminuição verificada logo nas concentrações de fármaco mais baixas. No caso das estirpes resistentes a diminuição de células no *gate* é menos acentuada e apenas se verifica para as concentrações de fármaco mais elevadas (**Figura 3.2.**). Os resultados foram semelhantes independentemente do carbapenemo avaliado, MRP (**Figura 3.2. – A**) e IMI (**Figura 3.2. – B**).



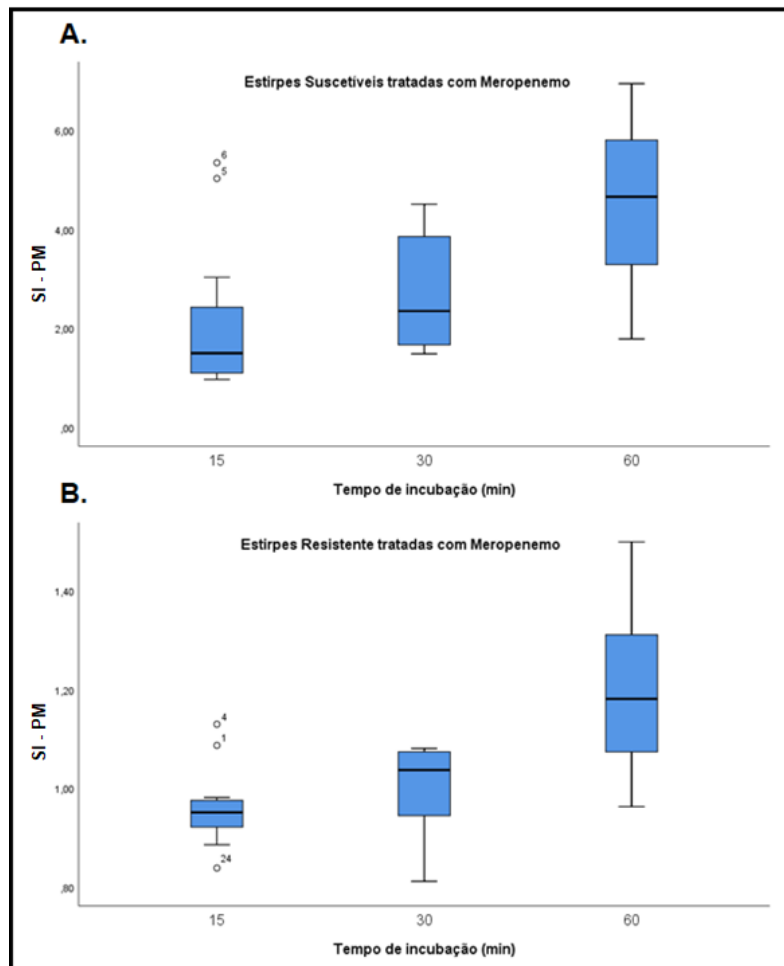
**Figura 3.2.** Gráfico representativo do número de células no *gate* de análise definido ao longo dos diferentes tempos de incubação, (**A**) estirpes bacterianas tratadas com meropenemo e (**B**) estirpes bacterianas tratadas com imipenemo. ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) ATCC 35218 (estirpe suscetível).

### 3.1.2 Otimização das Condições de Marcação

A atividade antibacteriana do MRP e do IMI foi estudada com recurso aos marcadores fluorescentes, PM e LM durante 15, 30 e 60 min de incubação.

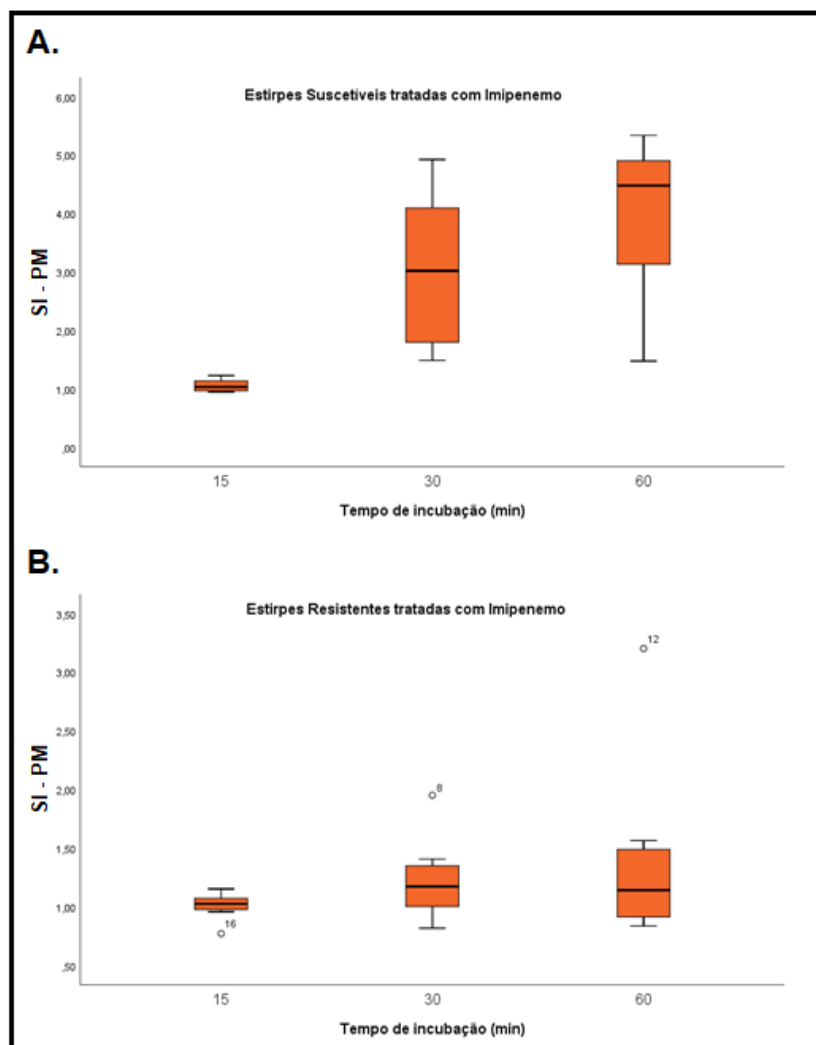
### 3.1.2.1. Marcação com Marcador de Potencial de Membrana

Os dados citométricos, expressos pelo valor de SI, mostraram que quando as células bacterianas são tratadas com MRP e marcadas com PM apresentaram diferenças estatisticamente significativas no SI obtido para cada concentração de fármaco testado para os diferentes tempos de incubação, quer para as estirpes suscetíveis ( $p = 0.046$ , **figura 3.3. – A**), quer para as estirpes resistentes ( $p = 0.004$  **figura 3.3. – B**); para ambos os fenótipos estas diferenças foram detetadas entre os tempos de incubação 30' e 60' ( $p = 0.006$  e  $p = 0.010$ , respetivamente; **Figura 3.3.**).



**Figura 3.3.** Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes **(A)** suscetíveis e **(B)** resistentes tratadas com meropenem e marcadas com marcador de potencial de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B)

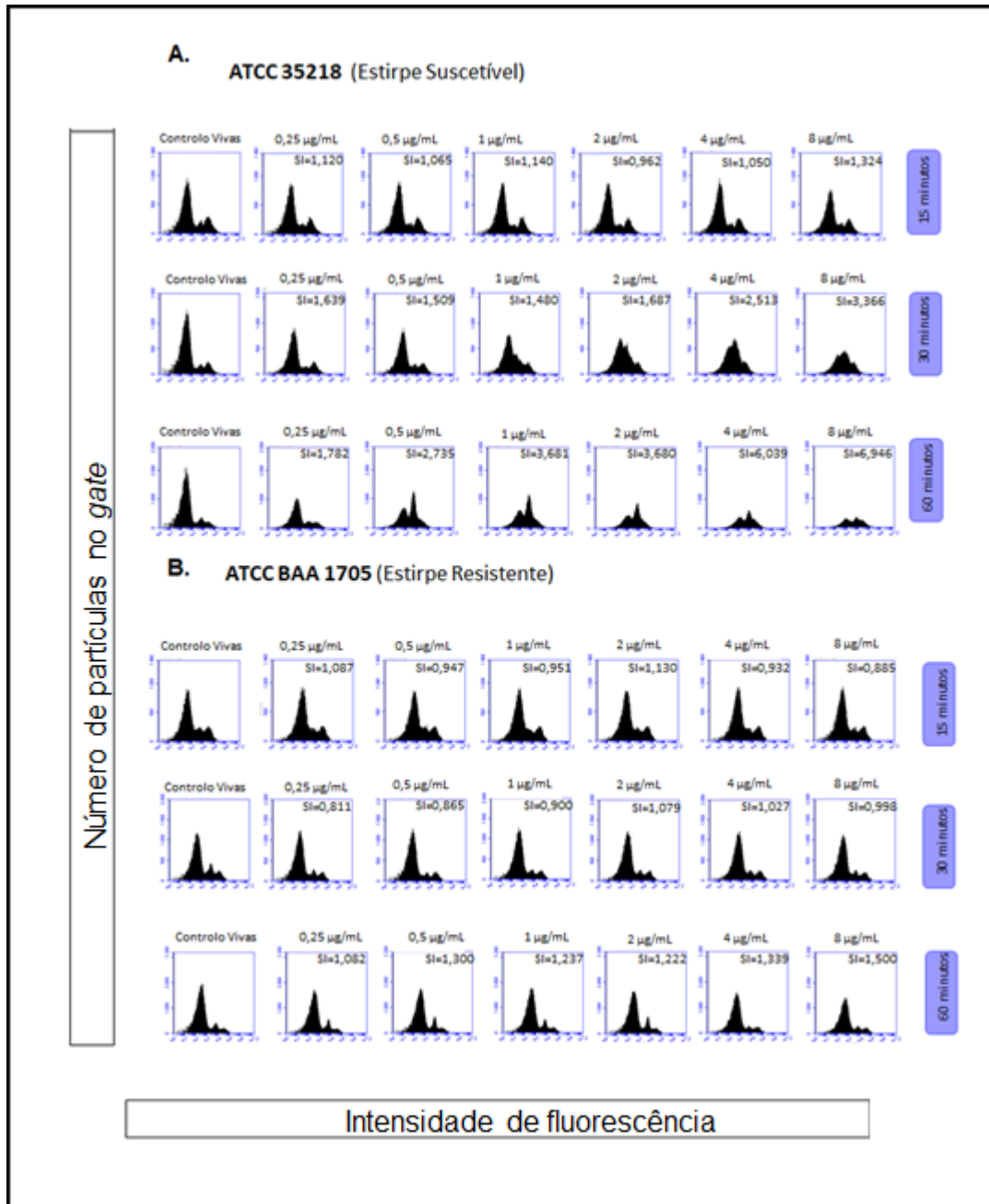
Quando as células bacterianas são tratadas com IMI e marcadas com PM, apresentaram diferenças estatisticamente significativas no valor de SI obtido para cada concentração de fármaco testado para os diferentes tempos de incubação no que diz respeito às estirpes suscetíveis ( $p = 0,002$ ), sendo que essas alterações no valor de SI ocorreram entre o tempo de incubação 15' e 30' ( $p = 0,012$ , **figura 3.4. – A**), entre os tempos de incubação 30' e 60' não se verificaram alterações estatísticas entre esses tempos de incubação ( $p = 0,069$ ). Pelo contrário, não se verificaram diferenças estatísticas significativas no valor de SI obtido para cada concentração de fármaco testada para os diferentes tempos de incubação para as estirpes resistentes ( $p = 0,607$ , **figura 3.4. – B**).



**Figura 3.4.** Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes **(A)** suscetíveis e **(B)** resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador de potencial de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B)

As diferenças na distribuição da fluorescência são também visíveis através da análise dos histogramas representativos de uma estirpe suscetível (ATCC 35218) e de uma estirpe resistente (ATCC - BAA 1705).

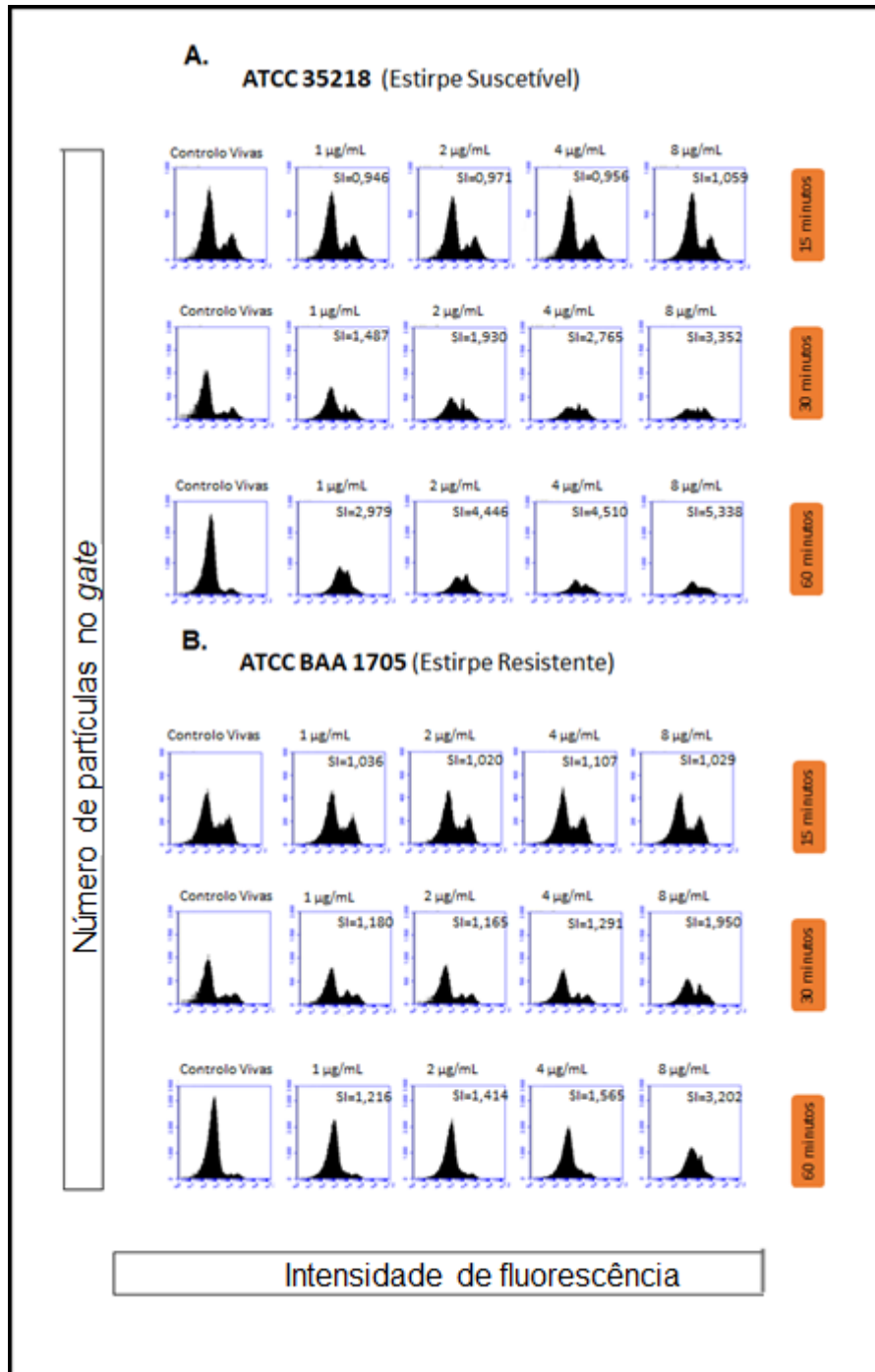
Os histogramas referentes às estirpes tratadas com MRP e marcadas com PM, e incubadas nos diferentes tempos em estudo estão representados na **Figura 3.5.**



**Figura 3.5.** Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe (A) ATCC 35218 (estirpe suscetível) e pela estirpe (B) ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com meropenem nas concentrações de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de potencial de membrana



Os histogramas para as mesmas estirpes tratadas com IMI e marcadas com PM, e incubadas nos diferentes tempos em estudo encontram-se na **Figura 3.6.**



**Figura 3.6.** Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe (A) ATCC 35218 (estirpe suscetível) e pela estirpe (B) ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com imipenemo nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de potencial de membrana.

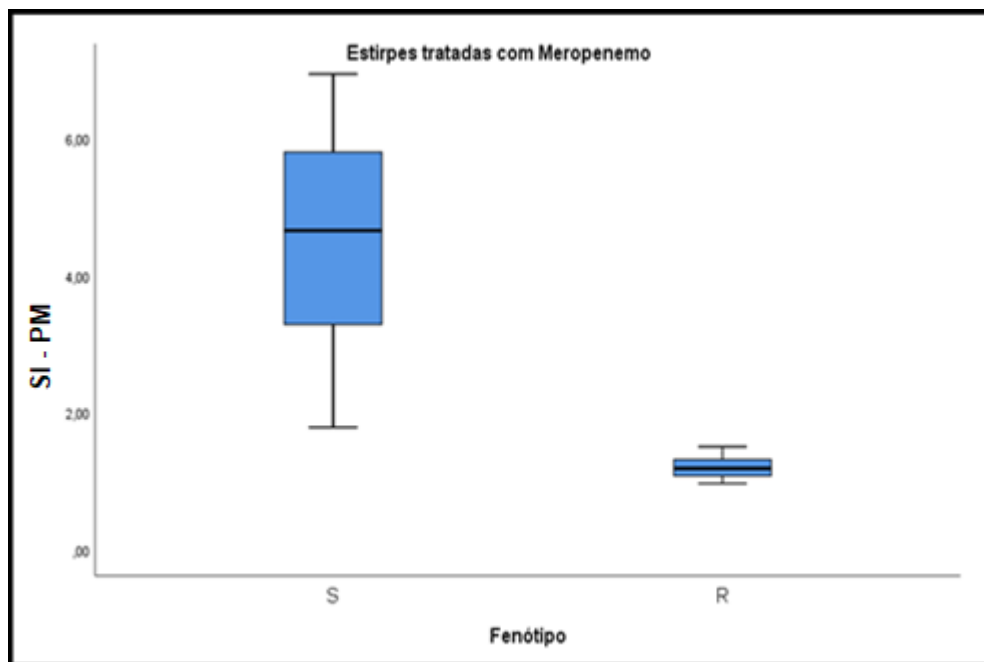
Através da análise dos histogramas da estirpe suscetível (**Figura 3.5. – A** e **Figura 3.6. – A**), verificou-se que o efeito dos carbapenemos, revelado pela marcação com PM, foi diretamente proporcional ao tempo e à concentração de fármaco, sendo mais evidenciado ao fim de 60' de incubação para as

concentrações de fármaco mais elevadas pelo aumento de fluorescência das células tratadas relativamente ao controlo (SI=5,338).

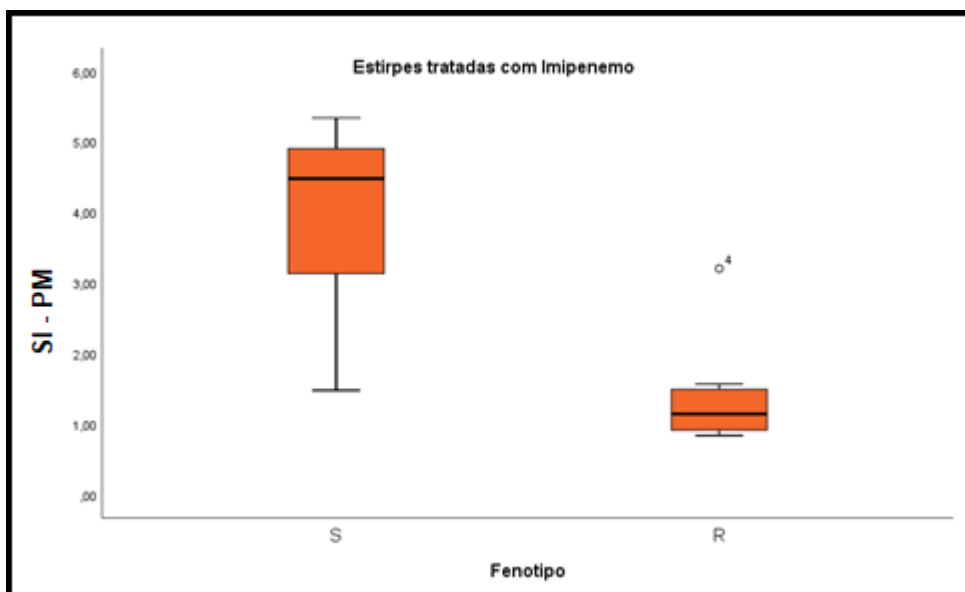
Por sua vez, a análise dos histogramas da estirpe resistente (**Figura 3.5. – B e Figura 3.6. – B**), mostrou que o efeito do carbapenemos manteve-se relativamente constante ao longo do tempo, sem alterações de fluorescência das células tratadas relativamente ao controlo, verificando-se apenas uma ligeira alteração de fluorescência ao fim de 60' de incubação para as concentrações de fármaco mais elevadas (SI=3,202).

A distribuição de fluorescência apresentada pelas estirpes S e R, mostrou ser possível discriminar estes fenótipos ao fim de 30' de incubação. No entanto, após 60' de incubação as diferenças na distribuição de fluorescência apresentaram maior poder discriminatório (**Figura 3.5. e 3.6.**).

Após 60' de incubação detetaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os SI da marcação com PM apresentados pelas estirpes S e R tratadas com meropenemo bem como para as estirpes que foram tratadas com imipenemo ( $p < 0,001$  e  $p = 0,002$ , respetivamente), sendo possível uma discriminação clara entre os fenótipos suscetível e resistente (**Figura 3.7. e 3.8.**, respetivamente).



**Figura 3.7.** Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador do potencial de membrana durante 60 min.

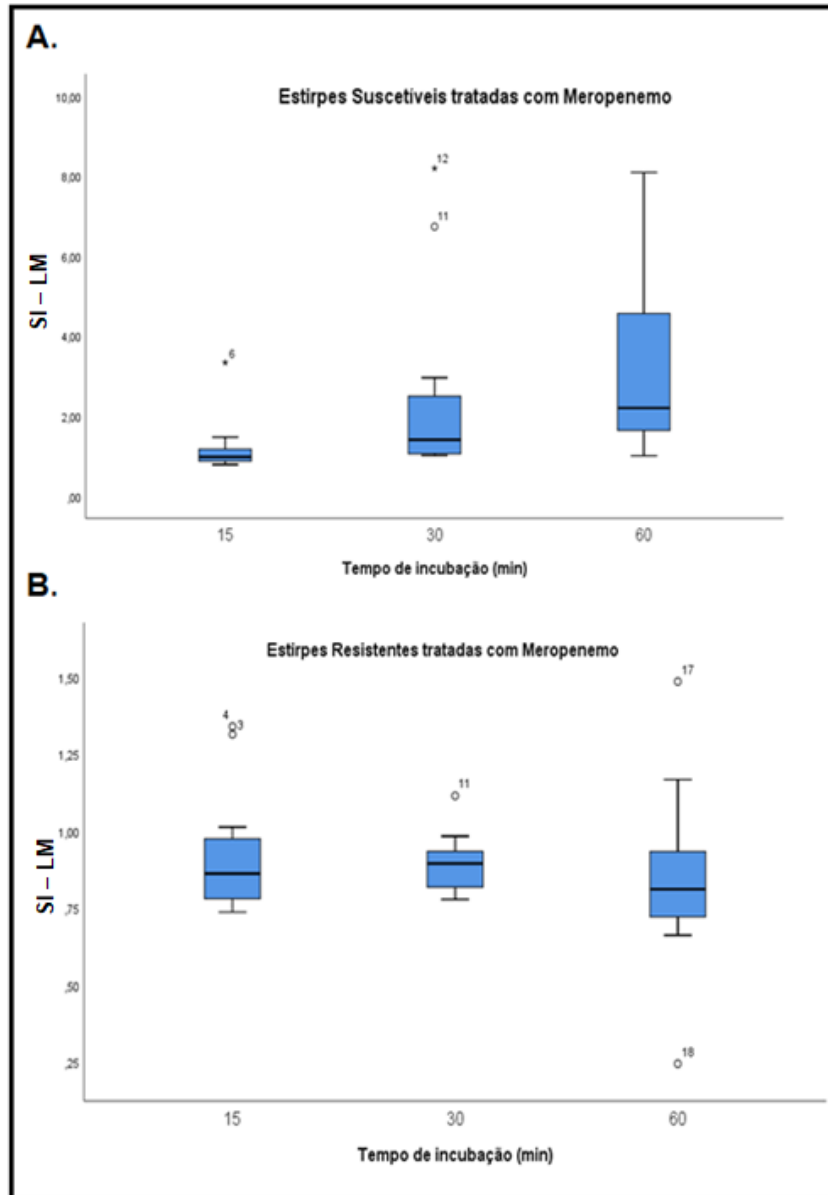


**Figura 3.8.** Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador potencial de membrana durante 60 min.

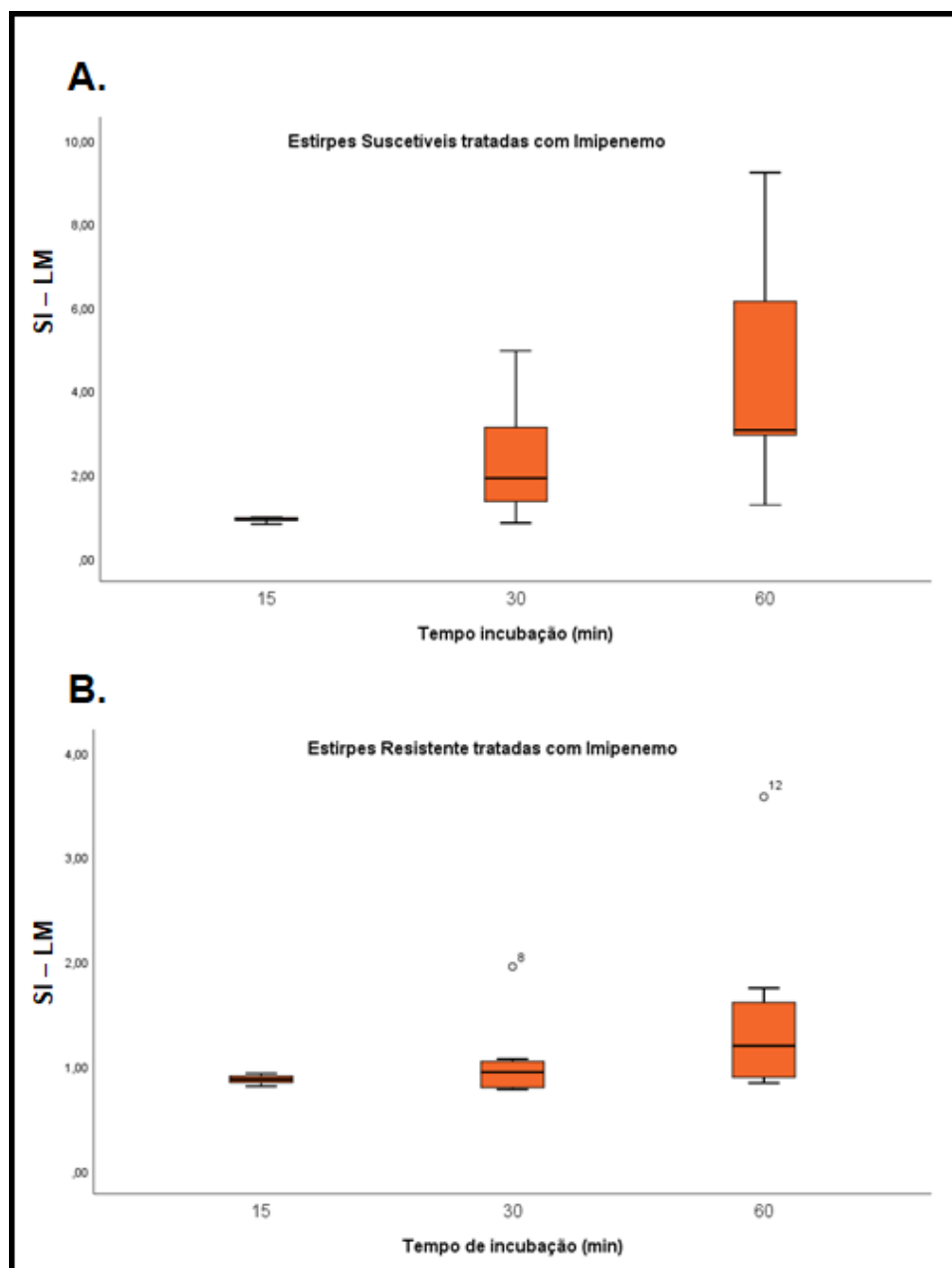
### 3.1.2.2. Marcação com Marcador de Lesão de Membrana

Os dados citométricos, expressos pelo valor de SI, mostraram que quando as células bacterianas são tratadas com MRP e marcadas com LM, apresentam diferenças estatisticamente significativas no SI obtido para cada concentração de fármaco testado para os diferentes tempos de incubação para as estirpes suscetíveis ( $p < 0.001$ ), sendo essas diferenças detetadas entre o tempo de incubação 15' e 30' ( $p = 0.002$ , **Figura 3.9. – A**) entre os tempos de incubação 30' e 60' não se verificaram alterações estatísticas entre esses tempos de incubação ( $p = 0.754$ ). Relativamente às estirpes resistentes, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no SI obtido para cada concentração de fármaco testado para os diferentes tempos de incubação ( $p = 0.368$ , **Figura 3.9. – B**).

Quando as estirpes suscetíveis foram tratadas com IMI e marcadas com LM, apresentaram diferenças estatisticamente significativas no valor de SI obtido para cada concentração de fármaco testado para os diferentes tempos de incubação ( $p = 0,001$ ), sendo que essas alterações no valor de SI ocorrem entre o tempo de incubação 15' e 30' e entre o tempo de incubação 30' e 60' ( $p = 0,016$  e  $p = 0,008$ , respectivamente, **figura 3.10. – A**). Não se verificam diferenças estatísticas significativas no valor de SI obtido para cada concentração de fármaco testada para os diferentes tempos de incubação para as estirpes resistentes ( $p = 0.197$ , **figura 3.10. – B**).



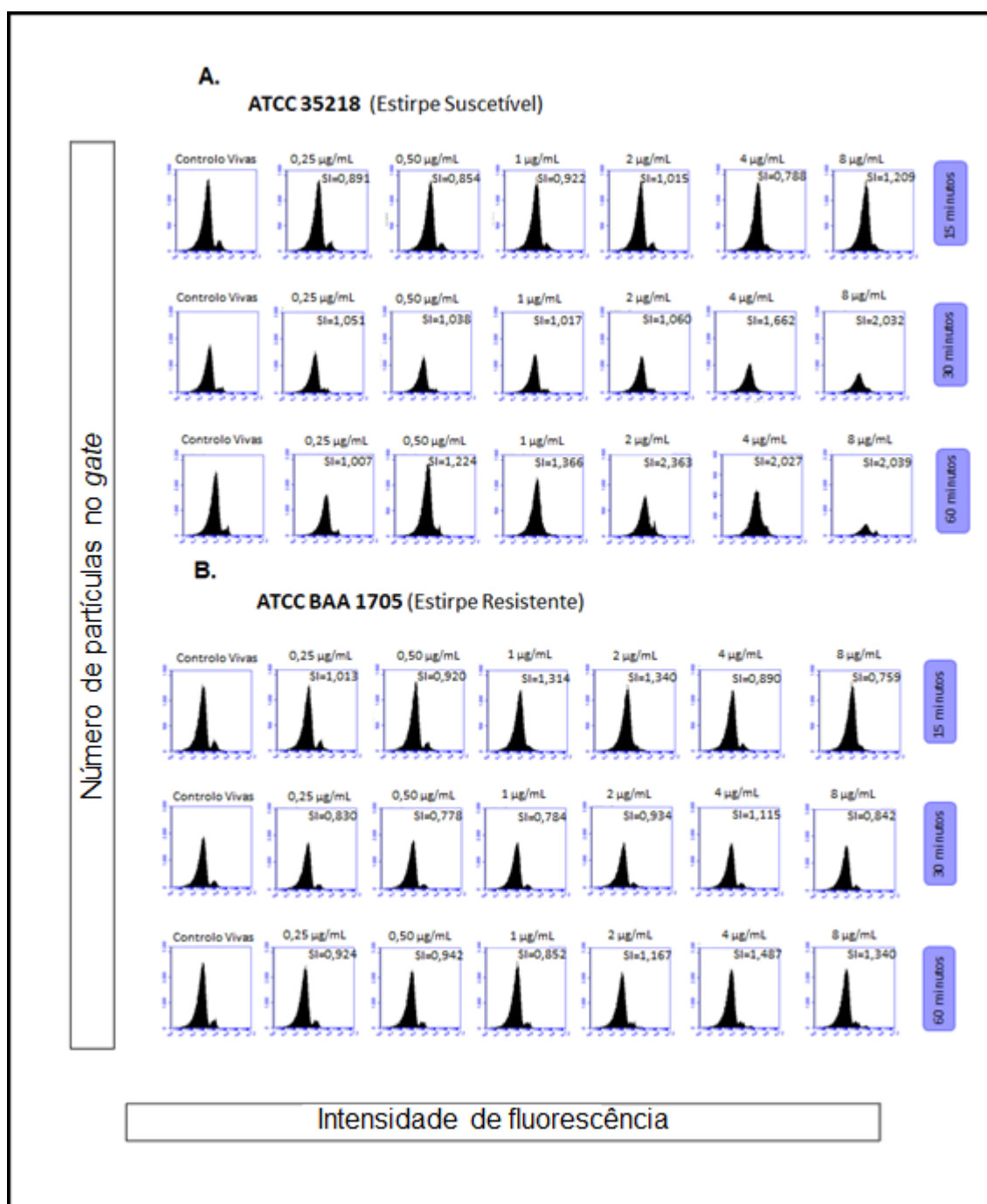
**Figura 3.9.** Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes **(A)** suscetíveis e **(B)** resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B)



**Figura 3.10.** Boxplots representativos da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para os diferentes tempos de incubação, relativamente às estirpes **(A)** suscetíveis e **(B)** resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana. (De salientar que a escala do eixo Y (SI-PM) possuiu diferentes valores em A e B)

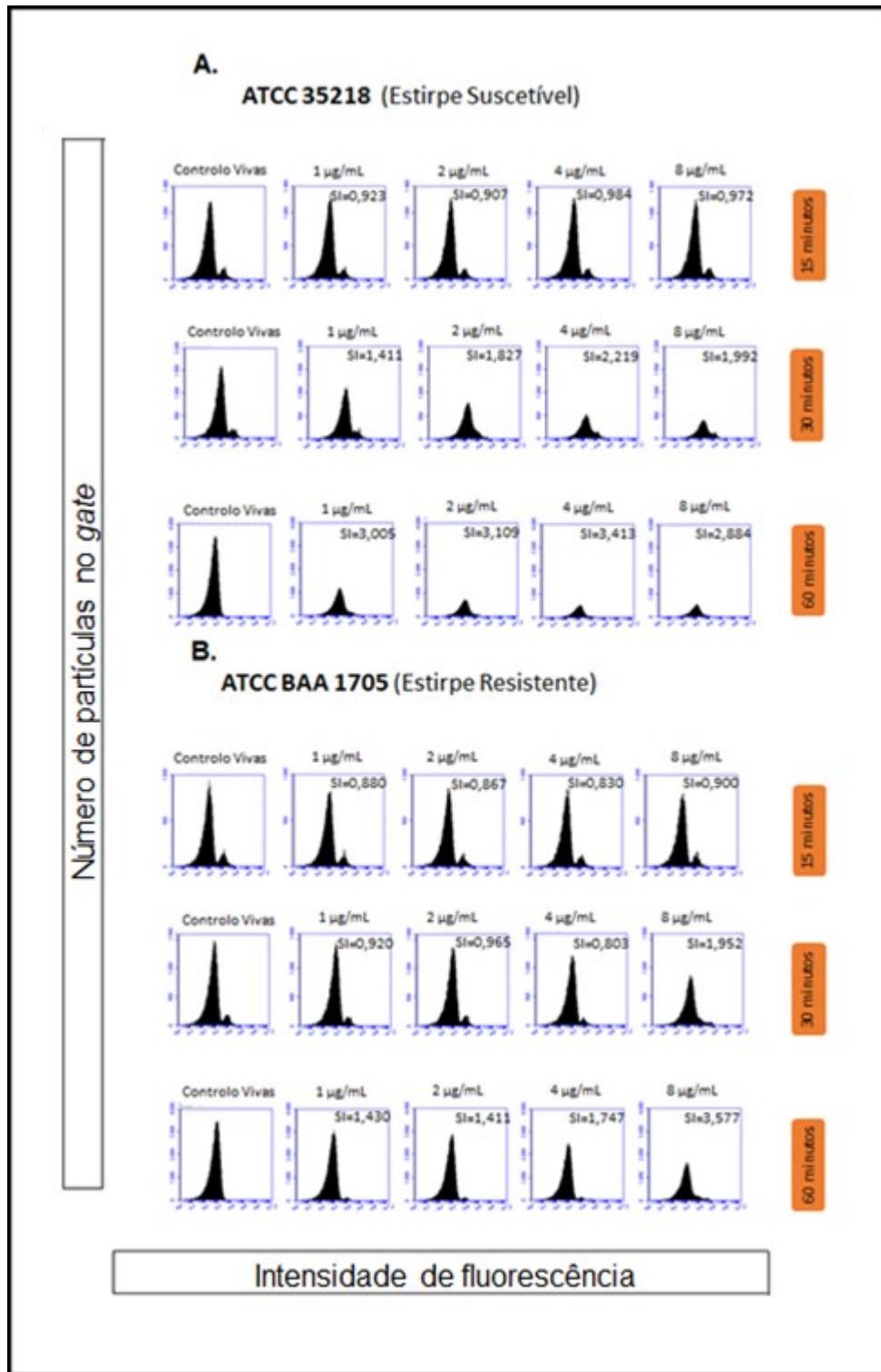
As diferenças na distribuição da fluorescência são também visíveis através da análise dos histogramas representativos de uma estirpe suscetível (ATCC 35218) e de uma estirpe resistente (ATCC – BAA 1705).

Os histogramas referentes às estirpes tratadas com MRP e marcadas com LM, e incubadas nos diferentes tempos em estudo estão representados na **Figura 3.11.**



**Figura 3.11.** Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe (A) ATCC 35218 (estirpe suscetível) e pela estirpe (B) ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com meropenem nas concentrações de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de lesão de membrana.

Os histogramas das estirpes em estudo tratadas com IMI e marcadas com LM, e incubadas nos diferentes tempos em estudo encontram-se na **Figura 3.12.**



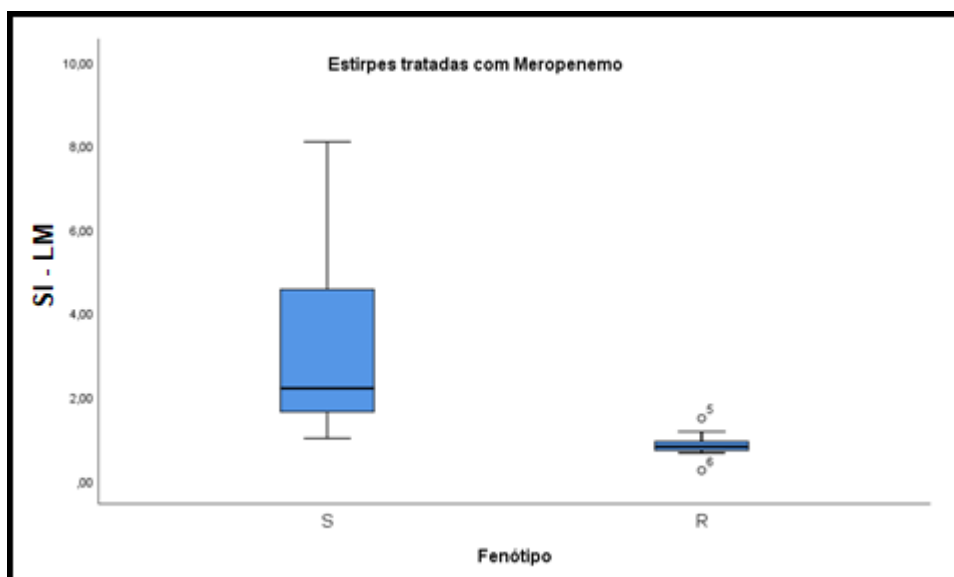
**Figura 3.12.** Distribuição de fluorescência apresentada pela estirpe (A) ATCC 35218 (estirpe suscetível e pela estirpe (B) ATCC BAA 1705 (estirpe resistente) tratadas com imipenemo nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 µg/mL e marcadas com marcador de lesão de membrana.

Através da análise dos histogramas da estirpe suscetível (**Figura 3.11. – A e Figura 3.12. – A**), verificou-se que o efeito dos carbapenemos, revelado pela marcação com LM, é mais evidenciado ao fim de 60' de incubação pelo aumento de fluorescência das células tratadas relativamente ao controlo. Pode ainda verificar-se uma diminuição da fluorescência para as concentrações mais elevadas de fármaco aos 60' de incubação (SI=3,413 para a concentração de 4µg/mL e SI=2,884 para a concentração de 8µg/mL).

A análise dos histogramas da estirpe resistente (**Figura 3.11. – B e Figura 3.12. – B**), mostrou que o efeito dos carbapenemos, manteve-se relativamente constante ao longo do tempo, sem alterações de fluorescência das células tratadas relativamente ao controlo. Apenas foi detetada uma ligeira alteração de fluorescência ao fim de 60' de incubação na concentração mais elevada de IMI (SI=3,577).

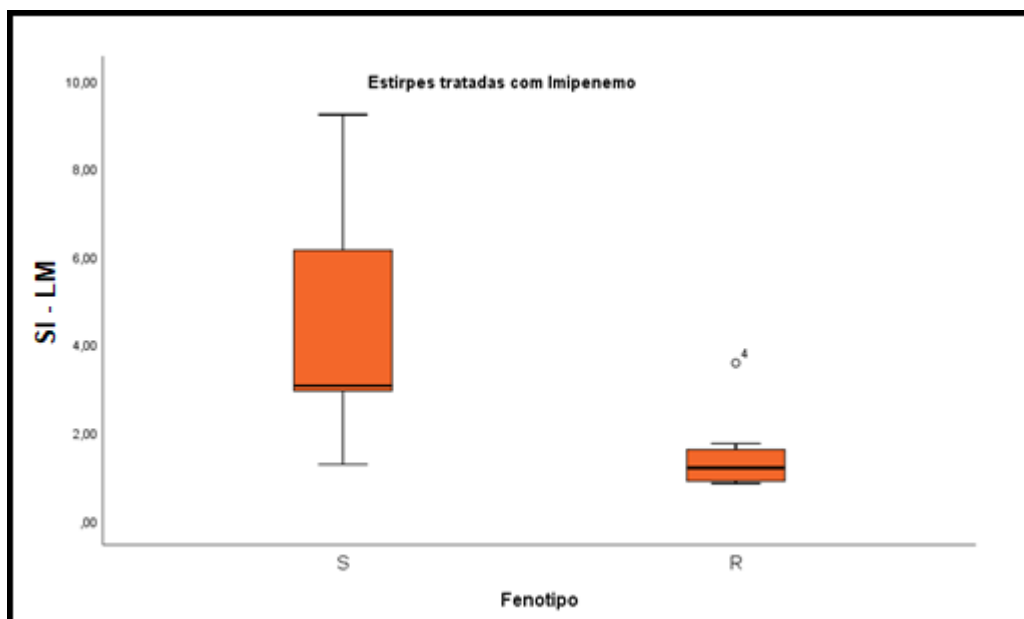
A distribuição de fluorescência apresentada pelas estirpes S e R, mostrou ser possível discriminar estes fenótipos ao fim de 30' de incubação. No entanto, após 60' de incubação as diferenças apresentadas na distribuição de fluorescência foram mais discriminatórias (**Figura 3.11. e 3.12.**).

Após 60' de incubação detetaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os SI da marcação com LM apresentados pelas estirpes S e R tratadas com meropenemo bem como para as estirpes que foram tratadas com imipenemo ( $p < 0,001$  e  $p = 0.016$ , respetivamente), sendo possível uma discriminação clara entre os fenótipos suscetível e resistente (**Figura 3.13. e 3.14.**, respetivamente).



**Figura 3.13.** Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com meropenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana durante 60 min.



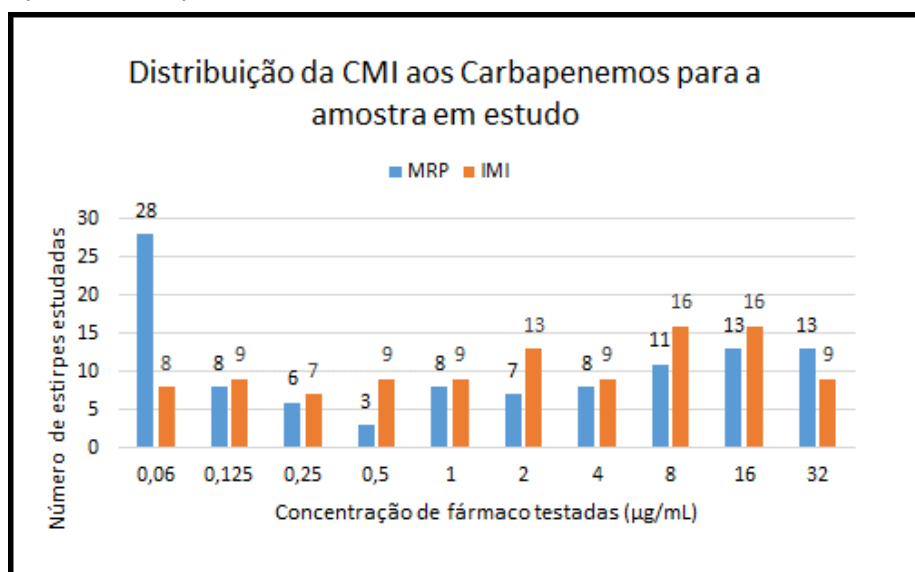


**Figura 3.14.** Boxplot representativo da distribuição de fluorescência, expressa pelo índice de fluorescência (SI), para as estirpes suscetíveis e resistentes tratadas com imipenemo e marcadas com marcador de lesão de membrana durante 60 min.

### 3.2 Prova de Conceito

#### 3.2.1. Caracterização da Amostra em Estudo

A distribuição da CMI aos carbapenemos da amostra em estudo encontra-se representada na **figura 3.15.**, a distribuição fenotípica avaliada através dos *break-points* estabelecidos por cada um dos protocolos EUCAST e CLSI encontra-se na **tabela 2.1.** Com estes resultados é possível verificar que grande parte das estirpes bacterianas que compõe a amostra em estudo são determinadas como suscetíveis, apresentando por isso valores de CMI baixos.



**Figura 3.15.** Distribuição da concentração mínima inibitória aos carbapenemos da amostra em estudo.

**Tabela 2.1.** Distribuição fenotípica pormenorizada da amostra em estudo.

		MEROPENEMO						IMIPENEMO					
		Protocolo EUCAST			Protocolo CLSI			Protocolo EUCAST			Protocolo CLSI		
ID	N	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	36	27	0	9	27	0	9	25	3	8	21	4	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	6	0	8	6	0	8	5	2	7	4	1	9
<i>Escherichia coli</i>	11	10	0	1	10	0	1	10	0	1	9	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	3	3	0	0	3	0	0	3	0	0	1	2	0
<i>Serratia marcescens</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Morganella morganii</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Pseudomonadaceae</i> *	36	22	8	6	22	8	6	25	0	11	19	6	11
<i>Moraxellaceae</i>	33	11	0	22	11	0	22	11	0	22	11	0	22
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	31	9	0	22	9	0	22	9	0	22	9	0	22
<i>Acinetobacter schindleri</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<b>TOTAL:</b>	<b>105</b>	<b>70</b>	<b>8</b>	<b>37</b>	<b>70</b>	<b>8</b>	<b>37</b>	<b>61</b>	<b>3</b>	<b>41</b>	<b>51</b>	<b>10</b>	<b>44</b>

\* Todas as estirpes bacterianas estudadas pertencentes à família *Pseudomonadaceae* referem-se à espécie: *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.2.2. Estabilidade dos Antimicrobianos

Do estudo da estabilidade dos antimicrobianos MRP e IMI observou-se que para uma temperatura de armazenamento de -80°C existiu uma concordância de 100% entre os valores de CMI para a estirpes testadas ao longo dos 90 dias de avaliação (dados representados na **tabela 2.2.**).

**Tabela 2.2.** Coeficiente de concordância entre os valores de concentração mínima inibitória avaliados ao longo do tempo para a condição de armazenamento a uma temperatura de -80°C.

	Temperatura de congelação -80°				
	8 Dias	15 Dias	30 Dias	60 Dias	90 Dias
<b>MRP</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>IMI</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Relativamente à temperatura de armazenamento de -20°C, no caso do MRP, verificou-se que ao final dos 15 dias de avaliação o coeficiente de concordância dos valores de CMI foi de 83%; a concordância entre os valores de CMI continuou a decrescer, mantendo-se 68% durante os 30 e 60 dias de avaliação. No último momento de avaliação, aos 90 dias, o valor da coeficiente de concordância já apresentava uma taxa de 61% relativamente aos dados de CMI do MRP determinados do no dia 1, dados apresentados na **tabela 2.3.**

O estudo da estabilidade do IMI à temperatura de armazenamento de -20°C, demonstrou uma concordância entre os valores de CMI de 100% até aos 15 dias de avaliação. Aos 30 dias de avaliação ocorreu uma diminuição no coeficiente de concordância ficando em 23%. Ao fim de 60 dias de avaliação o coeficiente de concordância era de apenas 10%; por último, após 90 dias de avaliação o coeficiente de concordância de entre os valores de CMI ao longo do tempo de avaliação revelou-se de 0%, dados apresentados na **tabela 2.3.**

**Tabela 2.3.** Coeficiente de concordância entre os valores de concentração mínima inibitória avaliados ao longo do tempo para a condição de armazenamento a uma temperatura de -20°C.

	Temperatura de congelação -20°				
	8 Dias	15 Dias	30 Dias	60 Dias	90 Dias
MRP	1.00	0.83	0.68	0.68	0.61
IMI	1.00	1.00	0.23	0.10	0.00

Por fim, para a condição de armazenamento à temperatura ambiente após um processo de liofilização, a concordância entre os valores de CMI ao longo do tempo de avaliação para o MRP foi de 30% durante os primeiros dois pontos de avaliação, 8 e 15 dias. Ao final de 30 dias de avaliação a diminuição da concordância entre os valores levou a que apenas existisse um coeficiente de concordância de 10%, sendo que ao final de 60 dias a concordância entre os valores já se encontrava nos 0%, dados apresentados na **tabela 2.4.**

Para a mesma condição, a concordância entre os valores de CMI para o IMI ao longo do tempo de avaliação registou uma concordância de 19% ao final de 8 dias de avaliação, diminuindo para 5% ao final de 15 dias de avaliação e mantendo-se neste valor até aos 30 dias de avaliação. Ao final de 60 dias de avaliação a concordância entre os valores de CMI avaliados foi de 0%, dados apresentados na **tabela 2.4.**

**Tabela 2.4.** Coeficiente de concordância entre os valores de concentração mínima inibitória avaliados ao longo do tempo para a condição de armazenamento a uma temperatura ambiente após processo de liofilização.

	Temperatura ambiente após Processo de Liofilização				
	8 Dias	15 Dias	30 Dias	60 Dias	90 Dias
MRP	0.30	0.30	0.10	0.00	0.00
IMI	0.19	0.05	0.05	0.00	0.00

### 3.2.3. Correlação entre os Valores de Concentração Mínima Inibitória e os Valores de Concentração Mínima Fluorescente

Na **tabela 2.5** encontram-se descritos os valores de corte para as concentrações testadas (1, 2, 4 e 8 µg/mL) de MRP e IMI, determinados pela aplicação dos modelos lineares generalizados, assim como os respetivos intervalos de confiança a 95%. Com base na classificação dos valores de SI obtidos para cada concentração testada, foi possível determinar a CMF para cada estirpe bacteriana e fazer a sua associação com a CMI previamente determinada.

**Tabela 2.5.** Associação entre os valores de concentração mínima inibitória e os valores de concentração mínima fluorescente.

CMI (µg/mL)	CMF (SI)	Intervalo de confiança (95%)	PC (%)
MRP <sub>≤1</sub>	≥16.40	[9.29:23.50]	<b>93.06</b>
MRP2	≥3.39	[-20.52:27.30]	
MRP4	≥1.44	[-15.47:18.35]	
MRP8	≥1.17	[-6.80:9.14]	
IMI <sub>≤1</sub>	≥8.28	[5.43:11.13]	<b>96.70</b>
IMI2	≥3.45	[-1.93:8.83]	
IMI4	≥2.93	[-4.19:10.05]	
IMI8	≥2.06	[-1.62:5.73]	

Por exemplo, uma estirpe com uma CMI de 1 µg/mL ao MRP, apresenta para esta mesma concentração um valor de SI superior ou igual a 16.40, o que indica que apresenta uma CMF ≤1; por sua vez, uma estirpe com uma CMI de 4 µg/mL ao MRP apresenta valores de SI inferiores a 16.40 e 3.39 para as concentrações de MRP 1 e MRP2, respectivamente, e um valor de SI ≥ a 1.44 para a concentração de MRP 4 µg/mL, sugerindo ter uma CMF de 4, exemplificação **tabela 2.6**.. No caso do meropenemo a proporção de concordância (PC) estabelecida entre os valores de CMI e CMF foi de 93.06%.

**Tabela 2.6.** Exemplo da associação entre os valores de concentração mínima inibitória ao meropenemo e os valores de concentração mínima fluorescente.

ID	Espécie	SI				MIC	CFM
		MRP1	MRP2	MRP4	MRP8		
EB164	<i>E. coli</i>	27,69	39,36	38,09	33,35	1	≤1
PS028	<i>P. aeruginosa</i>	5,82	8,38	11,36	8,8	2	2
PS088	<i>P. aeruginosa</i>	1,73	2,3	2,66	2,61	4	4
EB169	<i>E. coli</i>	0,57	0,6	0,59	1,71	8	≥8

Relativamente a uma estirpe com uma CMI de 2 µg/mL ao IMI, apresenta para esta mesma concentração um valor de SI superior ou igual a 3.45, o que indica que apresenta uma CMF=2; por sua vez, uma estirpe com uma CMI de 8 µg/mL ao IMI apresenta valores de SI inferiores a 8.28, 3.45 e 2.93 para as concentrações de IMI 1, IMI 2 e IMI 4, respectivamente, e um valor de SI ≥ a 2.06 para a concentração de IMI 8 µg/mL, sugerindo ter uma CMF de 8, exemplificação **tabela 2.7**.. No caso do imipenemo, a PC foi de 96.70%.

**Tabela 2.7.** Exemplo da associação entre os valores de concentração mínima inibitória ao imipenemo e os valores de concentração mínima fluorescente.

ID	Espécie	SI				MIC	CFM
		IMI1	IMI2	IMI4	IMI8		
AC005	<i>A.baumannii</i>	35,9	44,62	152,44	194,65	1	≤1
PS086	<i>P. aeruginosa</i>	2,45	6,02	26,03	25,61	2	2
EB031	<i>M. morganii</i>	2,05	1,82	112,54	148	4	4
EB009	<i>K. pneumoniae</i>	1,33	1,49	2,88	7,63	8	≥8

## 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que foi possível determinar a suscetibilidade aos carbapenemos, nomeadamente meropenemo e imipenemo, por citometria de fluxo em tempo útil.

Dado o tamanho e a complexidade das bactérias de Gram negativo serem semelhantes entre si, o gate determinado inicialmente foi aplicado a todas as bactérias em estudo.

A análise do número de células no interior do gate ao longo dos diferentes tempos de incubação foi um dos parâmetros estudados que permitiu explicar alguns fenómenos de fluorescência ocorridos para as concentrações de antimicrobiano mais elevadas. Para as concentrações de fármaco mais elevadas frequentemente nos deparamos com uma diminuição da fluorescência, justificada pela elevada atividade antimicrobiana com perda de fluorescência das células que ainda se mantêm no gate; paralelamente observa-se uma drástica redução de células na região de análise.

Foram estudados dois marcadores fluorescentes, que assinalam dois parâmetros fundamentais para a viabilidade celular e já amplamente estudados na literatura. O marcador PM apesar de não determinar a morte celular por si só, uma vez que a despolarização da membrana não indica diretamente morte celular, antecipa esta situação. Foi o marcador mais precoce, estando os resultados da cinética da marcação de acordo com o mecanismo de ação do antibiótico, apresentando boa discriminação entre as estirpes S e R quer relativamente ao IMI quer ao MRP.

Já o marcador de LM, durante uma curta exposição ao fármaco é mais indicado para o estudo de fármacos que produzem lesão primária da membrana como mecanismo de lesão primária, uma vez que se trata de um marcador de morte celular, sendo por isso mais tardio.

A escolha do marcador fluorescente recaiu assim sobre o PM

Relativamente ao tempo de incubação, embora aos 30' já fosse possível a discriminação de fenótipos devido à distribuição de fluorescência, esta revelou-se ainda mais discriminatória e ao mesmo tempo mais estável ao fim dos 60' de incubação. Por essa razão, determinou-se os 60' como o tempo de incubação mais adequado.

A estabilidade dos fármacos foi avaliada por métodos microbiológicos, determinação da CMI de estirpes com valor conhecido. Revelando que quando os antibióticos são armazenados a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , as placas teste de IMI e MRP preservam a sua atividade até 90 dias, mantendo uma concordância entre os valores de CMI de 100; o coeficiente de concordância considera a existência de uma boa correlação de valor de CMI quando o valor é  $\geq 75$ <sup>34</sup>. Outros métodos, químicos poderiam ter sido utilizados para avaliar a estabilidade dos antimicrobianos, quantificando estes compostos como o método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ou ainda através da espectrometria de massa pela técnica de MALDI-TOF. Como não tínhamos acesso a estas metodologias, optamos pela determinação da CMI de bactérias de referência tal como é referido na ISO 20776-2<sup>35</sup>, salientando que esta metodologia é a única que avalia a atividade do fármaco e não só a sua concentração.

Todas as placas teste utilizadas durante o estudo apresentado, foram armazenadas a um temperatura de congelação a  $-80^{\circ}\text{C}$  e nunca utilizadas após completar 90 dias depois da sua produção.

A amostra de estirpes bacterianas em estudo, segue os padrões gerais de suscetibilidade descritos para o MRP e para o IMI. Devido ao maior espectro de afinidade por PBP apresentado pelo

MRP (PBP2 e PBP3) comparativamente ao IMI (PBP2), a atividade antibacteriana verificou-se maior no caso do MRP em comparação ao IMI<sup>36</sup>. De modo geral, o MRP é 2 a 16 vezes mais ativo do que o IMI contra bacilos de Gram negativo aeróbios<sup>36</sup>.

A detecção de bactérias no sangue através de hemocultura revela-se essencial nas situações de infecção mais críticas, estando associado a altas taxas de morbidade e mortalidade<sup>37</sup>. Assim é fundamental a informação da suscetibilidade bacteriana rápida de forma a orientar a terapia antimicrobiana.

No nosso estudo utilizamos hemoculturas positivas como ponto de partida para a avaliação da CMI aos carbapenemos, uma vez que quando as hemoculturas positivam as bactérias se encontram na sua fase exponencial o protocolo pode iniciar-se de imediato. Na fase de otimização foram utilizadas bactérias em meio líquido, sendo necessário um período de crescimento bacteriano para que se atingisse a fase exponencial, tal acontece uma vez que os antimicrobianos beta-lactâmicos atuam apenas quando a bactéria se encontra em fase exponencial<sup>22</sup>.

A maioria dos métodos existentes no mercado necessitam de uma subcultura de 24h para dar início ao teste de suscetibilidade. Os métodos automáticos como *Vitek 2* (BioMérieux) e *BD Phoenix Automated Microbiology* (BH Diagnosis) ou os métodos de difusão em agar não providenciam os valores de CMI mas sim o fenótipo (S, I ou R). O  $\epsilon$ -Test ou o *MicroScan WalkAway* (Siemens Healthcare Diagnosis) podem fornecer a CMI. Todos se baseiam na detecção da capacidade replicativa das bactérias em contacto com os antibióticos, pelo que é necessário 18-24h adicionais. Assim só cerca de 2 dias após a hemocultura positivar poderemos ter avaliação da suscetibilidade, qualitativo e/ou quantitativo.

Novos métodos estão a surgir de forma permitir a utilização direta das hemoculturas, como é o exemplo do *Accelerate Pheno*<sup>38</sup>, no entanto como o seu método é igualmente baseado na detecção da capacidade replicativa bacteriana, necessitando de 7h para fornecer o resultado (CMI e fenótipo).

A técnica da CF utilizada diretamente em hemoculturas positivas, mostrou a sua acuidade na determinação de CMI aos carbapenemos e respetivos perfis de suscetibilidade sem a necessidade de recorrer a sub-culturas bacterianas<sup>30</sup>. Foi possível atingir uma elevada proporção de concordância<sup>35</sup> entre o método de determinação de CMI aos carbapenemos por citometria de fluxo e o método clássico (93.06% para o MRP e de 96.70% para o IMI). Embora o método de determinação de CMI aos carbapenemos por citometria de fluxo tenha conseguido atingir a robustez ideal apenas para a concentração de 1 $\mu$ g/mL em ambos os fármacos, MRP e IMI, a sua porção de concordância é promissora. Um modelo mais robusto seria possível através da inclusão de maior quantidade de isolados clínicos com CMI aos carbapenemos elevadas, o que apesar das numerosas resistências emergentes ainda é raro de obter, tornando os intervalos de confiança mais estreitos que por sua vez originariam valor de corte mais específicos e sensíveis. Em suma, os resultados obtidos com a prova de conceito verificaram-se bastante positivos. A concentração mínima fluorescente, rapidamente determinada por citometria de fluxo apresenta uma alta concordância com a metodologia clássica na determinação de valores de CMI aos carbapenemos.

Através da CF é possível que em 2 horas a partir de hemoculturas positivas se determine o perfil de suscetibilidade aos vários antimicrobianos<sup>30</sup>. A utilização da técnica de CF foi já anteriormente

utilizada na determinação da CMI a fármacos como a Vancomicina e a Colistina<sup>30</sup>. Ao contrário da determinação do perfil de suscetibilidade que é realizado apenas através da análise aos break-points estabelecidos pelos protocolos EUCAS e CLSI, a determinação da CMI aos fármacos necessita de avaliar uma gama maior de concentrações para um determinado fármaco, o que torna esta determinação mais demorada se efetuada para todos os fármacos. A análise citométrica é bastante rápida mas só analisa uma placa de cada vez; assim se aumentarmos muito as concentrações a testar o equipamento fica mais tempo a analisar cada placa, limitando a capacidade de análise diária.

No entanto, esta técnica continua a revelar-se vantajosa na medida em o tempo de espera até ao resultado é inferior às 2 horas; aliado ao facto de ser possível utilizar diretamente da hemocultura para a determinação da CMI ao antimicrobiano em estudo.

Finalmente, de forma a evidenciar a extrema importância que o desenvolvimento deste tipo de protocolos tem na vida hospitalar, é relevante compreender que o valor da CMI é fundamental para que se monitorize o nível de resistência aos antibióticos, contribuindo para fomentar uma supervigilância epidemiológica.

Para as bactérias de Gram positivo existem antimicrobianos alternativos aos carbapenemos como os glicopeptídeos como a Vancomicina, a Daptomicina e o Linezolid. Já as resistências aos carbapenemos por estirpes de bacilos de Gram negativo encontram-se dramaticamente limitadas em relação às opções de tratamento<sup>39</sup>.

Por estas mesmas razões, o grupo de bactérias abordado ao longo deste estudo foram as bactérias de Gram negativo, nomeadamente as famílias das *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Moraxellaceae*.



## 5. CONCLUSÕES GERAIS

No caso concreto dos Carbapenemos, o conhecimento da CMI é fundamental para que se monitorize o nível de resistência, contribuindo para fomentar uma supervigilância epidemiológica. Trata-se de um valor de extrema importância para o *screening* das carbapenemases. A partir da determinação da CMI aos carbapenemos é possível que de forma atempada se realizem os testes necessários para a determinação dos mecanismos de resistência e, quando necessário, se adote as medidas adequadas em relação ao doente, prevenindo a disseminação deste mecanismo de resistência.

O trabalho realizado apresenta uma nova metodologia para a determinação da CMI aos carbapenemos por citometria de fluxo em 2 horas diretamente de hemoculturas. Os resultados obtidos com a prova de conceito em comparação com os resultados obtidos pelo método clássico verificaram-se bastante promissores, apresentando proporções de concordância elevadas para os dois antimicrobianos, nomeadamente de 93.06% para o MRP e de 96.70% para o IMI. A concentração mínima fluorescente, rapidamente determinada por citometria de fluxo apresenta uma alta concordância com a metodologia clássica na determinação de valores de CMI aos carbapenemos.

Ao longo do desenvolvimento do trabalho foi possível retirar algumas conclusões que tiveram um papel preponderante para a elaboração desta nova metodologia, nomeadamente pode concluir-se; o corante fluorescente de marcação do potencial de membrana revelou ser um bom marcador fluorescente para o estudo da suscetibilidade aos carbapenemos por citometria de fluxo, melhor do que o marcador de lesão de membrana; um elevado poder discriminatório foi obtido entre estirpes suscetíveis e estirpes resistente após 1 hora de incubação.

Percebeu-se que o método mais eficaz para o armazenamento de placas teste de suscetibilidade aos carbapenemos preparados previamente, de forma a manter a sua atividade antibacteriana estável revelou ser a sua congelação a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , garantindo a sua preservação até, pelo menos, 90 dias.

Com este trabalho pretendeu-se criar a ideia de uma nova dinâmica nos laboratórios de microbiologia clínica, tornando possível a determinação de fenótipos de suscetibilidade em tempo útil, que permita aos clínicos instituir uma terapêutica antimicrobiana dirigida com menos falhas e poupando ao máximo os antimicrobianos. A rapidez na obtenção deste resultado permitirá não só o tratamento adequado assim como o isolamento do doente, se necessário, em tempo útil antes de se disseminar os mecanismos de resistência por outros doentes ou profissionais de saúde. Assim pensamos que esta nova metodologia permitirá um melhor tratamento dos doentes e um melhor controlo epidemiológico.

## **6. TRABALHO FUTURO**

Ao longo do desenvolvimento do trabalho experimental foram sendo abertos novos caminhos de investigação que com certeza levarão a novos resultados e alargarão perspectivas.

Mais investigação é necessária no sentido de tornar os fármacos mais estáveis possibilitando a sua liofilização/desidratação.

Em termos de trabalho futuro, é importante estudar a estabilidade dos fluorocromos assim como ocorreu para os antimicrobianos, através da técnica de fluorimetria. Este estudo possibilitará o armazenamento e conservação das placas teste, tornando mais viável a difusão no mercado deste teste.

A introdução de estirpes bacterianas com valor de CMI elevado aos carbapenemos é também um trabalho essencial, de forma a tornar este modelo robusto para todas as concentrações de fármacos testadas.

Por último, após todos os parâmetros otimizados, seria crucial a realização da prova de conceito deste método rápido de determinação da CMI aos carbapenemos numa unidade de saúde local, o que está a ser programado.



## Association between MIC values of carbapenems and a novel flow cytometric antimicrobial test (FAST): a multivariate analysis

28th ECCMID CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION

00744

Rita Teixeira-Santos<sup>1</sup>, Rosário Gomes<sup>2</sup>, Sofia Costa-de-Oliveira<sup>1,2</sup>, Inês Martins-Oliveira<sup>1</sup>, Ana Silva-Dias<sup>1</sup>, Acácio Gonçalves Rodrigues<sup>1,2</sup>, Cidália Pina-Vaz<sup>1,2</sup>

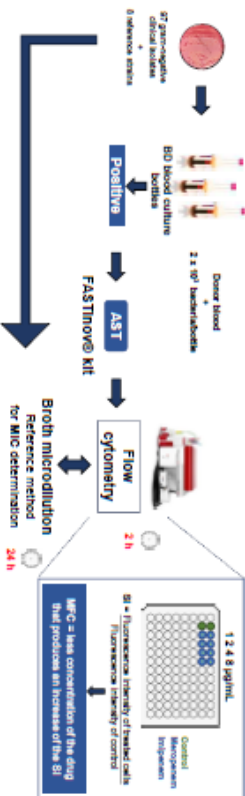
<sup>1</sup>FASTinov SA, Porto, Portugal; <sup>2</sup>Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal.

### INTRODUCTION

Carbapenems play a critical role in antibiotic ammanentarium. Nevertheless, the emergence of multidrug-resistant pathogens seriously threatens this class of lifesaving drugs. The determination of MIC values is considered an important step for both infection treatment and epidemiological management. This study evaluates a novel antimicrobial susceptibility testing protocol based on flow cytometry for MIC determination to carbapenems.

### METHODS

Ninety-seven Gram-negative clinical isolates and 8 recommended reference strains, including 36 Enterobacteriaceae, 36 *Pseudomonas aeruginosa*, and 33 *Acinetobacter* sp., with different susceptibility phenotypes to meropenem (MRP) and imipenem (IMI), were selected for this study, each strain was inoculated in a blood culture bottle (BD) and incubated until being flagged positive. Afterwards, FASTinov<sup>®</sup> kit was inoculated, incubated during 1h at 37°C, and analyzed in a flow cytometer.



For each drug concentration a staining index (SI) was calculated and the Minimal Fluorescent Concentrations (MFC: less concentration of the drug that produces an increase of the SI) was determined. The association between MIC values and flow cytometric data (MFC) was performed using a multivariate general linear model: the essential agreement (EA) was calculated.

### CONCLUSIONS

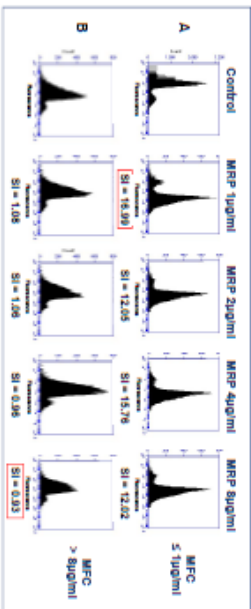
Flow cytometric Antimicrobial Test (FAST) revealed to be a good tool for evaluation of MRP and IMI effect with a high agreement (93.06 and 98.70%, respectively) with the MIC values determined by the reference method. Furthermore, this new protocol has the advantage of providing results in less 2 hours versus the 24 hours required by classic methodology.

### RESULTS

Statistical model estimated the cutoff values and the respective confidence interval for the evaluation of the MFC in concentrations ranging between 1 and 8 µg/ml (Table 1). The essential agreement (EA) between MFC and MIC was 93.06% and 98.70% for MRP and IMI, respectively.

Table 1 - Association between MIC and MFC values: MRP-meropenem, IMI-imipenem

MIC µg/ml	MFC (SI)	95%Confidence Interval	EA (%)
MRP=1	1 (216,85)	[9,55;24,14]	
MRP2	2 (23,39)	[-20,81;27,59]	93,06
MRP4	4 (21,52)	[-17,22;20,26]	
MRP8	8 (21,17)	[-6,50;9,24]	
IMI=1	1 (28,28)	[5,43;11,13]	
IMI2	2 (23,45)	[-1,93;8,83]	98,70
IMI4	4 (22,93)	[-4,11;0,05]	
IMI8	8 (22,06)	[-1,52;5,73]	



Data analysis showed a significant association between MIC of MRP and IMI and MFC value ( $p=0,022$  and  $p=0,001$ , respectively) and a high essential agreement.



28th ECCMID CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. World Health Organization, France, 256.
2. Alonso A, Sanchez P, Martinez J. Environmental Selection of Antibiotic Resistance Genes. Minireview. Environmental Microbiology. 2001;3(1):1-9.
3. B. Levy S. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002;49(1):25-30.
4. Antibiotic / Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. Cdc.gov. 2018 [cited 15 April 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/>
5. EU Action on Antimicrobial Resistance - Health and Food Safety - European Commission [Internet]. Health and Food Safety. 2018 [cited 15 April 2018]. Disponível em: [https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance\\_en](https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en)
6. Zhanel G, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban D et al. Comparative Review of the Carbapenems. Drugs. 2007;67(7):1027-1052.
7. Carbapenem Resistance: Overview of the Problem and Future Perspectives. Therapeutic Advances in Infectious Disease. 2015;3(1):15-21.
8. Zhanel G, Johanson C, Embil J, Noreddin A, Gin A, Vercaigne L et al. Ertapenem: Review of a New Carbapenem. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2005;3(1):23-39.
9. Kenneth R. J., Ray G. C. 2004. An Introduction of Infections Disease, 4ªed. McGraw-Hill, New York, 997.
10. M. Papp-wallace K, Endimiani A, A. Taracila M, A. Bonomo R. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011;55(11):4943-4960.
11. Edwards S, Emmas C, Campbell H. Systematic Review Comparing Meropenem with Imipenem Plus Cilastatin in the Treatment of Severe Infections. Current Medical Research and Opinion. 2005;21(5):785-794.
12. Lallemand E, Lacroix M, Toutain P, Boullier S, Ferran A, Bousquet-Melou A. In vitro Degradation of Antimicrobials During Use of Broth Microdilution Method Can Increase the Measured Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations. Frontiers in Microbiology. 2016;7.
13. Hwang J, Piccinni T, Lammel C, Hadley W, Brooks G. Effect of Storage Temperature and pH on the Stability of Antimicrobial Agents in MIC Trays. Journal of Clinical Microbiology. 1986;5(23):959-961.
14. Wright G. Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification. Advanced Drug Delivery Reviews. 2005;57(10):1451-1470.
15. Dzidic S, Suskovic J, Kos B. Antibiotic Resistance Mechanism in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Antibiotic Resistance in Bacteria, Food Technology. Biotechnol. 2008;46(1): 11-21.
16. Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2014 [Internet]. Lisboa: DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE; 2014 [cited 15 April 2018]. Disponível em: <http://www.dgs.pt>

17. Lambert P. Bacterial resistance to antibiotics: Modified Target Sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(10):1471-1485.
18. Poole K. Resistance to  $\beta$ -lactam Antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(17).
19. Kumar A, Schweizer H. Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(10):1486-1513.
20. Sun J, Huang S, Yang S, Pu S, Zhang C, Zhang L. Impact of Carbapenem Heteroresistance Among Clinical Isolates of Invasive *Escherichia coli* in Chongqing, Southwestern China. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(5):469.e1-469.e10.
21. EUCAST. EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017; 1-43.
22. Silva A, Faria-Ramos I, Ricardo E, Miranda I, Espinar M, Costa-de-Oliveira S et al. Rapid Flow Cytometry Test for Identification of Different Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(6):3824-3826.
23. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;54(3):969-976.
24. Fattouh R, Tijet N, McGeer A, M. Poutanen S, G. Melano R, N. Patel S. What Is the Appropriate Meropenem MIC for Screening of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Low-Prevalence Settings?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(3):1556-1559.
25. Hetero-Resistance: An Under-Recognised Confounder in Diagnosis and Therapy?. *Journal of Medical Microbiology*. 2001;50(12):1018-1020.
26. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis A, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(6):1055-1056.
27. Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(11):1749-1755.
28. Wang Y, Hammes F, De Roy K, Verstraete W, Boon N. Past, Present and Future Applications of Flow Cytometry in Aquatic Microbiology. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(8):416-424.
29. Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(2):167-195.
30. Pina-Vaz C., Costa-de-Oliveira S., Silva-Dias A., Silva A.P., Teixeira-Santos R., Rodrigues A.G. (2017) Flow Cytometry in Microbiology: The Reason and the Need. In: Robinson J., Cossarizza A. (eds) *Single Cell Analysis*. Series in BioEngineering. Springer, Singapore.
31. Clinical Laboratory Standards Institute (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – Twenty-eighth Edition*. Wayne, Pa: Clinical Laboratory Standards Institute, 296.
32. Léonard L, Bouarab Chibane L, Ouled Bouhedda B, Degraeve P, Oulahal N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7.

33. Puttaswamy S, Lee B, Sengupta S. Novel Electrical Method for Early Detection of Viable Bacteria in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(6):2286-2289.
34. Fleiss J., Levin B., Paik M. (2003) The Measurement of Interrater Agreement. In: *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition. Wiley, USA.
35. International Organization for Standardization, 2007. ISO 20776-2: Clinical Laboratory Testing and in Vitro Diagnostic Test Systems — Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices — Part 2: Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices.
36. Zhanel G, Simor A, Vercaigne L, Mandell L, the Canadian Carbapenem Discussion Group. Imipenem and Meropenem: Comparison of In Vitro Activity, Pharmacokinetics, Clinical Trials and Adverse Effects. *Canadian Journal of Infectious Diseases*. 1998;9(4):215-228.
37. Araujo M. Hemocultura: Recomendações de Coleta, Processamento e Interpretação dos Resultados. *J Infect Control*. 2012;1(1):08-19.
38. Marscham M, Bachmaier J, Autenrieth I, Oberhettinger P, Willmann M, Peter S. Evaluation of the Accelerate Pheno System for Fast Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures in Bloodstream Infections Caused by Gram-Negative Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55(7):2116-2126.
39. Meletis G. Carbapenem Resistance: Overview of the Problem and Future Perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2015;3(1):15-21.