

DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM *ENTEROBACTERIACEAE* EMPREGANDO TESTE SIMPLIFICADO (*POLYMYXIN DROP TEST*)

Renata Zacanini Milani (PIBIC/FA), Pedro H. Rodrigues do Amaral, Amanda Dias Pedro, João Paulo S. Pasquini, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientador), e-mail: vldsiqueira@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas
Subárea: Microbiologia

Palavras-chave: polimixina, carbapenêmicos, *Enterobacteriaceae*

Resumo:

O padrão ouro para teste de sensibilidade às polimixinas é a técnica de microdiluição em caldo. Entretanto, esse método é trabalhoso e dispendioso para muitos laboratórios de rotina. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade à polimixina B (PMB) em *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) empregando o teste simplificado *polymyxin drop* (PD) teste. Foram testados isolados clínicos de ERC sensíveis e resistentes à PMB. A metodologia de microdiluição em caldo foi empregada como método de referência para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM). O PD teste foi realizado aplicando 10 µl de solução de PMB (16 µg/ml) sobre a superfície de uma placa de Muller Hinton ágar semeada com inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro do isolado bacteriano. Trinta e três isolados clínicos de ERC foram testados, incluindo vinte e sete *Klebsiella pneumoniae*, um *K. oxytoca*, um *Proteus mirabilis* e quatro *Escherichia coli*. O resultado do PD teste foi concordante com o método de referência em 32 dos isolados testados (CC = 97%). Um isolado de *K. pneumoniae* com CIM da PMB = 1 µg/ml e, portanto, categorizado como sensível pelo método de referência (BrCAST, $S \leq 2 > R$), foi definido como resistente pelo PD teste. Assim, com alta sensibilidade e especificidade (100% e 96%, respectivamente) o PD pode representar um teste simplificado e de baixo custo para a rotina laboratorial de determinação da sensibilidade à PMB.

Introdução

O padrão ouro preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para testes de sensibilidade às polimixinas (PMB e colistina) é a microdiluição em caldo (CLSI, 2020). Entretanto, esse método é trabalhoso e dispendioso, tendo assim algumas limitações para ser implantado na rotina laboratorial. Dessa forma, é necessário buscar métodos

alternativos para avaliação de sensibilidade à polimixina, que sejam mais viáveis para o uso em laboratórios de rotina.

Pasteran et al. (2020) avaliaram um *colistin drop test*, com solução de colistina preparada em diferentes concentrações, inclusive com soluções obtidas por eluição de discos de colistina. Os autores observaram que a concentração de 16 µg/ml apresentou os melhores resultados em diversas espécies de bacilos Gram-negativos multirresistentes. Um teste semelhante empregando solução preparada a partir de discos contendo PMB também trouxe resultados promissores como teste de sensibilidade a este antimicrobiano em bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (CARDOZO et al., 2018). Desta forma, o projeto executado teve como objetivo avaliar a sensibilidade à PMB em isolados clínicos de ERC, empregando um teste simplificado, o *polymyxin drop* (PD) teste, tendo como referência a metodologia de microdiluição em caldo.

Materiais e métodos

Foram selecionadas ERCs sensíveis e resistentes à PMB, provenientes de uma coleção depositada na bacterioteca do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da PMB foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo usando Muller Hinton Broth com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) segundo recomendação do CLSI (CLSI, 2020). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi testada como controle. A interpretação do perfil de sensibilidade à PMB foi de acordo com os pontos de corte (sensível ≤ 2 µg/mL; resistente > 2 µg/mL) estabelecidos pelo BrCAST (2020). A solução para o PD teste foi preparada diluindo dois discos comerciais de PMB de 300 UI (30 µg) em 3,75 ml de CAMHB, para a obtenção de uma concentração de 16 µg/mL. O inóculo bacteriano foi preparado na concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (escala 0,5 de Mc Farland), semeado em uma placa de Muller Hinton Agar (MHA, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA). Antes da incubação, adicionou-se uma gota de 10 µL sobre o inóculo bacteriano. Posteriormente, foi verificado se houve ou não um halo de inibição de crescimento, sendo que a formação do halo de inibição determinou a sensibilidade do isolado testado à PMB.

Os dados foram analisados pela concordância categórica (CC), que representou a taxa de isolados bacterianos agrupados na mesma categoria de sensibilidade pelo DP teste e microdiluição em caldo (método referência). Também foram calculados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

Resultados e Discussão

O PD teste foi realizado com trinta e três isolados clínicos de ERC, incluindo vinte e sete *Klebsiella pneumoniae*, um *K. oxytoca*, um *Proteus*

mirabilis e quatro *Escherichia coli*. PD teste mostrou resultado concordante com o método de referência em 32 dos isolados testados (CC = 97%). Houve discordância em apenas um isolado de *K. pneumoniae*, para o qual a CIM da PMB foi 1 µg/ml, o que categorizou este isolado como sensível a este antimicrobiano, enquanto o PD teste o caracterizou como resistente (Tabela 1). PD teste apresentou sensibilidade igual a 100%, especificidade = 96%, VPP = 83% e VPN = 100% (Tabela 2).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e teste da gota para determinação da susceptibilidade à polimixina B em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC)

ERC	Espécie bacteriana	CIM da polimixina (µg/ml)	Drop test
13105850	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	128	R
12238872	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	R
13248154	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	R
13443437	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	R
13132946	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<0,12	S
13089293	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13179004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13290142	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13132962	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<0,125	S
13308424	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13292617	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13292781	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13290053	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13301870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13129643	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<0,25	S
1308385	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13078321	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13104730	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13101625	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13097784	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<0,12	S
13443453	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13441345	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13452428	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	S
13474685	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	R
13440403	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13384651	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13499963	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	S
13301845	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,5	S
13472887	<i>Proteus mirabilis</i>	>500	R
13499947	<i>Escherichia coli</i>	<0,5	S
13499890	<i>Escherichia coli</i>	1	S
13499963	<i>Escherichia coli</i>	0,5	S
13526103	<i>Escherichia coli</i>	0,5	S

R: resistente; S: sensível

Para as CIMs: considerando pontes de corte do BrCAST 2020 – sensível: CIM ≤ 2 µg/mL; resistente > 2 µg/mL).

Tabela 2: Classificação e quantidade dos dados obtidos para cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

	Condição	Total
Verdadeiros positivos	CIM > 2 µg/ml	5 (A)
Verdadeiros negativos	CIM ≤ 2 µg/ml	28 (D)
Falsos positivos	Drop test R e CIM S	1 (B)
Falsos negativos	Drop test S e CIM R	0 (C)

Sensibilidade: $A/(A+C) = 5/5$ (100%); Especificidade: $D/(B+D) = 28/29$ (96%); VPP: $A/(A+B) = 5/6$ (83%); VPN: $D/(C+D) = 28/28$ (100%);

Considerando que ERC têm sido frequentemente isoladas como agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde e tem aumentado o uso de PMB (SHEU et al., 2019), a correta determinação da sensibilidade a estes antimicrobianos pode contribuir para diminuir a disseminação de isolados de ERC PMB resistentes.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho trazem o DP teste como uma promissora opção, simples e de baixo custo para detecção da resistência à PMB em isolados de ERC.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Bacteriologia Médica do LEPAC/DAB/UEM, à minha orientadora e à Fundação Araucária que me ajudaram e possibilitaram o desenvolvimento deste projeto.

Referências

BrCAST – **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility**. Tabelas pontos corte clínicos. Disponível em <http://brcast.org.br/>. Acesso 11/08/2020.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clin Lab Standards Inst., 2020.

CARDOZO, D.; DALLA-COSTA L.M.; DOS SANTOS, E.M.; VASCONCELOS, T.M.; CONTE, D.; PALMEIRO, J.K. Polymyxin Drop Test and VITEK-2™: Modified protocol and automation to enable detection of polymyxins resistance in Gram-negative bacilli in routine Microb Lab., **Anais 6SIMC**, <https://sbmicrobiologia.org.br/anais6SIMC/São Paulo, SP, Brasil>.

SHEU CC, CHANG YT, LIN SY, CHEN YH, HSUEH PR. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. **Front Microbiol**, v.10, p 80-93, 2019.