

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Análise de testes comerciais para a avaliação da suscetibilidade às
polimixinas**

Luíza Peres de Castro

Porto Alegre, dezembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Análise de testes comerciais para a avaliação da suscetibilidade às
polimixinas**

Luíza Peres de Castro

Prof. Dr. Afonso Luís Barth
Orientador

Ma. Tanise Vendruscolo Dalmolin
Coorientadora

Porto alegre, dezembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Afonso Barth, e à minha coorientadora, Tanise Dalmolin, agradeço não apenas pelo grande auxílio na elaboração deste trabalho, mas também por se tornarem exemplos de intelectualidade, integridade e humildade para mim. Obrigado pelos grandes aprendizados.

À toda equipe do Laboratório de Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela disponibilidade e apoio. Sou grata pela troca de experiências, conhecimentos e amizade com cada um.

Às minhas colegas e amigas, Marina e Natália, que foram companhias fundamentais para tornar minha vida mais alegre. Obrigado não só pela ajuda e parceria nos trabalhos e provas em todos esses anos da graduação, mas também por permitir que construíssemos essa amizade.

Ao meu namorado e amigo, Fábio, pelo otimismo garantido dia-a-dia. Obrigado pela grande pró-atividade e pelas conversas que me motivaram com coragem e resiliência para alcançar meus objetivos.

Por fim, dedico enorme agradecimento aos meus pais, Marcos e Rita, e ao meu irmão, Daniel, que foram alicerces essenciais na minha caminhada iniciada em 2012. Obrigado por serem meus maiores exemplos de caráter e amor e por todo estímulo proporcionado em cada palavra, abraço e afago que foram fundamentais para minha calma, paciência e determinação. Todas as minhas vitórias dedico a vocês.

Este trabalho foi escrito segundo as normas da revista “Journal of Microbiological Methods”. Para melhor entendimento do artigo, este se apresenta a seguir na língua portuguesa.

1 **Análise de testes comerciais para a avaliação da suscetibilidade às**
2 **polimixinas**

3 Luíza Peres de Castro^{1,2}, Tanise Vendruscolo Dalmolin^{2,3}, Afonso Luís
4 Barth^{1,2,3*}

5

6 ¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
7 (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

8 ²Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS, Centro de
9 Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto
10 Alegre, RS, Brasil.

11 ³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade
12 Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

13 *Autor correspondente: Telefone: (+55) 51 3359-8607. E-mail:
14 albarth@hcpa.edu.br

15

16 RESUMO

17 As polimixinas (colistina e polimixina B) foram introduzidas na prática
18 clínica em 1947, porém foram retiradas na década de 1970 devido a sua
19 toxicidade. No início dos anos 2000 as polimixinas foram reintroduzidas na
20 medicina humana para o tratamento de infecções graves ocasionadas por
21 bacilos Gram-negativos multirresistentes. No entanto, a resistência bacteriana
22 às polimixinas vem aumentando mundialmente. Para avaliação *in vitro* da
23 resistência às polimixinas, o método de referência é a microdiluição em caldo o
24 qual é uma técnica laboriosa e necessita de insumos que são muitas vezes de
25 difícil aquisição devido, principalmente, ao custo. Assim, produtos comerciais
26 desenvolvidos para a avaliação da suscetibilidade às polimixinas de forma
27 menos laboriosa tem sido colocados no mercado. O Policimbac®,
28 recentemente desenvolvido, é um produto comercial que consiste em um painel
29 contendo poços com meio de cultura desidratado e Polimixina B liofilizada nos
30 quais o inóculo bacteriano é pipetado e após 24 horas de incubação
31 proporciona o valor da concentração inibitória mínima para o isolado testado.
32 Outro produto é o Ágar Superpolimixina, o qual é confeccionado com
33 substâncias inibitórias e permite o crescimento apenas de bactérias resistentes
34 às polimixinas. Neste estudo, avaliamos o desempenho de ambos os testes em
35 112 isolados, dois quais 51 eram resistentes às polimixinas e 61 eram
36 sensíveis. O teste Policimbac® apresentou uma sensibilidade de 98,0%,
37 especificidade de 77,0%, VPP de 78,1% e VPN de 97,9%. O Ágar
38 Superpolimixina® apresentou uma sensibilidade de 94,1%, especificidade de
39 75,4%, VPP de 76,2% e VPN de 93,9%. Com isso, ambos os métodos
40 poderiam ser utilizados como teste de triagem sendo que isolados bacterianos

41 detectados como sensíveis as polimixinas não precisariam ser testados
42 novamente o que diminuiria o trabalho no laboratório clínico. Cabe mencionar
43 que devido à baixa especificidade dos métodos, os resultados atribuídos como
44 resistentes de ambos os testes deveriam ser confirmados pelo método de
45 referência ou técnicas com melhor especificidade.

46 **Palavras-chaves: Polimixinas. Policimbac®. Ágar Superpolimixina®.**

47 1. INTRODUÇÃO

48 Dentre as principais causadoras de infecções nosocomiais estão as
49 bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* (Lutgring e Limbago,
50 2016) e também bactérias não fermentadoras como *Acinetobacter* spp. e
51 *Pseudomonas* spp. (Zavascki et al., 2007). Para o tratamento de infecções
52 graves causadas por essas bactérias, destaca-se o uso de antibióticos da
53 classe dos carbapenêmicos (Rahal, 2008), porém, com o crescente uso desses
54 antibióticos, a resistência a esta classe aumentou consideravelmente.

55 O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, do ponto
56 de vista clínico, microbiológico e de saúde pública, ocorre pela produção de
57 enzimas que hidrolisam esses antibióticos (carbapenemases). Os genes de
58 carbapenemases normalmente são encontrados em elementos genéticos
59 móveis (transposons, plasmídeos, entre outros) o que facilita sua disseminação
60 entre as bactérias. Até os anos de 1990 existiam poucos relatos de bactérias
61 produtoras de carbapenemases, porém, atualmente são frequentemente
62 encontradas em hospitais e instituições e saúde (Doi e Paterson, 2015). Com o
63 aumento de casos de bactérias Gram-negativas resistentes aos
64 carbapenêmicos (BRC), as opções de tratamento tornaram-se restritas e,
65 portanto, a classe de antibióticos polimixinas (polimixinas B e E) que haviam
66 sido retiradas da prática clínica devido a sua toxicidade, voltaram a ser
67 utilizadas em especial como recurso terapêutico para infecções causadas por
68 BRC (Falagas et al., 2005; Lee et al., 2009; Nordmann et al., 2016a).

69 A polimixina B e a polimixina E (também conhecida como colistina)
70 pertencem a um grupo de antibióticos polipeptídicos catiônicos que se ligam a
71 lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídios presentes na membrana celular

72 externa de modo que ocorra uma desestabilização pelo deslocamento de íons
73 de cálcio e magnésio ocasionando posterior morte celular bacteriana (Mendes
74 e Budmann, 2009). A interação eletrostática entre o antibiótico carregado
75 positivamente (polimixinas) e o LPS carregado negativamente é crucial para a
76 ação das polimixinas (Zavascki et al., 2007).

77 A resistência às polimixinas é um problema emergente, embora
78 a resistência intrínseca em algumas espécies Gram-negativas como *Proteus*
79 spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp. e *Burkholderia* spp. já
80 seja conhecida há algum tempo. Um dos principais mecanismos de resistência
81 adquirida das bactérias frente a esses antibióticos são mutações cromossômicas
82 que causam a diminuição da interação das polimixinas através de modificações
83 covalentes pela adição de fosfoetanolamina (PEtN) ou 4-amino-4-desoxi-L-
84 arabinose (L-Ara4N) à porção lipídica A do LPS bacteriano (Olaitan et al.,
85 2014). Mutações nos reguladores da transcrição, como PhoP-PhoQ e PmrA-
86 PmrB, que são responsáveis por controlar as modificações do LPS, também
87 ocasionam resistência às polimixinas (Giamarellou, 2016).

88 Em novembro de 2015, Liu e colaboradores descreveram, pela primeira
89 vez, a resistência adquirida às polimixinas mediada por gene de localização
90 plasmidial, denominado *mcr-1* (*mobile colistin resistance*). O gene *mcr-1* é
91 responsável por codificar uma fosfoetanolamina transferase que catalisa a
92 adição de pEtN ao lipídio A, diminuindo a afinidade das polimixinas ao LPS e
93 então ocasionando a resistência a estes antibióticos. Esse gene já possui
94 relatos em diversos continentes, inclusive no Brasil (Conceição-Neto et al.,
95 2017; Dalmolin et al., 2017; Liu et al., 2016).

96 Devido ao aumento de relatos de bactérias resistentes às polimixinas,
97 técnicas que possam auxiliar em uma detecção eficiente e confiável dessa
98 resistência são necessárias. A microdiluição em caldo (MDC) é o teste
99 referência para a avaliação da suscetibilidade de bactérias frente às
100 polimixinas, porém, é um procedimento manual, trabalhoso e que necessita de
101 insumos que são muitas vezes de difícil aquisição devido, principalmente, ao
102 custo (Poirel et al., 2017).

103 Técnicas mais simples como o teste de disco difusão e de gradiente de
104 difusão não apresentam uma boa reprodutibilidade em comparação à MDC
105 pela dificuldade do antibiótico difundir-se no ágar (Poirel et al., 2017). Assim,
106 produtos comerciais desenvolvidos para a avaliação da suscetibilidade às
107 polimixinas de forma menos laboriosa tem sido colocados no mercado. Um
108 desses produtos é o sistema de microdiluição Policimbac® (Policimbac® -
109 Probac do Brasil) o qual foi desenvolvido para determinar a concentração
110 inibitória mínima (CIM) de bacilos Gram-negativos frente à polimixina B em
111 painel comercial com o antibiótico liofilizado. Outro produto é o Ágar
112 Superpolimixina, o qual é um meio de cultura que foi desenvolvido para
113 detectar bactérias resistentes à colistina, impossibilitando, através do uso de
114 substâncias inibitórias, o crescimento de isolados sensíveis à mesma
115 (Nordmann et al., 2016b).

116 Devido a urgente necessidade de testes confiáveis na detecção da
117 resistência as polimixinas, este trabalho objetiva analisar o desempenho do
118 teste Policimbac® e do Ágar Superpolimixina® (Ágar Superpolimixina® - Plast
119 Labor) frente ao teste referência, microdiluição em caldo.

120 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

121 2.1 Amostras bacterianas

122 Foi utilizado um total de 112 isolados de origem humana e animal,
123 provenientes de um banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em
124 Resistência Bacteriana (LABRESIS), localizado no Centro de Pesquisa
125 Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, obtidos a partir de
126 estudos de vigilância no sul do Brasil entre os anos de 2013 a 2016.

127 2.2 Método de referência para avaliar suscetibilidade às polimixinas

128 A suscetibilidade às polimixinas foi determinada pelo método de
129 microdiluição em caldo Mueller Hinton cátion ajustado e interpretado de acordo
130 com as diretrizes do Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade
131 Antimicrobiana (EUCAST). Isolados que apresentaram CIM para colistina e/ou
132 polimixina B ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis e os isolados com CIM > 2
133 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes (EUCAST, 2017).

134 2.3 Teste Policimbac®

135 Policimbac® é um teste de microdiluição que consiste em um painel
136 com doze poços por amostra. Os poços de número um ao número dez
137 possuem Caldo Muller Hinton cátion ajustado desidratado com concentrações
138 decrescentes do antibiótico polimixina B liofilizado e os poços onze e doze são
139 destinados, respectivamente, para o controle positivo (apenas solução
140 bacteriana) e negativo do teste. Isolados bacterianos e a cepa controle
141 (*Escherichia coli* ATCC 25922), foram semeadas em ágar Mueller Hinton e
142 incubadas de 18 a 24 horas no dia anterior. No dia da execução do teste foram
143 separados três tubos de vidro estéreis para cada isolado. No tubo 1 foi
144 preparada uma suspensão bacteriana em cloreto de sódio (NaCl) 0,9% na
145 escala 0,5 MacFarland (10^8 UFC/mL). No tubo 2 foi feita uma diluição de 1:100

146 a partir do tubo 1, onde foi pipetado 50 µL da suspensão do tubo 1 e 4,950 mL
147 de NaCl 0,9%, resultando uma suspensão de 10⁶ UFC/mL. Por último, no tubo
148 3 foi feita uma diluição de 1:10 a partir do tubo 2, onde foi pipetado 500 µL da
149 suspensão do tubo 2 e 4,500 mL de NaCl 0,9% resultando uma suspensão de
150 10⁵ UFC/mL.

151 A partir da suspensão bacteriana do tubo 3, foi pipetado 100 µL nos
152 poços de número 11 à 1 do painel do teste Policimbac® que então foram
153 incubados por 24 horas em estufa aeróbia a 35° ± 2°C. Após o tempo de
154 incubação, para facilitar a leitura dos resultados, uma gota de solução
155 reveladora foi adicionada em todos os poços de cada painel que então foram
156 incubados por mais 20 minutos a 35° ± 2°C. As concentrações com
157 crescimento bacteriano ficaram com coloração avermelhada.

158 O valor da CIM de cada isolado foi determinada como o primeiro poço
159 no qual não houve crescimento bacteriano visível, sendo considerados
160 sensíveis os isolados que apresentaram CIM ≤2 µg/mL e resistentes os
161 isolados com CIM >2 µg/mL.

162 Amostras com resultados discrepantes entre o Teste Policimbac® e
163 MDC foram repetidas em mais uma oportunidade.

164 2.4 Ágar Superpolimixina®

165 O Ágar Superpolimixina® consiste em placas descartáveis estéreis, de
166 90x15mm, baseado no meio de cultura EMB (*Eosin Methylene Blue*), o qual
167 inibe o crescimento de bactérias Gram positivas. O Ágar Superpolimixina®
168 contém 10 µg/mL de daptomicina, para evitar o crescimento de *Streptococcus*
169 sp. e *Staphylococcus* sp., 5 µg/mL de anfotericina B para evitar o crescimento

170 fúngico e 3,5 µg/mL de sulfato de colistina, para evitar o crescimento de
171 bactérias sensíveis às polimixinas.

172 Para semear os isolados no Ágar Superpolimixina® foi utilizada 10 µL
173 de cada suspensão bacteriana na concentração de 10⁸ UFC/mL, feita no tubo 1
174 para o Teste Policimbac®, resultando em uma concentração de 10⁶ UFC/mL,
175 que com auxílio de uma alça bacteriológica estéril de plástico foi espalhada na
176 superfície da placa contendo o Ágar Superpolimixina®. Para controle de
177 qualidade do meio, foi utilizada *E. coli* ATCC 25922. Após semear os isolados,
178 as placas foram incubadas por 24 horas em estufa aeróbia a 35° ± 2°C. Os
179 isolados foram classificados como sensíveis quando não apresentaram
180 crescimento no meio de cultura, e resistentes, quando apresentaram
181 crescimento no meio de cultura. Isolados com resultados discrepantes entre a
182 MDC e Ágar Superpolimixina® foram repetidos em mais uma oportunidade,
183 onde foi semeado 10 µL do tubo nº 3 do Policimbac®, que apresentava
184 concentração de 10⁵ UFC/mL, resultando em uma concentração de 10³
185 UFC/mL.

186 **3. RESULTADOS**

187 *3.1 Teste referência - MDC*

188 Dentre os 112 isolados selecionados para avaliação dos testes, 51 isolados
189 foram considerados resistentes às polimixinas (CIM entre 4 e >64 µg/mL) e 61
190 isolados foram sensíveis (CIM entre ≤0,125 e 2 µg/mL) conforme o método de
191 referência MDC.

192 Entre os isolados resistentes, 9 eram de espécies que apresentam
193 resistência intrínseca às polimixinas: *Serratia marcescens* (n=6), *Morganella*
194 *morganii* (n=2) e *Providencia rettgeri* (n=1); 39 isolados pertenciam à família

195 *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae* (n=31), *Enterobacter aerogenes*
196 (n=4), *Enterobacter cloacae complex* (n=3) e *E. coli* (n=1), 2 eram do gênero
197 *Acinetobacter* sp. e 1 da espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

198 Entre os isolados sensíveis, 41 pertenciam à família *Enterobacteriaceae*, *K.*
199 *pneumoniae* (n=17), *E. cloacae complex* (n=10), *E. coli* (n=8), *Citrobacter*
200 *freundii* (n=3), *K. oxytoca* (n=2) e *E. aerogenes* (n=1), 15 eram do gênero
201 *Acinetobacter* sp. e 5 eram da espécie *P. aeruginosa*.

202 3.2 Teste Policimbac®

203 Todos resultados dos isolados considerados resistentes às polimixinas
204 (n=51) pelo método MDC mostraram-se concordantes com o teste
205 Policimbac®, com exceção para um isolado de *Acinetobacter* sp. o qual
206 apresentou CIM de 4 µg/mL segundo o método de MDC e CIM ≤0,125 µg/mL
207 no teste Policimbac®. Esse resultado foi considerado falso sensível para o
208 teste Policimbac®.

209 Dentre os isolados sensíveis às polimixinas (n=61 isolados), 47
210 apresentaram resultado concordante com entre Policimbac® e o método de
211 MDC. Um total de 14 isolados (11 *K. pneumoniae* e 3 *E. cloacae complex*), que
212 apresentaram CIM entre ≤0,125 µg/mL e 2 µg/mL segundo a MDC,
213 apresentaram resultados falsos resistentes no teste Policimbac®, apresentando
214 CIM entre 4 e >64 µg/mL.

215 A sensibilidade, a especificidade, o Valor Preditivo Positivo (VPP) e o
216 Valor Preditivo Negativo (VPN) do teste Policimbac® foram de 98,0%, 77,0%,
217 78,1 % e 97,9% respectivamente.

218 Em todas as ocasiões em que o Teste Policimbac® foi realizado, a
 219 cepa *E. coli* ATCC 25922 foi submetida ao teste de desempenho e as CIMs
 220 estiveram dentro do intervalo esperado de 0,25 a 2 µg/mL.

221 A figura 1 mostra a correlação dos valores de CIMs entre o método de
 222 referência (MDC) e o teste Policimbac®.

Figura 1. Correlação dos valores de CIM de Polimixinas entre o método de referência (MDC) e o Teste Policimbac®.

		CIM (µg/mL) por microdiluição em caldo											
		≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
CIM (µg/mL) pelo Teste Policimbac®	≤0,125	2 ^a					1 ^b						
	0,25	4 ^c		2									
	0,5	5	5	1									
	1	5	3	2	1	2							
	2	6	5	1	2	1							
	4		5				1	1					
	8			3	1	1			1	1			
	16	1		2			2	1	1		1		
	32								2				
	64									2		1	
	>64					1	1	1	5	9	11	9	

^a CIM idêntica com a CIM do teste referência estão destacadas em verde.

^b Os números em vermelho demonstram os resultados que apresentaram discordância na classificação de resistente/sensível.

^c Os números em preto demonstram os resultados que apesar de não ser exatamente iguais (mesmo valor de CIM), não apresentam discordância na classificação de resistente/sensível, segundo pontos de corte do EUCAST.

223 3.3 Ágar Superpolimixina®

224 Os mesmos isolados avaliados no Teste Policimbac®, também foram
 225 avaliados no Ágar Superpolimixina®. Dentre as amostras com perfil de
 226 resistência conforme a MDC (51 isolados), dois isolados de *K. pneumoniae* e
 227 um isolado de *Acinetobacter* sp., que apresentaram respectivamente CIM de 16
 228 µg/mL, 8 µg/mL e 4 µg/mL, não cresceram no Ágar Superpolimixina®, sendo

229 erroneamente interpretado como sensíveis e considerados falsos sensíveis.
230 Cabe mencionar que o isolado de *Acinetobacter* sp. também foi falso sensível
231 no Teste Policimbac®.

232 Entre os isolados sensíveis às polimixinas na MDC (61 isolados), 10
233 isolados de *K. pneumoniae*, 4 de *Acinetobacter* sp. e 1 de *E. aerogenes* que
234 apresentaram CIM entre $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$, cresceram no meio, e com
235 isso foram considerados falsos resistentes. Destes falsos resistentes, 8
236 isolados de *K. pneumoniae* também foram considerados falsos resistentes no
237 teste Policimbac®.

238 Em todos os dias em que os isolados foram testados, foi utilizada como
239 controle negativo do meio a cepa de *E. coli* ATCC 25922, que não apresentou
240 crescimento no Ágar Superpolimixina® em nenhum dia. Assim, na avaliação do
241 Ágar Superpolimixina® foram obtidos os seguintes percentuais de
242 sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 94,1%, 75,4%, 76,2 e 93,9%,
243 respectivamente.

244 **4. DISCUSSÃO**

245 As polimixinas são consideradas as últimas opções de tratamento de
246 infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes,
247 principalmente por ERC (Kaye et al., 2016). O método de referência para
248 avaliar a suscetibilidade de isolados bacterianos frente às polimixinas é a
249 técnica de microdiluição em caldo, porém além de ser uma técnica laboriosa,
250 ela requer insumos de difícil aquisição pelos laboratórios clínicos (Humphries,
251 2015).

252 Testes alternativos, como o Policimbac®, apesar de fornecer
253 resultados após 24 horas como a MDC, é considerado um teste menos

254 laborioso de ser realizado, visto que as diluições seriadas do antibiótico
255 Polimixina B se apresentam prontas, liofilizadas no painel. Além disso, a
256 visualização dos poços nos quais ocorre crescimento bacteriano é facilitada,
257 devido ao uso da solução reveladora.

258 Na literatura não há trabalhos sobre o desempenho do teste
259 Policimbac®. Em nosso estudo, obtivemos uma sensibilidade de 98,0% e
260 especificidade de 77,0% para este teste. Dentre os isolados resistentes
261 segundo a MDC, apenas um mostrou perfil de sensibilidade no teste
262 Policimbac®, com isso a maior discrepância de resultados foi entre os 14
263 isolados sensíveis, de acordo com MDC, que apresentaram resistência no teste
264 comercial avaliado.

265 O menor valor de especificidade, comparado à sensibilidade, para o
266 teste Policimbac® pode ser devido à capacidade de aderência das polimixinas
267 a placas de microtitulação, o que se deve a característica catiônica das
268 polimixinas que interagem com as cargas negativas da placa de poliestireno
269 (Poirel et al., 2017). Essa ligação pode contribuir para a diminuição da
270 concentração do antibiótico, causando resultados falsamente resistentes. As
271 placas usadas para o método de referência também são de poliestireno, porém
272 para a MDC o tempo de permanência do antibiótico nas placas é menos
273 extenso (em torno de 24 horas) em comparação às placas do Policimbac®
274 visto que estas haviam sido fabricadas em torno de 1-2 meses antes da
275 realização do teste.

276 Também é válido ressaltar que no momento em que a suspensão
277 bacteriana é adicionada nos poços do teste Policimbac® não é feita nenhuma
278 homogeneização com o antibiótico liofilizado presente na placa. Com isso,

279 estimamos que, caso o antibiótico não seja totalmente ressuspendido, a
280 concentração necessária em cada poço não será a esperada, podendo gerar
281 resultados falsos resistentes como os descritos.

282 Outra variável importante que deve ser considerada é o
283 armazenamento das placas de Policimbac®, as quais devem ser conservadas
284 em temperatura entre 2 e 8°C. Situações que não ocorra o correto
285 armazenamento e transporte desse teste poderá ocorrer o risco de degradação
286 do antibiótico, diminuindo sua concentração em cada poço.

287 Testes que avaliam o desempenho de outras metodologias em
288 substituição do teste referência foram realizados. Em um recente trabalho
289 desenvolvido por Matuschek e colaboradores foi avaliada a suscetibilidade de
290 75 isolados, comparando-se 3 métodos de microdiluição comerciais, SEMPA1
291 (Custom Sensitre plate, Thermo Scientific), MICRONAUT-S e MICRONAUT
292 MIC-Strip (Merlin Diagnostika) com o teste de referência. Os testes SEMPA1,
293 MICRONAUT-S e MICRONAUT MIC-Strip, apresentaram 4, 6 e 5 resultados
294 falsos resistentes, respectivamente. O teste SEMPA1 não apresentou nenhum
295 resultado falso sensível, enquanto os testes MICRONAUT-S e MICRONAUT
296 MIC-Strip apresentaram 2 resultados falsos sensíveis. Através destes
297 resultados pode-se observar que a principal discordância de resultados desses
298 testes foi para isolados que são sensíveis pelo método de referência, e se
299 apresentaram como resistentes nesses testes, da mesma maneira que foi
300 observado na avaliação do teste Policimbac®.

301 Meios de cultura seletivos oferecem uma alternativa prática para
302 detecção de organismos resistentes às polimixinas. O emprego do Ágar
303 Superpolimixina® na rotina laboratorial seria uma metodologia mais prática no

304 rastreio de bactérias resistentes às polimixinas, pois além de ser de fácil
305 execução, onde é necessária apenas a inoculação da suspensão bacteriana no
306 Ágar Superpolimixina®, a sua interpretação é simples, onde bactérias
307 resistentes às polimixinas crescem no meio e as sensíveis não são capazes de
308 crescer.

309 Na avaliação do ágar Superpolimixina® obtivemos 94,1% de
310 sensibilidade e 75,4% de especificidade. A maior discrepância de resultados
311 ocorreu entre 15 isolados que cresceram no Ágar Superpolimixina® e eram
312 consideradas sensíveis de acordo com o método de referência.

313 Os idealizadores do Ágar Superpolimixina avaliaram o meio frente a 88
314 isolados, onde 52 eram resistentes às polimixinas e 31 isolados sensíveis às
315 polimixinas, sendo a sensibilidade e a especificidade do teste de 100%. O
316 menor limite de detecção para isolados resistentes foi de 1×10^3 UCF/mL,
317 porém, a maior concentração capaz de evitar o crescimento de isolados
318 sensíveis foi de 1×10^6 UFC/mL (Nordmann et al., 2016b). Diferentemente de
319 Nordmann e colaboradores, que utilizaram diferentes concentrações de
320 inóculo, em nosso trabalho avaliamos a concentração final de 1×10^6 UFC/mL,
321 por facilitar o trabalho no laboratório, visto que há a inoculação direta de 10 μ L
322 da escala 0,5 de McFarland, a qual é facilmente realizada.

323 Um estudo que avaliou o Ágar Superpolimixinas comparando com o
324 meio LBJMR (Lucie Bardet-Jean-Marc Rolain) obteve 100% de sensibilidade
325 para ambos os testes e limite de detecção de 1×10^1 UFC/mL para isolados
326 resistentes à colistina da família *Enterobacteriaceae*. Para isolados Gram-
327 negativos não fermentadores resistentes à colistina, o meio LBJMR obteve uma
328 sensibilidade significativamente maior, pois foi capaz de detectar o crescimento

329 desses isolados em menores concentrações, comparado ao Ágar
330 Superpolimixina (Bardet et al., 2017).

331 Abdul Momim e colaboradores utilizaram a concentração final de 1×10^3
332 UFC/mL, sendo que isolados resistentes poderiam ser recuperados em uma
333 concentração de 1×10^1 UFC/ mL e isolados sensíveis em $>10^4$ UFC/ mL. Como
334 resultados, foi encontrado que o crescimento de isolados resistentes
335 apresentou apenas dois falsos sensíveis para um isolado de *A. baumannii* (CIM
336 de 8 $\mu\text{g/mL}$) e um isolado de *Stenotrophomonas maltophilia* (CIM 32 $\mu\text{g/ mL}$)
337 (Abdul Momin et al., 2017). Em nosso estudo, 3 isolados apresentaram
338 resultados falso sensíveis, dentre eles 1 isolado de *Acinetobacter* sp. É
339 possível especular que tal fato deve ser devido ao possível sinergismo da
340 colistina e daptomicina frente a esse gênero bacteriano (Phee et al., 2013).

341 Em nosso trabalho, na repetição do teste para os isolados com
342 resultados discrepantes, utilizamos a concentração final de 1×10^3 UFC/mL,
343 onde 11 isolados (3 de *P. aeruginosa*, 4 de *Acinetobacter* spp. e 4 da família
344 *Enterobacteriaceae*), que anteriormente foram consideradas resistentes de
345 acordo com o meio, após a diminuição do inóculo foram consideradas
346 sensíveis. Portanto, essa metodologia pode ser considerada inóculo
347 dependente, visto que a modificação da quantidade bacteriana inoculada pode
348 alterar o resultado.

349 **5. CONCLUSÃO**

350 Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível avaliar o
351 desempenho do Teste Policimbac® e do Ágar Superpolimixina®, em
352 comparação ao método de referência MDC, como métodos de auxílio na rotina
353 laboratorial para a detecção da suscetibilidade de isolados bacterianos às

354 polimixinas. Ambas as técnicas mostraram eficientes resultados para amostras
355 com perfil de resistência às polimixinas, contudo, para amostras sensíveis às
356 polimixinas os dois métodos avaliados não mostraram resultados satisfatórios
357 de especificidade e VPP. Com isso se faz necessária confirmação dos
358 resultados de resistência do Teste Policimbac® e do Ágar Superpolimixina®
359 pela técnica de referência, ou o aperfeiçoamento de ambas as técnicas para
360 proporcionar melhor especificidade.

361 **6. REFERÊNCIAS**

- 362 1. Abdul Momin, M.H.F., Bean, D.C., Hendriksen, R.S., Haenni, M., Phee,
363 L.M., Wareham, D.W., 2017. CHROMagar COL-APSE: a selective
364 bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-
365 resistant Gram-negative pathogens. *J. Med. Microbiol.* 66, 1554-1561.
- 366 2. Bardet, L., Le Page, S., Leangapichart, T., Rolain, J.M., 2017. LBJMR
367 medium: a new polyvalent culture medium for isolating and selecting
368 vancomycin and colistin-resistant bacteria. *BMC Microbiol.* 17, 1-10.
- 369 3. Conceição-Neto, O.C., Aires, C.A.M., Pereira, N.F., da Silva, L.H.J.,
370 Picão, R.C., Siqueira, B.N., Albano, R.M., Asensi, M.D., Carvalho-Assef,
371 A.P.D., 2017. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical
372 KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int. J. Antimicrob.*
373 *Agents* 50, 282-284.
- 374 4. Dalmolin, T.V., Castro, L., Mayer, F.Q., Zavascki, A.P., Martins, A.F.,
375 Lima-Morales, D., Barth, A.L., 2017. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla*_{KPC-2}
376 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J. Antim. Chem.* 72, 2404-
377 2406.

- 378 5. Doi, Y., Paterson, D.L., 2015. Carbapenemase-Producing
379 Enterobacteriaceae. *Respir. Crit. Care Med.* 36, 74-84.
- 380 6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).
381 Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters.
382 EUCAST 2017: Version 7.1.
- 383 7. Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D., 2005. Colistin: The
384 revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-
385 negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1333-1341.
- 386 8. Giamarellou, H., 2016. Epidemiology of infections caused by polymyxin-
387 resistant pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 614-621.
- 388 9. Humphries, R.M., 2015. Susceptibility testing of the polymyxins: where
389 are we now? *Pharmacotherapy* 35, 22–27.
- 390 10. Kaye, K.S., Pogue, J.M., Tran, T.B., Nation, R.L., Li, J., 2016. Agents of
391 last resort: polymyxin resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30, 391-
392 414.
- 393 11. Lee, J., Patel, G., Huprikar, S., Calfee, D.P., 2009. Decreased
394 susceptibility to Polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant
395 *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1611-1612.
- 396 12. Liu Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y.,
397 Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L.,
398 He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of
399 plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and
400 human beings in China: a microbiological and molecular biological study.
401 *Lancet Infect. Dis.* 16, 161-168.

- 402 13. Lutgring, J.D., Limbago, B.M., 2016. The problem of carbapenemase-
403 producing-carbapenem-resistant-*Enterobacteriaceae* detection. J. Clin.
404 Microbiol. 54, 529-534.
- 405 14. Matuschek, E., Ahman, J., Webster C., Kahlmeter, G., 2017. Evaluation
406 of five commercial MIC methods for colistin antimicrobial susceptibility
407 testing for Gram-negative bacteria. In: Abstracts of 27th European
408 Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. p. 161.
- 409 15. Mendes, C.A.C., Burdmann, E.A., 2009. Polimixinas - revisão com
410 ênfase na sua nefrotoxicidade. Rev. Assoc. Med. Bras. 55, 752-759.
- 411 16. Nordmann, P., Jayol, A., Poirel, L., 2016a. Rapid detection of polymyxin
412 resistance in *Enterobacteriaceae*. Emerg. Infect. Dis. 22, 1038-1043.
- 413 17. Nordmann, P., Jayol, A., Poirel, L., 2016b. A universal culture medium
414 for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. J. Clin.
415 Microbiol. 54, 1395-1399.
- 416 18. Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M., 2014. Mechanisms of polymyxin
417 resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front. Microbiol.
418 5, 643.
- 419 19. Phee, L., Hornsey, M., Wareham, D.W., 2013. In vitro activity of
420 daptomycin in combination with low-dose colistin against a diverse
421 collection of Gram-negative bacterial pathogens. Eur. J. Clin. Microbiol.
422 Infect. Dis. 32, 1219-1294.
- 423 20. Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: antibacterial
424 activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by
425 plasmids or chromosomes. Clin. Microbiol. Rev. 30, 557-596.

- 426 21. Rahal, J.J., 2008. The role of carbapenems in initial therapy for serious
427 Gram-negative infections. *Crit. Care* 12, S5.
- 428 22. Zavascki, A.P., Goldani, L.Z., Li, J., Nation, R.L., 2007. Polymyxin B for
429 the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antim.*
430 *Chem.* 60, 1206-1215.