

**ITACY GONÇALVES DE SIQUEIRA E SILVA**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE SENSIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS NO USO CLÍNICO DAS POLIMIXINAS**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo  
2010**

**ITACY GONÇALVES DE SIQUEIRA E SILVA**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE SENSIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS NO USO CLÍNICO DAS POLIMIXINAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Orientadora:** Professora Dra. Ana Cristina Gales

**São Paulo  
2010**

Siqueira e Silva, Itacy Gonçalves

**Influência dos Métodos de Sensibilidade aos Antimicrobianos no Uso Clínico das Polimixinas.** Itacy Gonçalves de Siqueira e Silva - São Paulo, 2010.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Infectologia.

Título em inglês: Influence of the Antimicrobial Susceptibility Methods in the Clinical Use of Polymyxins.

1. Testes de sensibilidade 2. Polimixinas 3. *Pseudomonas aeruginosa* 4. *Acinetobacter* spp.

**ITACY GONÇALVES DE SIQUEIRA E SILVA**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE SENSIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS NO USO CLÍNICO DAS POLIMIXINAS**

**Presidente da Banca:**

Professora Dra. Ana Cristina Gales

**Banca Examinadora:**

Professora Dra. Antônia Maria de Oliveira Machado

Professora Dra. Marinês Dalla Valle Martinho

Professora Dra. Maria Cristina Bronharo Tognin

**São Paulo**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Professor Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

**Coordenador do curso de Pós-graduação:**

Professor Dr. Ricardo Sobhie Diaz

**São Paulo**

**2010**

## SUMÁRIO

Índice de Tabelas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iv
.	
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	04
<b>3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	05
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 Amostras bacterianas.....	16
4.2 Avaliação da similaridade genética entre os isolados por meio de <i>Pulsed Field Gel Eletrophoresis</i> (PFGE).....	16
4.3 Testes de sensibilidade às polimixinas.....	18
4.3.1 Preparo das soluções estoque de polimixina B e Colistina.....	18
4.3.2 Diluição em ágar.....	19
4.3.3 Microdiluição em caldo.....	20
4.3.4 Etest.....	21
4.4 Alteração de variáveis dos teste de sensibilidade.....	22
4.4.1 Meio de cultura.....	22
4.4.2 Concentração de cálcio no meio de cultura.....	22
4.4.3 Concentração do inóculo bacteriano.....	23
4.4.4 Tempo de incubação.....	24
4.5 Controle da qualidade.....	24

4.6 Testes de reprodutibilidade.....	24
4.7 Concordância total e categórica.....	25
4.8 Análise de dados.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
5.1 Amostras bacterianas.....	26
5.2 Testes de sensibilidade às polimixinas.....	26
5.3 Comparação dos resultados obtidos entre diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, para determinação de CIM de polimixinas..	29
5.3.1 Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo.....	29
5.3.2 Comparação entre diluição em ágar e Etest.....	33
5.3.3 Comparação entre microdiluição em caldo e Etest.....	37
5.4 Avaliação da influência de diferentes meios de cultura na determinação da sensibilidade às polimixinas.....	41
5.5 Avaliação da influência da concentração de cálcio no meio de cultura nos testes de sensibilidade às polimixinas.....	45
5.6 Avaliação da influência do tamanho do inóculo nos testes de sensibilidade às polimixinas.....	48
5.7 Avaliação de diferentes tempos de incubação para determinação da CIM, por diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest.....	50
5.8 Testes de reprodutibilidade.....	52
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Volumes utilizados para suplementação de cálcio no meio de cultura.....	23
<b>Tabela 2:</b> Teste de sensibilidade às polimixinas por distintas técnicas, para isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. ....	26
<b>Tabela 3:</b> Teste de sensibilidade às polimixinas por diferentes técnicas dilucionais, para isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	27
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de concordância entre as diferentes técnicas de sensibilidade na avaliação da sensibilidade às polimixinas entre amostras de <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> .....	28
<b>Tabela 5:</b> Testes de sensibilidade aos antimicrobianos por distintas técnicas, utilizando diferentes meios de cultura.....	44
<b>Tabela 6:</b> Testes de sensibilidade por distintas técnicas dilucionais, com diferentes concentrações de cálcio no meio de cultura.....	47
<b>Tabela 7:</b> Testes de sensibilidade às polimixinas por diversas técnicas dilucionais, com diferentes concentrações do inóculo bacteriano.....	49
<b>Tabela 8:</b> Testes de sensibilidade às polimixinas por distintas técnicas dilucionais, com leitura em diferentes tempos de incubação.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química das polimixinas.....	07
<b>Figura 2:</b> Concentrações das drogas na placa de microdiluição (concentração 10x maior que a final).....	21
<b>Figura 3:</b> Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo para polimixina B com isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	30
<b>Figura 4:</b> Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo de polimixina B com isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	31
<b>Figura 5:</b> Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo para colistina de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	32
<b>Figura 6:</b> Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo para colistina com isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	33
<b>Figura 7:</b> Comparação entre diluição em ágar e Etest para polimixina B com isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	34
<b>Figura 8:</b> Comparação entre diluição em ágar e Etest para polimixina B com isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	35
<b>Figura 9:</b> Comparação entre diluição em ágar e Etest para colistina com isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	36
<b>Figura 10:</b> Comparação entre diluição em ágar e Etest para colistina com isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	37
<b>Figura 11:</b> Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para polimixina B com isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	38
<b>Figura 12:</b> Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para polimixina B com isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	39

**Figura 13:** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para colistina com isolados de *Acinetobacter* spp..... 40

**Figura 14:** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para colistina com isolados de *P. aeruginosa*..... 41

## RESUMO

**Introdução:** *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* constituem importantes patógenos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde em hospitais brasileiros e tem se tornado, cada vez mais, resistentes a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis. Dessa forma, a indicação clínica do uso parenteral das polimixinas tem sido restabelecida nos últimos anos. Conseqüentemente, os laboratórios de microbiologia devem estar aptos a realizar testes de sensibilidade que forneçam resultados confiáveis. **Objetivo:** Avaliar a influência dos métodos de sensibilidade aos antimicrobianos no uso clínico das polimixinas. **Material e métodos:** Foram testadas nove amostras de *P. aeruginosa* e 10 de *Acinetobacter* spp., quanto à sensibilidade à polimixina B e colistina. Foram comparados os resultados obtidos por diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, realizados conforme recomendações do CLSI. Para cada metodologia foi avaliada a influência do meio de cultura, concentração de cálcio, concentração do inóculo e tempo de incubação, na determinação da CIM. **Resultados:** Houve uma boa correlação entre as distintas técnicas de sensibilidade às polimixinas para *Acinetobacter* spp., diferente de *P. aeruginosa*. Foi observado 100% de concordância entre os resultados obtidos com meio Iso-Sensitest e o meio Mueller-Hinton, por diluição em ágar e Etest, para *Acinetobacter* spp. Já pela metodologia de microdiluição em caldo, essa correlação foi menor: 90% e 60% para polimixina B e colistina, respectivamente. Para *P. aeruginosa*, a metodologia de Etest foi a que mais sofreu variação nas CIMs, quando utilizados diferentes meios de cultura para realização dos testes de sensibilidade. Em geral, com o meio BHI foram obtidas

CIMs mais baixas do que com o meio Müller-Hinton. O aumento da concentração de cálcio no meio de cultura promoveu a elevação em  $\pm 1\text{Log}_2$  nas CIMs de ambas espécies, sendo a metodologia de Etest a que mais sofreu influência dessa variável, sendo que, 55,6% e 88,9% de erros leve foram observados para polimixina B e colistina, respectivamente. Além disso, 11,1% de erro grave foi observado em testes com polimixina B. A metodologia de diluição em ágar sofreu maior influência do tamanho do inóculo do que microdiluição em caldo, apresentando taxas de erro leve de 10% (polimixina B) e 30% (colistina), para *Acinetobacter* spp.; e 33,3% (polimixina B) e 66,6% (colistina), para *P. aeruginosa*. Quando realizada leitura com diferentes tempos de incubação, só foi observada diferenças nas CIMs entre os isolados de *P. aeruginosa*, sendo a metodologia de Etest a que sofreu maior influência dessa variável, onde foram observadas taxas de erro leve de 33,3% (polimixina B) e 44,4% (colistina). Pela metodologia de diluição em ágar ocorreu 11,1% de erro leve. A metodologia de microdiluição em caldo não sofreu influência dessa variável.

**Palavras-Chave:** Polimixina B; Colistina; Teste de sensibilidade aos antimicrobianos; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* spp.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* are important pathogens that cause infections in Brazilian hospitals and have become resistant to almost every available antimicrobial. Thereby, the clinical indication of parenteral use of polymyxin has been reestablished in recent years. Therefore, the clinical laboratory of microbiology need be able to perform reliable susceptibility antimicrobial tests. **Objective:** Analyze the influence of susceptibility antimicrobial tests in the clinical use of polymyxins. **Material and Methods:** Nine *P. aeruginosa* and 10 *Acinetobacter* spp. strains were tested to polymyxin susceptibility. The results of agar dilution, broth microdilution and Etest were compared, according CSLI. The influence of culture medium, calcium concentration, inoculum concentration and incubation time in the susceptibility antimicrobial test was evaluated. **Results:** There was good agreement between different polymyxin antimicrobial susceptibility methods for *Acinetobacter* spp isolates, but not for *P. aeruginosa*. It was observed 100% of agreement between Iso-sensitest and Müller-Hinton medium through agar dilution and Etest for *Acinetobacter* spp. isolates. Through broth microdilution occurred 90% of agreement for polymyxin B and 60% for colistin. Between *P. aeruginosa* isolates, Etest had greater MIC variation when using different culture mediums. In general, BHI medium had low MICs comparing with Müller-Hinton. The calcium concentration increase in the culture medium promoted MICs elevation in  $\pm 1\text{Log}_2$  of dilution, for both microorganisms. Etest had 55,6% (polymyxin B) and 88,9% (colistin) of minor error, and 11,1% of major error in polymyxin B. Inoculum size had greater influence in agar dilution, with minor error rates of 10% (polymyxin B) and 30% (colistin) for *Acinetobacter* spp. isolates, and 33,3% (polymyxin B) and 66,6% (colistin) for *P. aeruginosa* isolates. Different time incubations caused MICs variation only between *P. aeruginosa* isolates. Etest method had 33,3% (polymyxin B) and 44,4%(colistin) of minor error. Through agar dilution, the minor error rate was 11,1% with incubation time variation.

**Key-Words:** Polymyxin B; Colistin; Antimicrobial Susceptibility Methods; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* spp.

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos consiste em um problema no Brasil e na maioria dos países do mundo. Uma grande variedade de patógenos tem adquirido resistência a um número cada vez maior de antibióticos, reduzindo as opções de tratamento para infecções causadas por esses microrganismos (Gales *et al.*, 2006; Lo-Ten-Foe *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Miyajima *et al.*, 2008; Vaara *et al.*, 2008; Yau *et al.*, 2009).

*Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* constituem importantes patógenos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde em hospitais brasileiros (Levin *et al.*, 1999).

Na década de 60, as polimixinas constituíram a principal opção terapêutica disponível para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Porém, devido a sua importante toxicidade, esses agentes passaram a ser substituídos gradativamente pelas cefalosporinas de amplo-espectro e aminoglicosídeos (Horton & Pankey, 1982; Drabick *et al.*, 1998).

No início da década de 70, infecções causadas por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. eram tratadas, com sucesso, com antimicrobianos de espectro limitado como gentamicina ou carbenicilina. Entretanto, entre os anos 70 e 80, um aumento nas taxas de resistência a esses agentes começou a ser observado, incluindo a maioria dos aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina (Duncan, 1974; Morohoshi e Saito, 1977; Garcia *et al.*, 1983). Na década de 90, o imipenem se mostrava como único antimicrobiano efetivo no tratamento das infecções causadas por essas cepas (Motti e Amato, 1992).

Com o surgimento de amostras clínicas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes causando infecções graves, a indicação clínica do uso parenteral das polimixinas foi restabelecida (Young *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1999; Appleman *et al.*, 2000). Conseqüentemente, os laboratórios de microbiologia devem estar aptos a realizar testes de sensibilidade às polimixinas que forneçam resultados confiáveis.

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para avaliar a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. A escolha do método a ser utilizado, é baseada em fatores tais como metodologia de fácil execução, custo, flexibilidade na seleção das drogas para o teste e acurácia da metodologia.

O método de disco difusão em ágar é o mais utilizado rotineiramente em laboratórios de microbiologia clínica para testar patógenos mais frequentemente isolados de crescimento rápido (Galani *et al.*, 2008). O Etest é uma variante dilucional da técnica de disco difusão, muito utilizado em laboratórios clínicos como método rápido para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os métodos de diluição em caldo ou ágar são métodos dilucionais considerados como padrão-ouro pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (CLSI, 2006a).

Embora, recentemente, o CLSI tenha estabelecido os critérios interpretativos para categorizar as amostras em sensíveis ou resistentes às polimixinas, resultados discordantes ainda tem sido encontrados quando amostras de bacilos Gram negativos não-fermentadores são testadas (Tan & Ng, 2006; Heidjen *et al.*, 2007; Lo-Ten-Foe *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2007). A

discrepância de resultados poderia ser atribuída às diferentes condições do teste (meio de cultura, tempo de incubação, inóculo bacteriano, concentração de cálcio no meio de cultura) ou às técnicas empregadas.

Sendo assim, torna-se necessário o conhecimento dos fatores que interferem na execução e interpretação dos testes de sensibilidade às polimixinas, para que os laboratórios clínicos possam fornecer resultados confiáveis e os clínicos possam utilizar polimixinas para o tratamento de pacientes com infecções graves por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar a influência dos métodos de sensibilidade aos antimicrobianos no uso clínico das polimixinas.

### Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade das amostras de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. às polimixinas pelas técnicas de diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest;

- Avaliar a influência de variáveis como o meio de cultura, a concentração de cálcio, o inóculo bacteriano e o tempo de incubação, na determinação da CIM das polimixinas pelas distintas técnicas de sensibilidade diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest;

- Analisar a concordância entre as distintas técnicas de sensibilidade para prever a sensibilidade às polimixinas entre os isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. são bacilos Gram negativos, não fermentadores de glicose. Infecções causadas por esses microrganismos multirresistentes constituem um grande problema nos hospitais brasileiros e no mundo, sendo relatados entre os principais patógenos Gram negativos causadores de infecção em hospitais (Gales *et al.*, 2001; Yau *et al.*, 2009). Ambas espécies podem apresentar resistência a diversos antimicrobianos, tornando difícil a terapia a essas infecções (Navon-Venezia *et al.*, 2005). Esses patógenos apresentam altas taxas de resistência à maioria dos antimicrobianos utilizados. Além disso, o número de novas drogas aprovadas para uso é baixo, restando poucas opções para o tratamento dessas infecções (Arruda *et al.*, 1999; Sader *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2009). Tigeciclina pode constituir uma opção terapêutica alternativa para infecções causadas por *Acinetobacter* spp. multirresistentes. Entretanto, esse antibiótico não é efetivo contra isolados de *P. aeruginosa* (Yau *et al.*, 2009). Diversos estudos relatam a boa atividade de colistina e polimixina B contra isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, além de enterobactérias como, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Tan e Ng, 2006; Miyajima *et al.*, 2008). Em 2009, Yau *et al.* relatou a resistência de 30 isolados de *Acinetobacter baumannii* a diversos antibióticos usados normalmente em hospitais, sendo que, mais de 37% desses isolados foram sensíveis, somente, à tigeciclina e à colistina. Em um estudo de Miyajima *et al.* (2008), 94,7% dos isolados de *P. aeruginosa* foram resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas. Por outro lado, esses microrganismos ainda eram sensíveis à colistina e polimixina B.

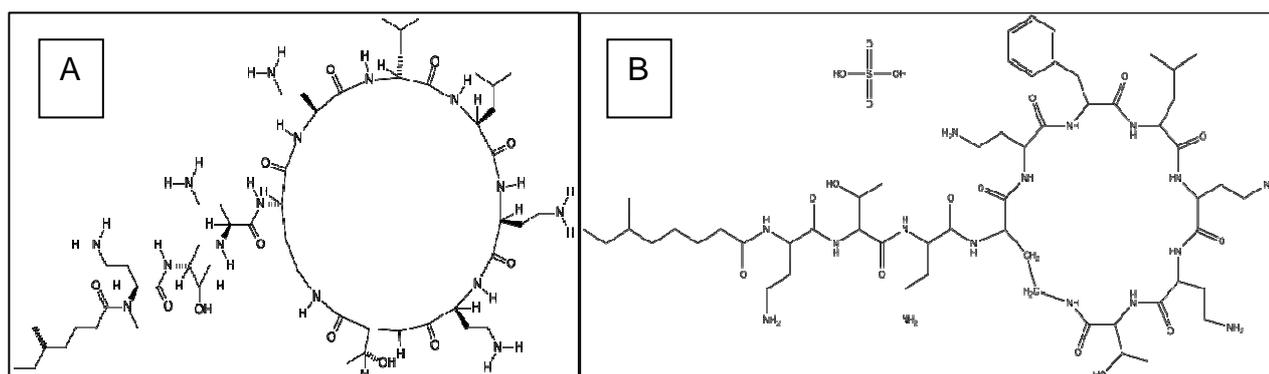
Esses autores afirmam que as polimixinas parecem ser alternativas indispensáveis para o tratamento dessas infecções por esses microrganismos.

Em 1947 as polimixinas foram isoladas a partir de microrganismos do solo *Bacillus polymyxa* e *Bacillus colistinus*. Essa classe de antimicrobianos consiste de polimixinas A, B, C, D e E, entretanto, somente polimixina B e E (colistina) são utilizadas clinicamente.

Na década de 60, as polimixinas constituíram a principal opção terapêutica disponível para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Porém, devido à sua importante toxicidade, esses agentes passaram a ser substituídos gradativamente, a partir dos anos 70, pelas cefalosporinas de amplo-espectro e aminoglicosídeos (Horton e Pankey, 1982; Drabick *et al.*, 1998). No entanto, com o surgimento de amostras clínicas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes causando graves infecções, a indicação clínica do uso parenteral das polimixinas foi reestabelecida (Young *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1999; Appleman *et al.*, 2000). Mais recentemente, o surgimento e a dissiminação de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases também tem levado à utilização clínica das polimixinas para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (Gales *et al.*, 2006).

As polimixinas são compostas estruturalmente de uma cadeia de ácidos graxos ligados a um anel peptídico policatiônico composto de oito a dez aminoácidos (Gales *et al.*, 2006) (Figura 1). As polimixinas agem na membrana celular bacteriana, pois o seu anel peptídico policatiônico interage com as moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) aniônico da membrana externa das bactérias Gram negativas. Desse modo, deslocam os cátions, cálcio e magnésio, que estabilizam as moléculas de LPS, aumentando a permeabilidade do envelope

celular, fazendo com que haja perda do conteúdo celular e, conseqüentemente a morte bacteriana (Gunn *et al.*, 1998; Gales *et al.*, 2006). Além disso, essa classe de antimicrobiano também possui atividade anti-endotoxina. A endotoxina de bactérias Gram negativas, a porção do lipídio A das moléculas de LPS, é neutralizada pela ação das polimixinas (Chen *et al.*, 2006).



**Figura 1:** Estrutura química das polimixinas. A: Colistina; B: Polimixina B.

As polimixinas tem atividade contra uma grande variedade de bacilos Gram negativos, incluindo enterobactérias e não-fermentadores (Gales *et al.*, 2001; Ouder Kirk *et al.*, 2003; Gales *et al.*, 2006). Segundo Gales e colaboradores (2006), a polimixina B ainda permanece ativa contra isolados clínicos de *P. aeruginosa* ( $MIC_{50/90}$ ,  $\leq 1/2$  mg/L; 98.7% de sensibilidade), incluindo aqueles isolados resistentes aos carbapenens, e *Acinetobacter* spp. ( $MIC_{50/90}$ ,  $\leq 1/2$  mg/L; 97.9% de sensibilidade). Além disso, esses autores constataram que a polimixina B foi ativa contra cepas de *Escherichia coli* (99.5% de sensibilidade) e *Klebsiella* spp. (98.2% de sensibilidade) produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ES $\beta$ L).

A resistência às polimixinas ainda é considerada um evento incomum (Gales *et al.*, 2006), entretanto, Hogardt *et al.* (2004) concluíram que, apesar das

polimixinas serem indispensáveis para terapia das infecções por microorganismos multiresistentes em pacientes com fibrose cística, o desenvolvimento de resistência em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de fibrose cística é menos raro.

Dois fenótipos de resistência às polimixinas foram descritos até o momento, um decorrente de um processo adaptativo e o outro mutacional (Ouderkirk *et al.*, 2003; Gales *et al.*, 2006). No processo adaptativo, as amostras bacterianas resistentes são selecionadas gradativamente em meios de crescimento contendo concentrações crescentes de polimixinas. Essas amostras apresentam elevadas CIMs para polimixinas, geralmente acima de 1024 µg/mL. Por outro lado, as amostras que exibem o fenótipo decorrente de mutação, apresentam CIMs inferiores a 32 µg/mL. Acredita-se que ambos os mecanismos levem a mudanças na membrana externa bacteriana, impedindo a ligação da droga com a superfície bacteriana (Gales *et al.*, 2006). Entretanto, distintos mecanismos de resistência às polimixinas já foram descritos na literatura (Brodsky *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004; Mathur e Waldor, 2004; Moskowitz *et al.*, 2004; Winfield e Groisman, 2004; Winfield *et al.*, 2005; Loutet *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2006; Zavascki *et al.*, 2007).

Modificações na estrutura do LPS, como a substituição do 4-fosfato pela 4-aminoarabinose na composição do lipídio A podem resultar na resistência à polimixina B em isolados de *Salmonella* spp., *Yersinia pestis* e *P. aeruginosa* (Gunn *et al.*, 1998, Trend *et al.*, 2001; Winfield *et al.*, 2005). Moskowitz *et al.* (2004) observaram que as cepas de *P. aeruginosa* que desenvolviam resistência quando cresciam na presença de polimixina B (mecanismo adaptativo) apresentavam uma aminoarabinose no lipídio A. Esses autores também observaram o desenvolvimento de resistência cruzada de cepas de *P. aeruginosa*

resistentes à polimixina com outros antimicrobianos polissacarídicos catiônicos. A diminuição da carga negativa do LPS modificado devido à neutralização do fosfato ácido do lipídio A, por exemplo, também tem sido observada em amostras resistentes às polimixinas (Groisman *et al.*, 1997). Grande parte dos relatos de resistência às polimixinas se refere às modificações estruturais do LPS bacteriano. Entretanto, Schmidtchen *et al.* (2002) mostraram a existência de proteinases em *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus pyogenes*, que degradavam e inativavam antimicrobianos peptídicos.

Com o surgimento de microrganismos resistentes a diversos antimicrobianos comumente utilizados, as polimixinas tornaram-se, novamente, uma opção para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos. Em alguns casos, esses antimicrobianos são as únicas opções disponíveis. Sendo assim, os laboratórios clínicos devem estar aptos a realizar os testes de sensibilidade às polimixinas com acurácia, para auxiliar, corretamente, no tratamento dessas infecções.

Existem diferentes testes de sensibilidade às polimixinas, recomendados pelo CLSI (CLSI, 2009), entretanto, diversos estudos discordam em qual é a melhor metodologia para utilização na rotina de laboratórios clínicos.

Algumas técnicas, mais simples, como disco difusão, são a escolha do laboratório para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Entretanto, a acurácia da mesma nem sempre é aceitável para todos os antimicrobianos testados. Em 2004, Nicodemo *et al.* relataram, em seu estudo, que a metodologia de disco difusão apresentou boa concordância com uma técnica dilucional de referência para diversos antibióticos, com exceção das polimixinas B e colistina, nas quais observaram altas taxas de discordância entre os resultados obtidos.

Outros estudos já comprovaram que a técnica de disco difusão, apresenta pouca acurácia para determinação da sensibilidade às polimixinas entre as amostras de *Acinetobacter* spp. (Gales *et al.*, 2001; Nicodemo *et al.*, 2004; Arroyo *et al.*, 2005; Tan e Ng, 2006). Gales e colaboradores, assim como Tan e Ng, observaram falsa sensibilidade nos resultados obtidos pela técnica de disco difusão em comparação com a metodologia de referência microdiluição em caldo para isolados de *Acinetobacter* spp. (Gales *et al.*, 2001; Tan e Ng, 2006). Casos como esses, onde foram observados erros muito grave, considerando erroneamente sensível uma amostra resistente, podem levar a falha na terapia antimicrobiana.

As técnicas dilucionais, como, diluição em ágar e microdiluição em caldo são considerados como metodologias de referência para determinação da sensibilidade às polimixinas (CLSI, 2009). Os estudos publicados até o momento, nem sempre mostram os mesmos resultados quanto à concordância entre as diferentes metodologias. Hogardt *et al.*, 2004 relataram uma discordância entre diluição em ágar e microdiluição em caldo, observando valores de CIMs mais altos pela técnica diluição em ágar. Por outro lado, outros estudos observaram altas taxas de concordância dos resultados das CIMs obtidas pelas duas metodologias (Gales *et al.*, 2001). Entretanto, essas técnicas são laboriosas, de difícil implantação na rotina laboratorial (Arroyo *et al.*, 2005).

Já, a metodologia de Etest, embora não recomendada pelo CLSI para avaliação de sensibilidade às polimixinas, é muito utilizada em laboratórios clínicos por ser de mais fácil realização (CLSI, 2009). Entretanto, existem alguns relatos na literatura de erros de interpretação dos resultados para determinação da sensibilidade às polimixinas por essa técnica (Heijden *et al.*, 2007). Heijden *et al.* (2007) observaram falsa sensibilidade, nos resultados obtidos por Etest, em

comparação à microdiluição em caldo de polimixina B e colistina, com isolados de *P. aeruginosa*. Esses mesmos autores mostram uma boa concordância entre diluição em ágar e microdiluição em caldo, para esse microrganismo. Já, Nicodemo *et al.* (2004), comparando a técnica de Etest e de diluição em ágar, observaram grande concordância entre elas para determinação do perfil de sensibilidade à polimixina B e colistina para isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, com elevadas taxas de concordância total (96,7% para colistina e 89,4% para polimixina B). Arroyo *et al.* (2005) sugerem, em seu estudo, que Etest pode ser uma alternativa para um método de referência para detecção de resistência à colistina em isolados clínicos de *A. baumannii*.

Tan e Ng (2007) concluem que o melhor método de referência para teste de sensibilidade para polimixinas ainda não está definido. Os dados obtidos na literatura, até o momento, sugerem uma boa concordância entre os métodos dilucionais.

Critérios de reprodutibilidade para determinação da sensibilidade a antimicrobianos são críticos para interpretação apropriada dos testes de sensibilidade. Diversas variáveis, presentes nas diferentes metodologias utilizadas, podem influenciar na interpretação dos resultados de um teste de sensibilidade, como: A) o meio de cultura utilizado; B) a concentração de íons; C) o inóculo bacteriano e D) o tempo de incubação.

O CLSI preconiza que o meio de cultura Müller-Hinton seja utilizado para a avaliação da sensibilidade antimicrobiana às polimixinas, entretanto, a British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) recomenda o meio Iso-Sensitest para esse fim (CLSI, 2009; BSAC, 2009). Koeth *et al.* (2000) afirmam, em seu estudo, que Iso-Sensitest é uma alternativa aceitável para determinação da CIM.

No entanto, diversos estudos vem relatando, há algum tempo, a existência de variação na interpretação dos resultados de testes de sensibilidade, conforme o meio de cultura utilizado (Pollock *et al.*, 1978; Milne *et al.*, 1993).

Um estudo realizado em 2007 mostra que, no meio Iso-Sensitest, houve crescimento de uma subpopulação resistente à polimixina, fato esse não observado quando o teste foi realizado no meio Müller-Hinton. Apesar disso, esses autores observaram que os meios Müller-Hinton e Iso-Sensitest apresentaram alta concordância na obtenção das CIMs pelas técnicas de diluição em ágar e microdiluição em caldo, diferente da metodologia de Etest que apresentou altas taxas de erros com a utilização de diferentes meios de cultura (Lo-Tem-Foem *et al.*, 2007).

O CLSI recomenda o meio de cultura BHI para triagem de *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina. Existem poucos estudos testando a confiabilidade dos resultados obtidos em testes de sensibilidade realizados com BHI. Duncan *et al.* (1974) realizaram testes de sensibilidade à gentamicina, para isolados de *P. aeruginosa* utilizando a metodologia de diluição em ágar, com meio de cultura BHI e encontraram resultados idênticos aqueles obtidos com Müller-Hinton. Até o momento, não existem estudos que utilizem o meio BHI para realização de teste de sensibilidade às polimixinas, testando sua eficácia para esse fim.

A concentração de íons, como cálcio, magnésio e manganês do meio de cultura, utilizado para a realização de testes de sensibilidade a diversos antimicrobianos, pode influenciar na atividade *in vitro* do mesmo, promovendo erros na interpretação dos resultados (Kenny *et al.*, 1980; Andrews *et al.*, 2002; Thamlikitkul e Tiengrim, 2008). Casillas *et al.* (1981) só conseguiram obter as

zonas de inibição de gentamicina, no tamanho esperado para a amostra controle, quando o meio de cultura teve a concentração de cálcio e magnésio ajustada.

Existem relatos na literatura de que diferentes marcas ou lotes de meios de cultura podem gerar resultados controversos para testes de sensibilidade às polimixinas. Em 1975, D'Amato *et al.* observaram elevações nas CIMs de polimixina B com o aumento da concentração de cálcio e magnésio no meio de cultura. Esses autores relataram que quando a metodologia de microdiluição em caldo, para diversos antibióticos, entre eles polimixina B, era realizada com suplementação de cálcio e magnésio no meio de cultura, os valores de CIM eram superiores aos obtidos por diluição em ágar, entretanto, o contrário acontecia quando o meio não era suplementado com esses íons. Esses autores também observaram que a combinação de cálcio e magnésio produzia maior variação dos resultados do teste de sensibilidade do que quando esse dois íons eram adicionados separadamente. Além disso, outro estudo relatou a presença de diferentes concentrações de manganês entre diferentes marcas comerciais de Müller-Hinton ágar. Esses autores observaram uma relação entre o aumento da concentração desse íon e obtenção de CIMs mais elevadas para tigeciclina entre amostras de *Acinetobacter* spp., enterobactérias, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* (Fernández-Mazarrasa *et al.*, 2009).

O CLSI preconiza uma concentração de 10 a 12,5mg/L de magnésio e 20 a 25mg/L de cálcio para testes de sensibilidade à maioria dos antimicrobianos, incluindo as polimixinas. Entretanto, a concentração desses íons varia conforme o fabricante e até mesmo entre os diferentes lotes de um mesmo fabricante. Sendo assim, a suplementação correta de cátions no meio de cultura é importante para a obtenção de resultados corretos do teste de sensibilidade.

O preparo do inóculo bacteriano é a primeira fase para a realização de um teste de sensibilidade aos antimicrobianos. O efeito inóculo é um fenômeno observado *in vitro* de uma significativa elevação nas CIMs de antimicrobianos quando o número de microrganismos inoculados no teste de sensibilidade é maior que aquele preconizado (Miyazaki *et al.*, 2009). O CLSI recomenda a utilização de um inóculo na concentração de  $1 \times 10^4$  UFC/mL para realização dos testes dilucionais de sensibilidade (CLSI, 2009). Diversos estudos mostram a diminuição da atividade *in vitro* de diferentes antibióticos com o aumento da concentração do inóculo bacteriano utilizado para a realização do teste de sensibilidade, sendo que, em alguns casos foi possível observar a mudança da categoria de sensibilidade, de sensível para resistente entre os isolados testados (Corrado *et al.*, 1980; Miyazaki *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que seja feito o controle do inóculo bacteriano, por meio de contagem de colônias, para evitar o efeito inóculo e a confirmação dos fenótipos de resistência (Miyazaki *et al.*, 2009). Alguns estudos com vancomicina para *Staphylococcus aureus*, mostram melhores resultados quando utilizada escala dois de McFarland, ao invés da preconizada pelo CLSI (Walsh *et al.*, 2001; Lulitanond *et al.*, 2006). Já Mizunaga *et al.* (2005) não obtiveram aumento significativo da CIM, para nenhum antimicrobiano testado, considerando, em seu estudo, um aumento de mais de 4 vezes na CIM.

Outro fator que pode influenciar na determinação da sensibilidade a antimicrobianos é o tempo de incubação. O CLSI recomenda de 16 a 20 horas de incubação para testes com *Acinetobacter* spp. e de 20 a 24 horas de incubação para testes com isolados de *P. aeruginosa*, para diluição em ágar, microdiluição em caldo e, também, para Etest (CLSI, 2009). Acredita-se que o aumento do tempo de incubação pode induzir o crescimento de uma subpopulação resistente

às polimixinas, podendo gerar erros de interpretação dos testes. No entanto, não existe um consenso na literatura a respeito da real influência do tempo de incubação nos testes de sensibilidade. Alguns estudos relatam que o aumento do tempo de incubação pode elevar, em algumas diluições, o resultado dos testes de sensibilidade (Hogdart *et al.*, 2004; Tan e Ng, 2007). Entretanto, Kohner *et al.* (1997) não encontraram diferenças nos resultados obtidos na avaliação da sensibilidade às polimixinas com 24 ou 48 horas de incubação utilizando diferentes metodologias.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras bacterianas

Inicialmente, foram selecionadas dez amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e dez amostras de *Acinetobacter* spp., que se encontravam armazenadas em TSB com 15% de glicerol a -20°C, no banco de microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), da Disciplina de Infectologia da UNIFESP.

As amostras foram cultivadas duas vezes em ágar sangue antes de serem submetidas aos testes fenotípicos, para a garantia da viabilidade e da pureza das amostras. Preferencialmente, foram selecionadas amostras bacterianas que, por meio da técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, mostraram-se genotipicamente distintas entre si. Pelo menos cinco amostras de cada espécie eram resistentes aos carbapenems.

### 4.2 Avaliação da similaridade genética dos isolados estudados por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

A relação genética entre os isolados foi avaliada pela técnica de PFGE com o objetivo de verificar se esses não fossem representantes de um mesmo clone.

As amostras foram incubadas por 18 a 24 horas em 10 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Após, foram centrifugadas por 20 minutos a 3000rpm. O sobrenadante foi desprezado e, o precipitado contendo

as células bacterianas, diluído em 1 mL de solução salina, homogeneizado e transferido para tubo de microcentrífuga previamente pesado.

Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi removido. O material centrifugado foi diluído em solução salina, na proporção 1:1 entre o volume de diluente e o peso do material obtido pela centrifugação. Esse último valor foi calculado pela subtração do peso do tubo vazio pelo peso do tubo contendo o precipitado de células. Após minuciosa homogeneização da mistura, 40  $\mu$ L dessa foi transferido para outro tubo, que continha 300  $\mu$ L de tampão TEN (Tris 100 mM pH 7.5; EDTA 100 mM, NaCl 150 mM). Nesses tubos foi adicionado 340  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão, que foi colocado em moldes para a formação de blocos de gel de agarose.

Depois de solidificados, os blocos foram incubados a 37°C, por no mínimo 4 horas em solução EC (Tris 6 mM pH 6.5, NaCl 1 M; EDTA 0,01 M, Brij 58 0,5%, Sarcosil 0,5% e Deoxiglicolato 0,2%). A solução EC foi removida e substituída por 2 mL de solução ES (EDTA 0,4 M pH 9,3 e Sarcosil 10%) contendo 1 mg/mL de proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram incubadas por 12 horas a 50°C. Posteriormente ao tratamento com proteinase K, foram realizadas quatro lavagens com CHEF-TE (Tris 0,1 M pH 7.5, EDTA 0,1 M), de 30 a 60 minutos. O DNA bacteriano contido nos blocos de agarose foi submetido à clivagem com Spe I, a 37°C por 12-18 horas, de acordo com instruções do fabricante (New England Biolabs, Ipswich, EUA).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, em TBE 0,5x (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M), no sistema CHEF-DR III (BioRad Laboratories, Califórnia, EUA) em temperatura de 13°C e utilizando

corrente elétrica de 200 Volts (6V/cm). O gel foi corado com brometo de etídio 0,08 $\mu$ L/mL e fotografado sob iluminação ultravioleta (Maslow; Mulligan, 1996).

As amostras foram consideradas idênticas (derivadas de uma mesma cepa ou pertencentes a um mesmo clone) quando apresentaram perfil eletroforético idêntico de todas as bandas. As amostras que apresentaram diferenças do perfil de até seis bandas foram consideradas semelhantes (subtipos) e pertencentes a um mesmo clone. As amostras que apresentaram sete ou mais bandas discordantes foram consideradas amostras geneticamente distintas (Tenover *et al.*, 1995).

### **4.3 Testes de Sensibilidade às Polimixinas**

A avaliação da atividade antimicrobiana de polimixina B e colistina foi realizada pelas técnicas de diluição em ágar e microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2006a) e, pela técnica de Etest, de acordo com as recomendações do fabricante (AB Biodisk, Solna, Suécia).

A CIM foi definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. As amostras foram classificadas como sensíveis ou resistentes às polimixinas, de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2006b).

#### **4.3.1 Preparo das soluções estoque de Polimixina B e Colistina**

Os sais de antimicrobianos utilizados nos testes de sensibilidade foram sulfato de polimixina B e sulfato de colistina, ambos obtidos da Sigma Chemical

(St. Louis, MO, EUA). Os sais foram mantidos num dessecador em ambiente refrigerado (temperatura entre 2-8°C).

A solução estoque dos antibióticos foi preparada de acordo com as normas estabelecidas pelo CLSI (2006a). A quantidade de sal, utilizada para preparar a solução estoque, foi estabelecida pela seguinte fórmula:

$$P = \frac{\text{Volume} \times \text{Conc.Sol.}}{\text{Potência}}$$

Onde,

Volume: volume da solução estoque desejada (mL); Conc. Sol.: concentração da solução desejada ( $\mu\text{g/mL}$ ); Potência: atividade do antimicrobiano ( $\mu\text{g/mg}$ ).

As soluções estoque foram preparadas na concentração de 3200  $\mu\text{g/mL}$ . Diluições seriadas foram realizadas, com caldo Müller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), para obter concentrações finais de antimicrobianos que variaram de 0,03 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , tanto para diluição em ágar quanto para técnica de microdiluição em caldo.

#### 4.3.2 Diluição em ágar

Para o preparo das placas, 2 mL de uma solução de antimicrobiano, com concentração 10 vezes superior a ser testada, juntamente com a solução de  $\text{CaCl}_2$ , foi adicionado a 18mL de ágar Müller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), com temperatura estabilizada em 56°C. Após homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri de 90 x 15 mm. As placas foram utilizadas no

mesmo dia ou armazenadas entre 2 e 8°C por, no máximo, 24 horas. A concentração da droga no meio de cultura variou entre 32 a 0,03 em µg/mL.

A suspensão bacteriana foi preparada a uma concentração correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL) com o auxílio de um turbidímetro digital (Baxter®, Sacramento, EUA). Após estas etapas, a suspensão bacteriana foi diluída com água destilada estéril na proporção de 1:10 mL, resultando em inóculos de aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^7$  UFC/mL.

Duzentos microlitros do inóculo bacteriano foi transferido para a base do inoculador de Steers com 37 pinos. Desse modo, 1 a 2 µL de cada amostra foi inoculado na placa de Petri obtendo o inóculo final de  $10^4$  UFC/mL. As placas foram deixadas em temperatura ambiente até a absorção do inóculo pelo ágar. O resultado foi lido após incubação a 35°C, por 24 horas.

#### **4.3.3 Microdiluição em caldo**

As soluções de antimicrobianos foram dispensadas nas microplacas de 96 orifícios conforme a Figura 2. Em cada placa de microdiluição, uma linha foi usada como o controle de esterilidade. A coluna 1 foi utilizada como controle de crescimento, em todas as placas. As placas foram identificadas, congeladas à -70°C e utilizadas em até 24 horas após o preparo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
B		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
C		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
D		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
E		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
F		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
G		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320
H		0,3	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320

**Figura 2:** Concentrações das polimixinas na placa de microdiluição (concentração 10x maior que a final). Cada linha representa uma amostra e cada coluna uma concentração do antibiótico em µg/mL.

Foi preparado um inóculo na concentração correspondente a 0.5 da escala de McFarland, com o auxílio de um turbidímetro digital (Baxter®, Sacramento, EUA). A suspensão foi diluída com água destilada estéril na proporção de 1:1000, resultando em inóculos de aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^5$  UFC/mL. Vinte microlitros da suspensão bacteriana foi inoculado nos orifícios da placa, obtendo um inóculo final de  $10^4$  UFC/mL (diluição 1:10) e, diluindo, em 10 vezes, a concentração da droga. O resultado foi lido após incubação a  $35^\circ\text{C}$ , por 24 horas, por inspeção visual.

#### 4.3.4 Etest

Foi preparado um inóculo com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão foi uniformemente semeada em placas com o meio de cultura acrescido de cálcio. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos para que houvesse a absorção do inóculo pelo meio de

cultura. Logo após, as fitas de Etest, contendo os antimicrobianos com concentrações entre 0,064 a 1.024 µg/mL, foram dispensadas na superfície do ágar.

As placas foram incubadas a 35°C, por 24 horas. A determinação da CIM foi feita pela leitura da elipse formada em torno da fita de Etest.

#### **4.4 Alteração de variáveis nos testes de sensibilidade**

Para analisar fatores que pudessem influenciar na realização dos testes de sensibilidade às polimixinas, foram alteradas variáveis preconizadas pelo CLSI, como, o meio de cultura, a concentração de cálcio, a concentração do inóculo bacteriano e tempo de incubação.

##### **4.4.1 Meio de cultura**

Cada metodologia avaliada foi realizada, conforme descrito acima (Itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4), com variação de três diferentes meios de cultura: o meio Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), preconizado pelo CLSI, além dos meios ISO-sensitest (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), com o intuito de verificar possíveis diferenças na determinação da CIM para as polimixinas.

##### **4.4.2 Concentração de Cálcio no Meio de Cultura**

Para as três metodologias estudadas, diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, realizadas conforme descrito nos itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4, foram utilizados meios de cultura com concentrações de cálcio de 25, 50 e 75 mg/L.

Para a suplementação de cátion divalente cálcio, foi preparada uma solução padrão, de 10mg/mL, de acordo com as recomendações do CLSI. Ainda, foi acrescido 0,1 mL de solução padrão fria de cálcio para cada litro de meio de cultura, para que se obtivesse a concentração desejada (Tabela 1). De acordo com as informações obtidas do fabricante do meio de cultura, foi calculado o volume necessário da solução de  $\text{CaCl}_2$  para atingir a concentração de cálcio desejada para cada lote de meio de cultura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Volumes utilizados para suplementação de cálcio no meio de cultura.

Meio de cultura (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra)	Concentração original de cálcio (informação fornecida pelo fabricante)	Volume da solução de cálcio suplementado em 18 mL de meio de cultura		
		$\text{Ca}^{++}$ 25 mg/L	$\text{Ca}^{++}$ 50 mg/L	$\text{Ca}^{++}$ 75 mg/L
Müller-Hinton ágar	18,81 mg/L	11,16 $\mu\text{L}$	56,16 $\mu\text{L}$	101,16 $\mu\text{L}$

#### 4.4.3 Concentração do Inóculo

A concentração do inóculo foi modificada nas metodologias de diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, realizadas conforme descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3. Foram utilizados inóculos nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL para verificar possível variação significativa no resultado do teste de sensibilidade. Não foi realizada a variação desse parâmetro, na metodologia de Etest, por essa ser inóculo independente ( AB biodisk, Solna, Suécia).

#### 4.4.4 Tempo de incubação

Foram realizados testes de sensibilidade a polimixina B e colistina por diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, conforme descritos acima (itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4), segundo recomendações do CLSI (2006a). Foram feitas leituras com 18, 24 e 48 horas de incubação a 37°C. Os resultados foram analisados segundo critérios interpretativos do CLSI (2006b).

#### 4.5 Controle da Qualidade

Para o controle da qualidade dos testes de sensibilidade foram utilizadas as cepas ATCC 27853 de *P. aeruginosa* e ATCC 25922 de *Escherichia coli*, seguindo critérios estabelecidos pelo documento do CLSI (2006b) M100-S16.

Em todos os testes foi feito um controle de inóculo pela metodologia de contagem de colônias. Uma diluição seriada 1:10 do inóculo foi realizada com solução salina 0,85%. Vinte microlitros de cada diluição foi semeado em placas de ágar Müeller-Hinton em triplicata e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. Após a contagem de colônias foi utilizada a seguinte fórmula para determinar se o inóculo estava correto:  $Cc = 50 \times N \times D$ ; onde, N foi a média de colônias contadas na triplicata e D foi a diluição. 50 é uma constante para a correção do volume em microlitros

#### 4.6 Testes de Reprodutibilidade

Três amostras de cada espécie foram selecionadas aleatoriamente para os testes de reprodutibilidade. Essas amostras foram testadas em triplicata, em três ocasiões distintas utilizando as mesmas condições pré-estabelecidas.

#### **4.7 Concordância total e categórica**

Foram considerados resultados concordantes quando as CIM obtidas foram idênticas ou até mais ou menos uma diluição logarítmica ( $\pm 1\text{Log}_2$ ) de diferença.

A concordância categórica foi definida como a classificação das amostras em uma mesma categoria de sensibilidade pelas diferentes metodologias utilizadas. Falsa sensibilidade e falsa resistência foram classificadas como erro muito grave e erro grave, respectivamente. Erros na definição da categoria intermediária foram classificados como erro menor, de acordo com as recomendações do CLSI.

#### **4.8 Análise dos dados**

As variáveis obtidas pelos testes de diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest foram linearizadas por conversões logarítmicas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Amostras Bacterianas

Foram avaliadas neste estudo dez amostras de *Acinetobacter* spp. Das 10 amostras de *P. aeruginosa*, somente nove foram estudadas, pois a amostra P1080 não permaneceu viável durante os testes. As 19 amostras estudadas foram consideradas distintas entre si, por meio da técnica de PFGE.

### 5.2 Testes de sensibilidade às polimixinas

Dez amostras de *Acinetobacter* spp. foram avaliadas neste estudo, cujas CIMs para polimixina B e colistina podem ser observadas na Tabela 2. Das amostras avaliadas, somente uma apresentou resistência às polimixinas (MICs entre 4 e 8 ug/mL). Não foi observada uma diferença significativa na atividade *in vitro* entre a colistina e a polimixina B contra as amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas.

**Tabela 2:** Teste de sensibilidade às polimixinas por distintas técnicas, para isolados de *Acinetobacter* spp.

Espécie	CIM (µg/mL)						
	Amostra	Diluição em Ágar Polimixina B	Diluição em Ágar Colistina	Microdiluição em Caldo Polimixina B	Microdiluição em Caldo Colistina	Etest Polimixina B	Etest Colistina
<i>Acinetobacter</i> spp.	70028	1	1	0,12	0,25	1	0,5
	70036	0,5	0,5	0,5	0,12	0,5	0,5
	5830	2	2	1	0,12	1	0,5
	3151	1	0,5	0,12	0,12	0,5	0,5
	4215	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5
	4947	0,5	0,5	0,25	0,12	0,5	0,5
	5433	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1
	5557	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5
	146098	2	2	0,5	0,25	0,5	0,5
	146054	8	8	4	4	8	8

Entre as nove amostras de *P. aeruginosa* testadas, todas foram sensíveis à polimixina B e à colistina pela técnica de microdiluição em caldo, apresentando os menores valores das CIMs entre 1 - 2 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente. Já pela técnica de ágar diluição, essas amostras tiveram CIMs para polimixina B e colistina entre 2 - 4 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, ou seja, uma diluição acima daquelas observadas pela técnica de microdiluição em caldo e para a metodologia Etest, as CIMs variaram entre 2 e 8 µg/mL para as duas drogas avaliadas, sendo então as maiores CIMs neste grupo de testes (Tabela 3).

Também não foi observada uma diferença significativa na atividade *in vitro* entre a colistina e a polimixina B contra as amostras de *P. aeruginosa* avaliadas, quando comparadas as técnicas diluição em ágar e microdiluição em caldo e entre as técnicas diluição em ágar e Etest, porém quando analisadas as técnicas diluição em ágar e Etest, foi possível observar diferenças maiores que duas diluições em um caso contra Polimixina B e dois casos contra Colistina.

**Tabela 3:** Teste de sensibilidade às polimixinas por diferentes técnicas dilucionais, para isolados de *P. aeruginosa*.

Espécie	Amostra	CIM (µg/mL)					
		Diluição em Ágar Polimixina B	Diluição em Ágar Colistina	Microdiluição em Caldo Polimixina B	Microdiluição em Caldo Colistina	Etest Polimixina B	Etest Colistina
<i>P. aeruginosa</i>	P1122	4	4	1	1	8	8
	P1276	4	4	2	1	4	4
	P1278	2	4	1	1	2	2
	P1319	4	4	2	1	4	4
	P1411	4	2	2	1	8	8
	P1673	4	4	1	1	4	2
	P1900	4	4	2	1	8	4
	P956	4	4	2	1	2	2
	1110	2	4	1	1	2	2

Ao contrário do observado para as amostras de *Acinetobacter* spp., não houve boa concordância entre as diferentes técnicas para predizer a sensibilidade às polimixinas entre as amostras de *P. aeruginosa*. Embora tenha havido 100% de concordância entre as técnicas de ágar diluição e Etest, quando foram consideradas aceitáveis diferenças nos valores de CIM  $\pm 1$  diluição  $\log_2$ , uma porcentagem inaceitável (44,4%) de erros leves foi encontrada testando-se polimixina B. Uma taxa superior a essa foi observada quando os valores da CIMs, obtidas para esse mesmo agente pelas técnicas de ágar diluição e microdiluição em caldo, foram encontradas (Tabela 4).

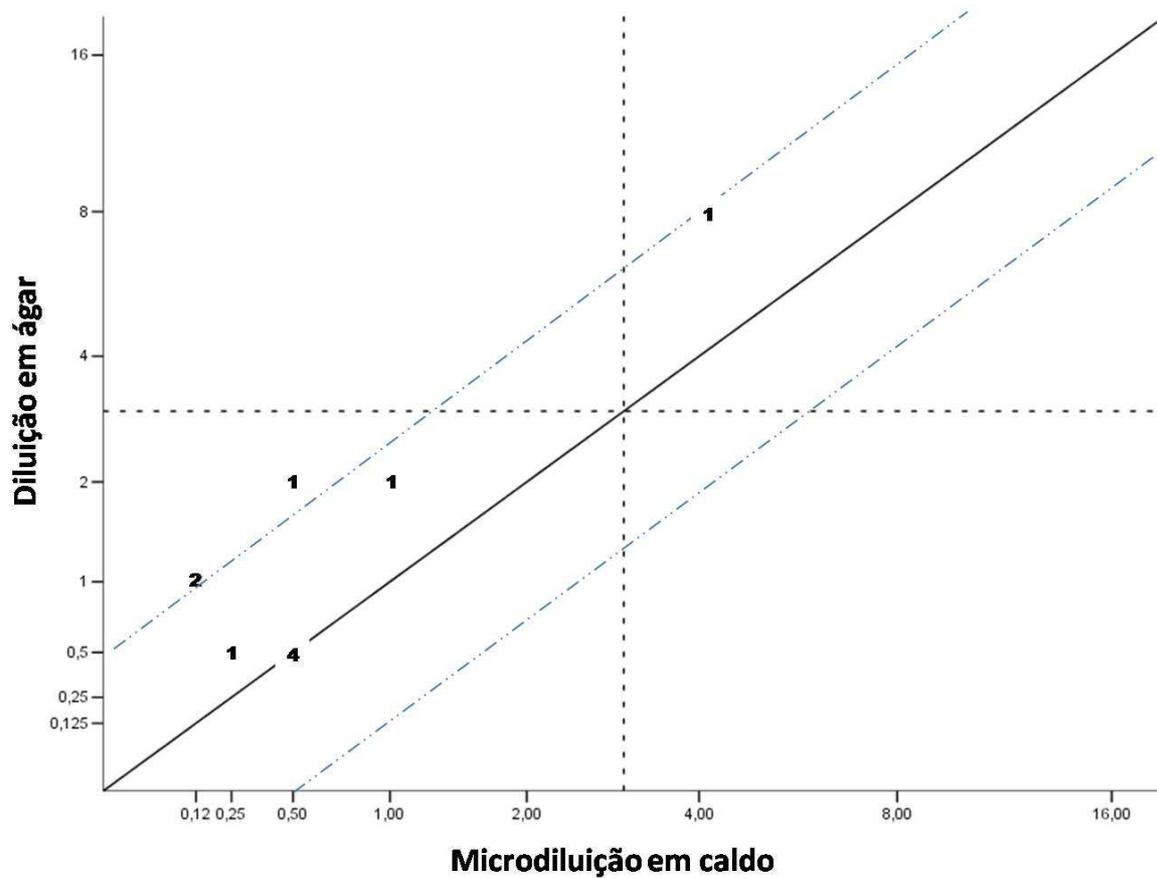
**Tabela 4:** Porcentagem de concordância entre as diferentes técnicas de sensibilidade na avaliação da sensibilidade às polimixinas entre amostras de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*.

Espécie	Concordância	Diluição em Ágar vs. Etest	Diluição em Ágar vs. Microdiluição em Caldo	Microdiluição em Caldo vs. Etest
<i>Acinetobacter</i> spp.	<b>Polimixina B</b>			
	Até $\pm 1$ dil. $\log_2$	90%	70%	80%
	Até $\pm 2$ dil. $\log_2$	100%	80%	90%
	Erros	0	0	0
	<b>Colistina</b>			
	Até $\pm 1$ dil. $\log_2$	90%	40%	50%
	Até $\pm 2$ dil. $\log_2$	100%	80%	90%
	Erros	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	<b>Polimixina B</b>			
	Até $\pm 1$ dil. $\log_2$	100%	77,8%	55,6%
	Até $\pm 2$ dil. $\log_2$	0	100 %	88,9%
	Erro leve	44,4%	77,7%	33,3%
	Erro grave	0	0	33,3%
	<b>Colistina</b>			
	Até $\pm 1$ dil. $\log_2$	88,9%;	11,1%	33,3%
	Até $\pm 2$ dil. $\log_2$	100%	100%	66,7%
	Erro leve	55,5%	88,9%	33,3%
	Erro grave	11,1%	0	33,3%

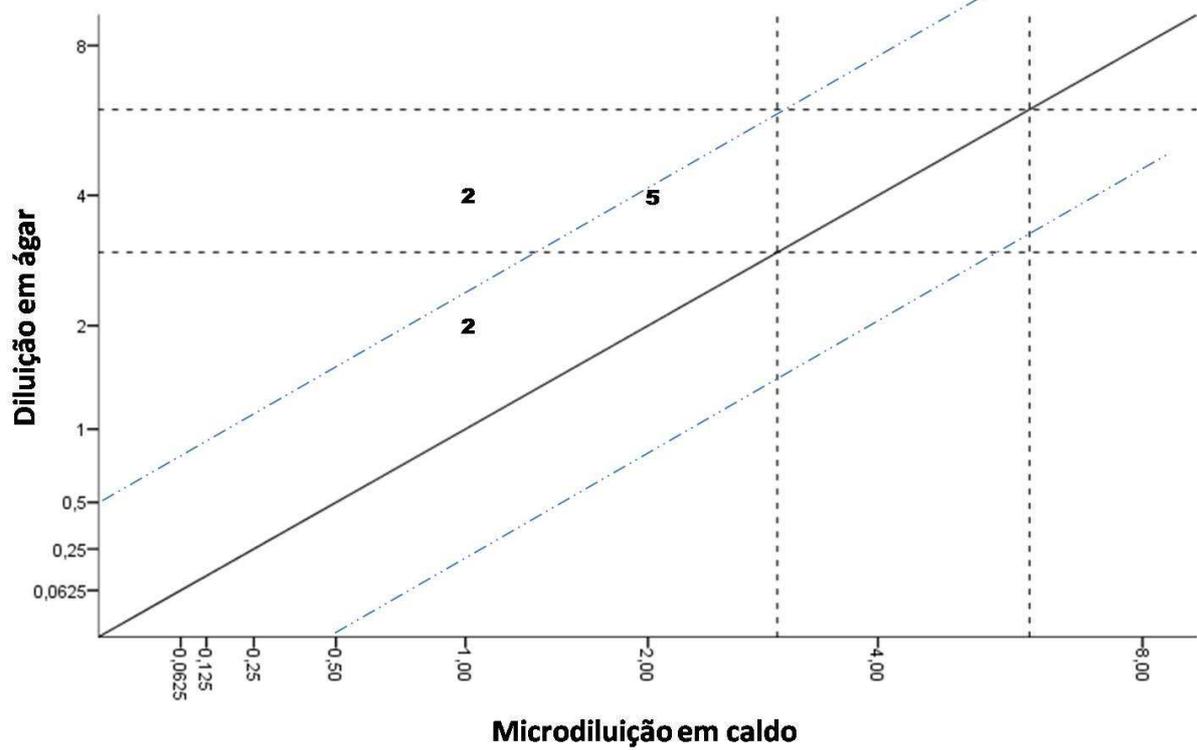
**5.3 Comparação dos resultados obtidos entre diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, para determinação de CIM de polimixinas.**

#### **5.3.1 Comparação entre Diluição em Ágar e Microdiluição em Caldo**

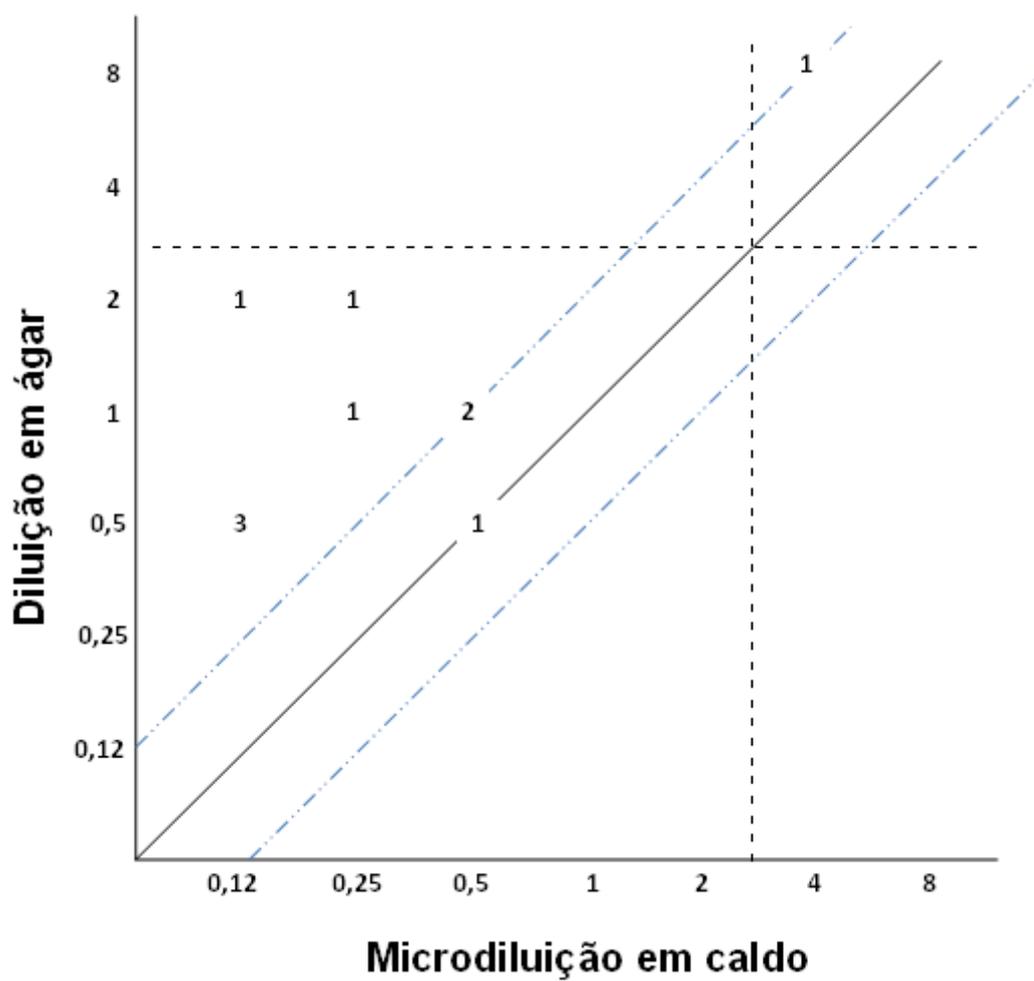
Os resultados obtidos por microdiluição em caldo para polimixina B tiveram 70% e 78% de concordância em relação à metodologia de diluição em ágar, para isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, respectivamente (Figuras 3 e 4). Entretanto, os mesmos testes realizados para colistina, geraram apenas 40% e 11% de concordância para isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, respectivamente. Foi observada uma tendência na obtenção de CIMs mais altas quando utilizada a técnica de diluição em ágar, em relação a microdiluição em caldo (Figuras 5 e 6).



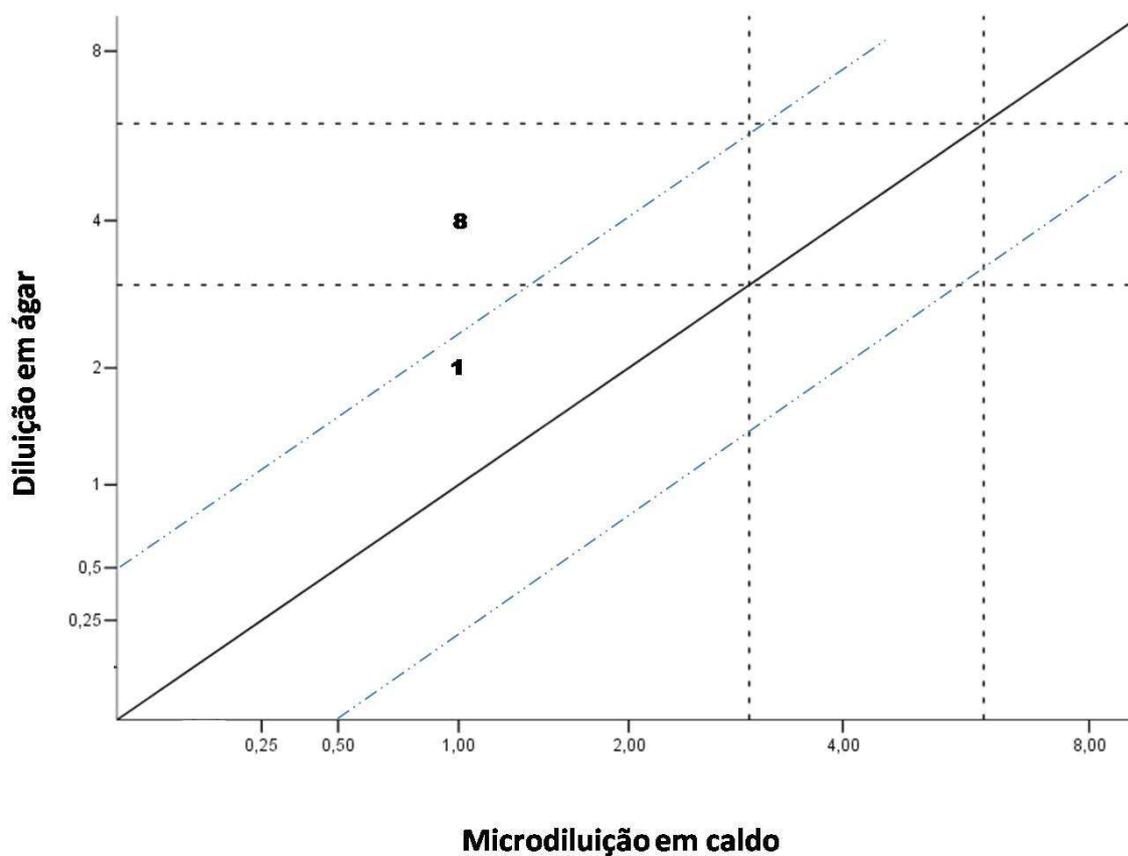
**Figura 3:** Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo de polimixina B, para isolados de *Acinetobacter* spp.



**Figura 4:** Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo de Polimixina B, para isolados de *P. aeruginosa*.



**Figura 5:** Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo de colistina para isolados de *Acinetobacter* spp.

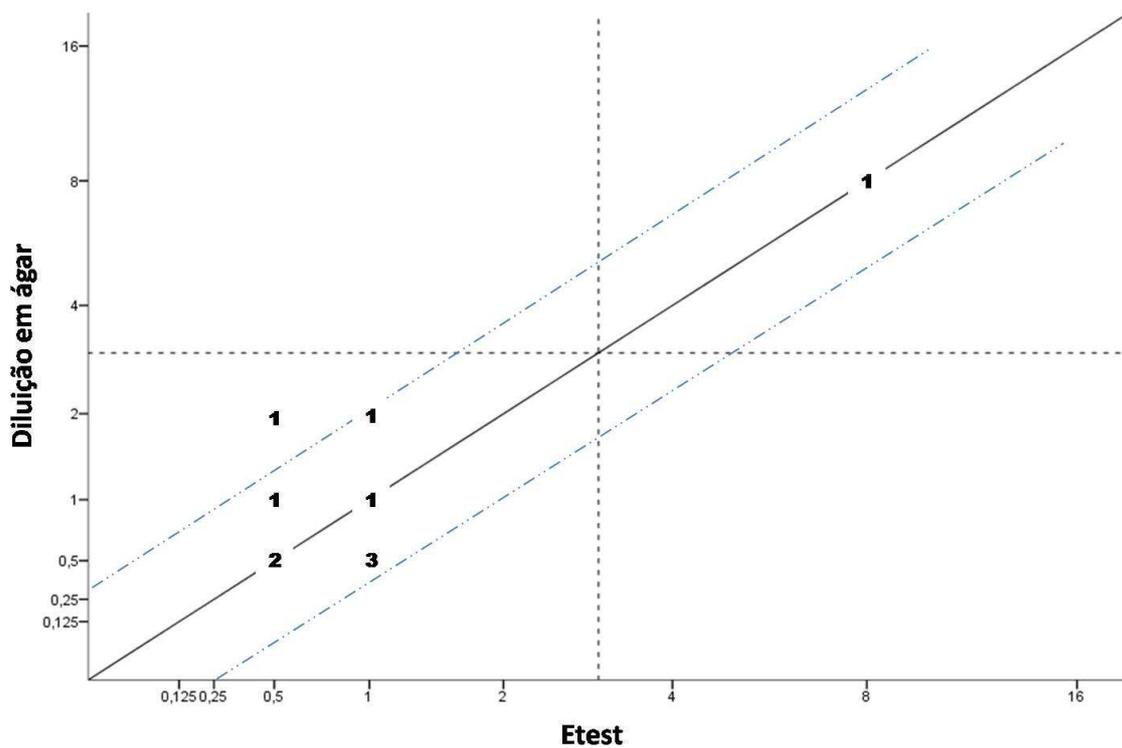


**Figura 6:** Comparação entre diluição em ágar e microdiluição em caldo para colistina com isolados de *P. aeruginosa*.

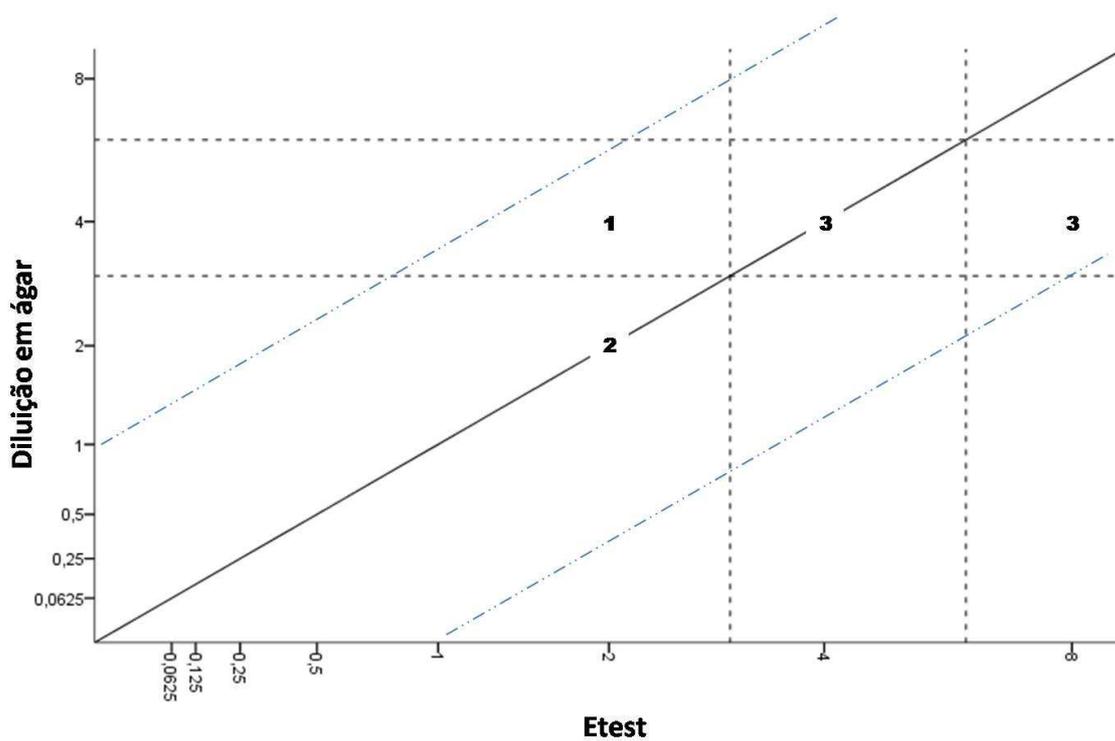
### 5.3.2 Comparação entre diluição em ágar e Etest

A metodologia de Etest obteve alta concordância nos resultados quando comparada com a metodologia de referência, diluição em ágar. Para os testes com polimixina B, foi observado 90% de concordância com isolados de *Acinetobacter* spp. e 100% de concordância com isolados de *P. aeruginosa* (Figuras 7 e 8).

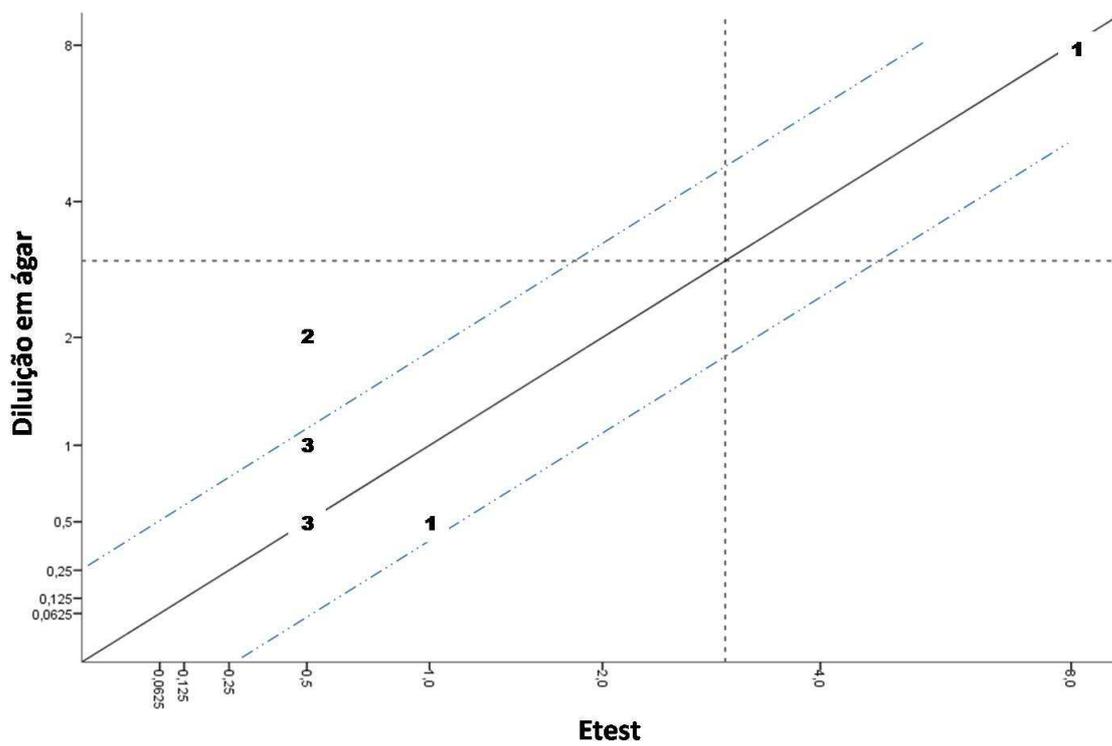
O Etest de colistina teve uma concordância de 80% e 88% com a metodologia de diluição em ágar, para isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, respectivamente (Figuras 9 e 10).



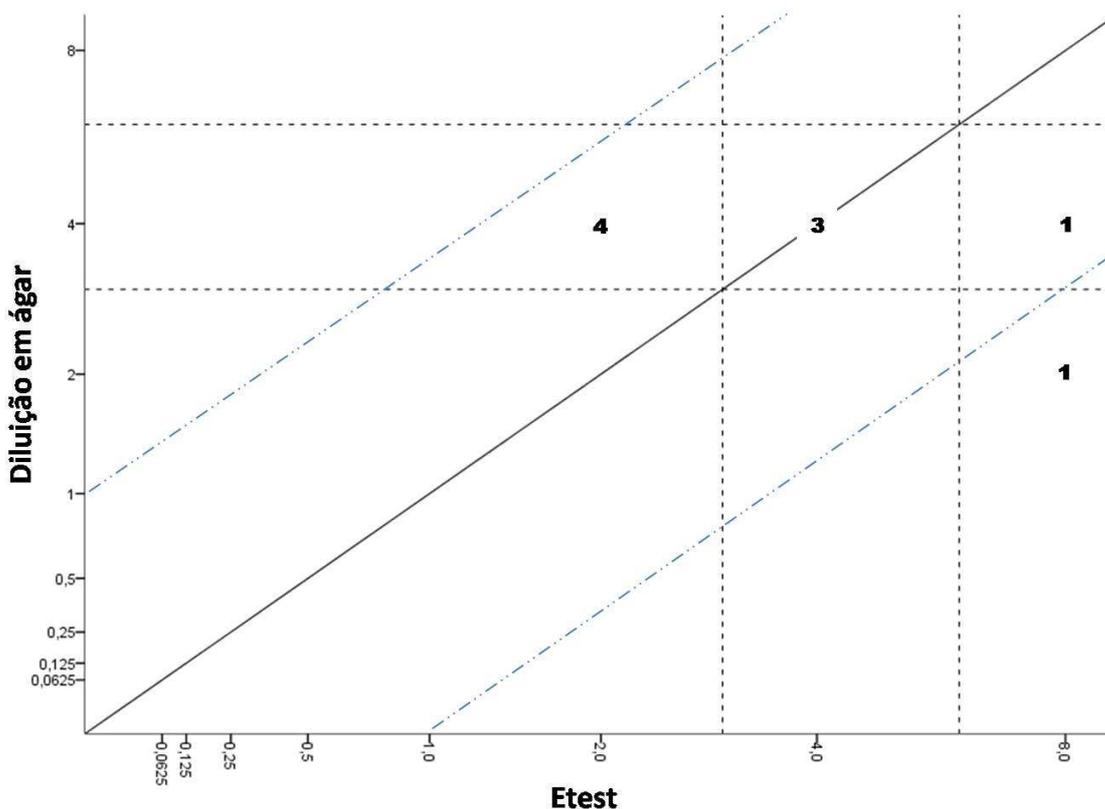
**Figura 7:** Comparação entre diluição em ágar e Etest para polimixina B com isolados de *Acinetobacter* spp.



**Figura 8:** Comparação entre diluição em ágar e Etest para polimixina B com isolados de *P. aeruginosa*.



**Figura 9:** Comparação entre diluição em ágar e Etest para colistina com isolados de *Acinetobacter* spp.

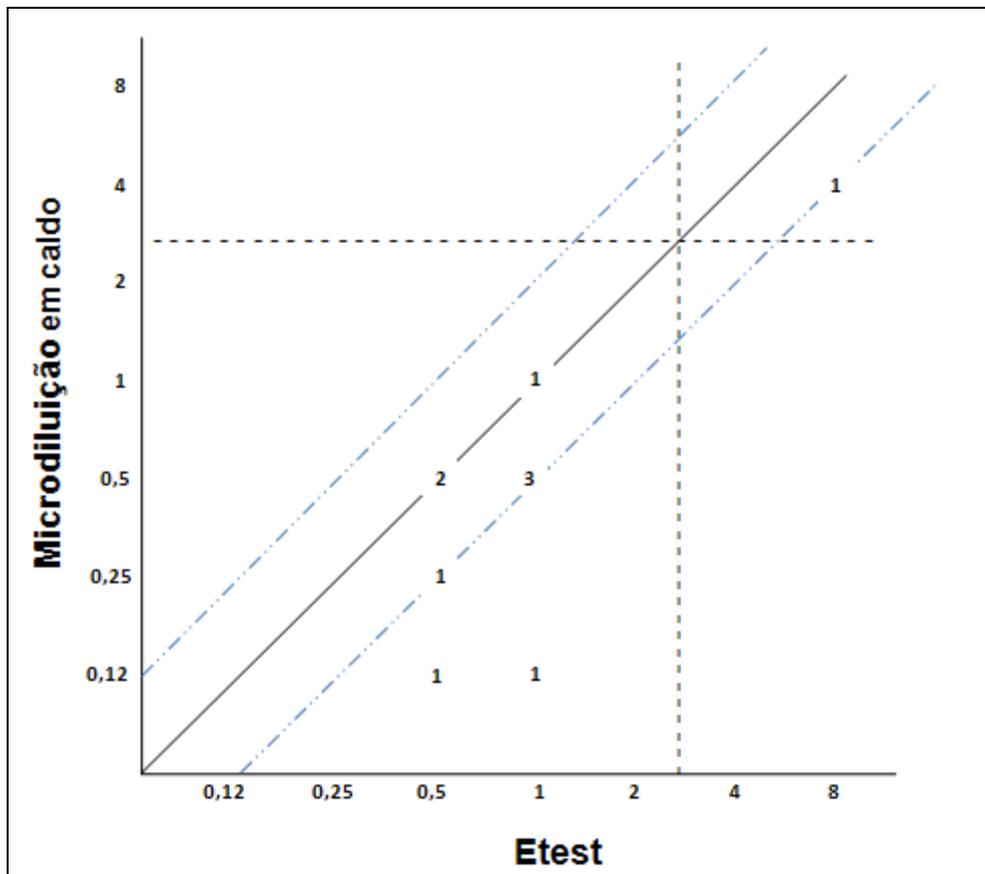


**Figura 10:** Comparação entre diluição em ágar e Etest para colistina com isolados de *P. aeruginosa*.

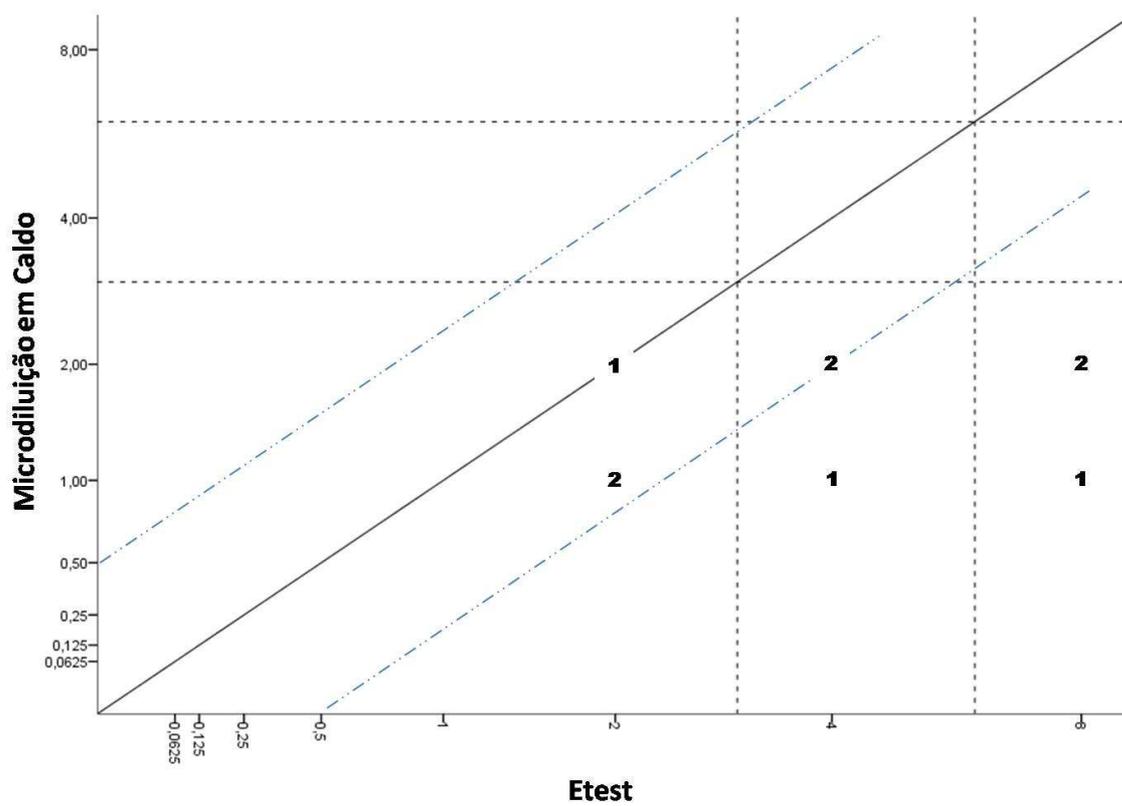
### 5.3.3 Comparação entre Microdiluição em Caldo e Etest

Os resultados de CIMs para polimixina B, obtidos pela metodologia de Etest concordaram em 80% com os obtidos pela metodologia de referência, microdiluição em caldo, para os isolados de *Acinetobacter* spp. e 55% para os isolados de *P. aeruginosa* (Figuras 11 e 12). Já para os resultados de Etest de colistina, em relação à microdiluição em caldo, foi observada uma concordância de 60% para os isolados de *Acinetobacter* spp. e 44% para os isolados de *P. aeruginosa* (Figuras 13 e 14). Foi observada uma tendência em obter CIMs mais

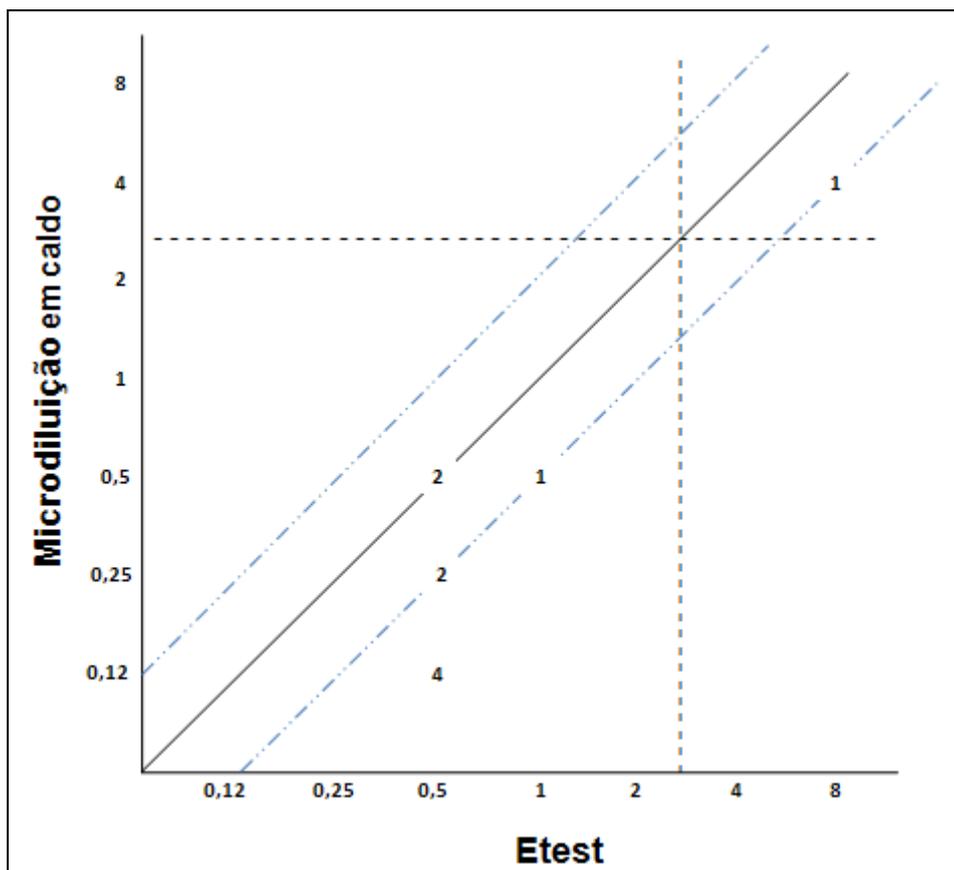
elevadas quando utilizada a técnica de Etest em relação à microdiluição em caldo, para ambos antimicrobianos testados.



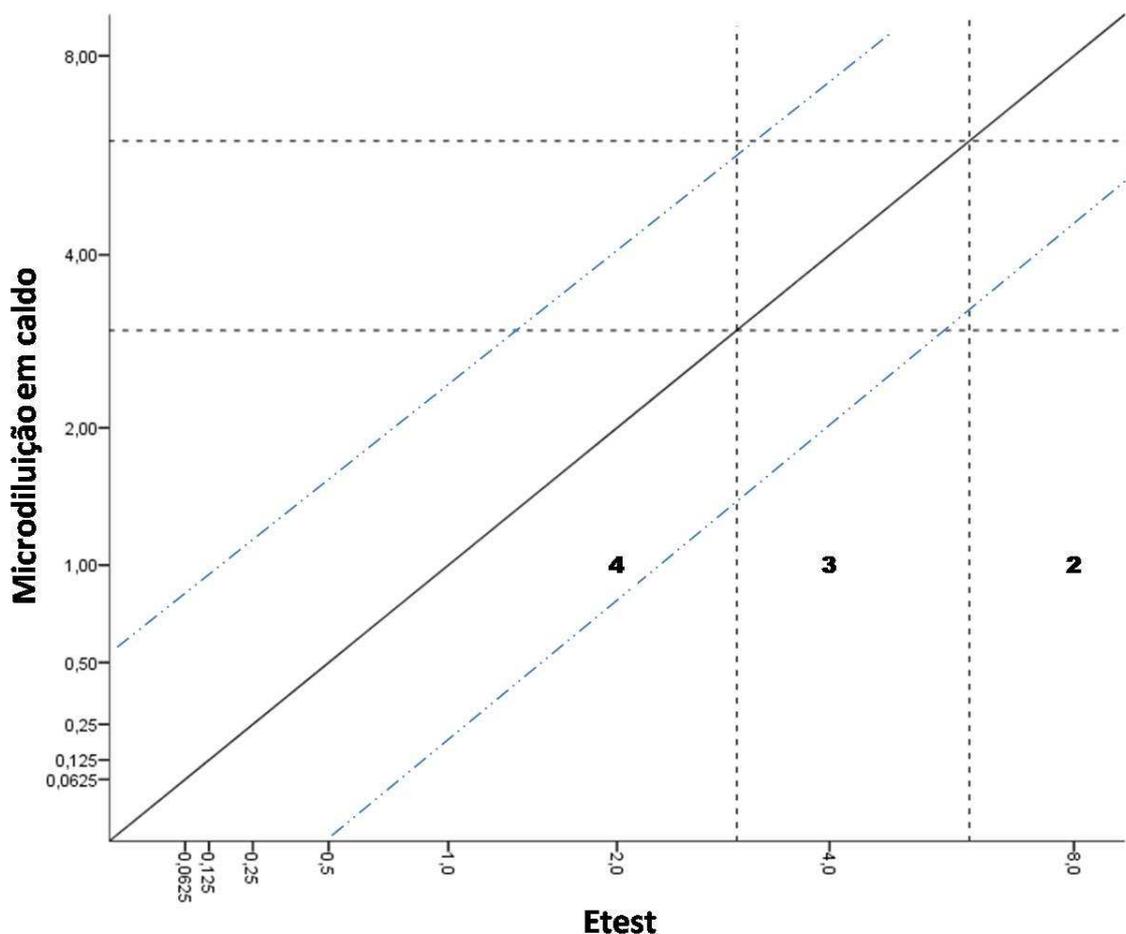
**Figura 11:** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para polimixina B com isolados de *Acinetobacter* spp.



**Figura 12:** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para polimixina B com isolados de *P. aeruginosa*.



**Figura 13:** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para colistina com isolados de *Acinetobacter* spp.



**Figura 14:** Comparação entre microdiluição em caldo e Etest para colistina com isolados de *P. aeruginosa*.

#### 5.4 Avaliação da influência de diferentes meios de cultura na determinação da sensibilidade às polimixinas.

Foram realizados testes de sensibilidade à polimixina B e colistina, para isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, conforme preconizado pelo CLSI, para as técnicas de diluição em ágar e microdiluição em caldo e, para Etest, segundo recomendações do fabricante. Para cada metodologia foram utilizados três diferentes meios de cultura: Müller Hinton, Iso-Sensitest e BHI. Nas metodologias baseadas em difusão do antimicrobiano em ágar (diluição em ágar

e Etest), o meio de cultura Iso-Sensitest apresentou 100% de concordância com os resultados das CIMs obtidos em ágar Müller-Hinton, entre os isolados de *Acinetobacter* spp, tanto para polimixina B quanto para colistina. Pela técnica de microdiluição em caldo, a concordância entre Iso-sensitest e Müller-Hinton foi de 90% e 60%, para polimixina B e colistina, respectivamente (Tabela 5).

Em geral, entre os isolados de *Acinetobacter* spp., utilizando o meio BHI, foram obtidas CIM mais baixas do que com o meio Mueller-Hinton, pelas três metodologias utilizadas (Tabela 5). Apesar disso, entre esses isolados não foram encontrados erros na determinação da categoria de sensibilidade, entre os diferentes meios de cultura, quando considerado como resultado concordante, uma diferença de  $\pm 1 \text{Log}_2$  de diluição.

Entre os isolados de *P. aeruginosa* foi observada uma menor concordância entre as CIMs, tanto com o meio Iso-sensitest quanto BHI (Tabela 5). Em alguns testes, foi obtida uma boa concordância entre a CIMs com diferentes meios de cultura, entretanto, ocorreram altas taxas de erros. Na comparação entre o meio Müller-Hinton e Iso-sensitest, por diluição em ágar, foi observado 77,8% de erro leve para polimixina B e 88,9% para colistina, onde amostras com resistência intermediária foram erroneamente consideradas sensíveis, quando utilizado os meios de cultura Iso-sensitest e BHI. Por meio da técnica de microdiluição em caldo para colistina houve 44,4% de casos de erro leve, entre os isolados de PSA. Para polimixina B, não foram observados casos de erro. A metodologia de Etest foi a que mais sofreu variação de resultados, entre os diferentes meios de cultura, entre os isolados de *P. aeruginosa*. Foi observada uma taxa de 44,4% de erro leve, tanto para polimixina B quanto para colistina. Além disso, por meio dessa metodologia, foram observadas taxas de 33,3% e 22,2% de erro grave, para

polimixina B e colistina, respectivamente. Nesses casos amostras resistentes aos antimicrobianos, foram consideradas sensíveis, quando utilizado os meios Iso-sensitest e BHI (Tabela 5).

**Tabela 5:** Testes de sensibilidade aos antimicrobianos por distintas técnicas, utilizando diferentes meios de cultura.

Microrganismo/Número da Amostra	DILUIÇÃO EM ÁGAR (CIM µg/mL)						MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CIM µg/mL)						Etest (CIM µg/mL)						
	Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina			
	MH <sup>a</sup>	ISO <sup>b</sup>	BHI <sup>c</sup>	MH	ISO	BHI	MH	ISSO	BHI	MH	ISO	BHI	MH	ISO	BHI	MH	ISO	BHI	
<i>Acinetobacter</i> spp.	70028	1	1	0,25	1	1	0,5	0,12	0,5	0,25	0,25	1	0,25	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25
	70036	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12	0,12	0,25	0,12	0,5	0,5	0,12	0,5	0,5	0,12
	5810	2	2	2	2	2	1	1	1	0,5	0,12	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
	A3151	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12	0,12	0,25	0,12	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25
	A4215	0,5	1	0,25	1	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	1	1	0,25	0,5	0,5	0,12
	A4947	0,5	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,12	0,06	0,12	0,25	0,06	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25
	A5433	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	1	0,5	0,25	1	0,5	0,5
	A5557	0,5	0,5	0,25	1	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,12	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25
	146098	2	1	0,5	2	2	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	
	146054	8	8	8	8	16	8	4	8	8	4	8	8	8	4	4	8	4	4
	Até ±1log <sub>2</sub> dil. <sup>d</sup>		100%	80%		100%	90%		90%	80%		60%	80%		100%	50%		100%	80%
	Até ±2log <sub>2</sub> dil. <sup>d</sup>		0	100%		0	100%		100%	100%		90%	100%		0	100%		0	100%
Erro leve		0			0			0			0			0			0		
Erro grave		0			0			0			0			0			0		
<i>P. aeruginosa</i>	P1122	4	2	2	4	2	1	1	1	2	1	1	0,5	8	8	1	8	8	1
	P1276	4	2	2	4	2	4	2	2	2	1	4	2	4	4	2	4	4	2
	P1278	2	2	2	4	2	2	1	2	1	1	1	0,5	2	2	1	2	2	0,5
	P1319	4	2	2	4	2	2	2	2	2	1	4	2	4	4	1	4	4	1
	P1411	4	2	2	2	2	2	2	2	2	1	4	2	8	4	1	8	4	1
	P1673	4	4	2	4	1	4	1	2	1	1	1	0,5	4	2	1	2	4	1
	P1900	4	1	2	4	1	2	2	2	2	1	4	2	8	8	1	4	8	1
	P956	4	4	2	4	1	2	2	2	2	1	1	0,5	2	2	0,5	2	2	0,5
	P1110	2	2	2	4	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1
	Até ±1log <sub>2</sub> dil. <sup>d</sup>		88,9%	100%		55,9%	88,9%		100%	100%		55,6%	100%		100%	44,4%		100%	22,2%
	Até ±2log <sub>2</sub> dil. <sup>d</sup>		100%	100%		100%	100%		0	0		100%	0		0	77,8%			
	Erro leve		77,8%			88,9%			0			44,4%			44,4%			44,4%	
Erro grave		0			0			0			0			33,3%			22,2%		

<sup>a</sup>MH: Müller-Hinton; <sup>b</sup>ISO: Iso-Sensitest; <sup>c</sup>BHI: Brain Heart Infusion; <sup>d</sup>Concordância em relação ao meio de cultura Müller-Hinton.

### **5.5 Avaliação da influência da concentração de cálcio no meio de cultura nos testes de sensibilidade às polimixinas.**

Os isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* foram submetidos a testes de sensibilidade pelas metodologias de diluição em ágar e microdiluição em caldo, conforme preconizado pelo CLSI e pela metodologia de Etest, segundo recomendações do fabricante. Os testes foram realizados em meios de cultura com concentrações de cálcio de 25µg/mL, 50µg/mL e 75µg/mL. Entre os isolados de *Acinetobacter* spp. não foram observados erros de categoria de sensibilidade entre as diferentes concentrações de cálcio no meio de cultura, nas três metodologias utilizadas. A metodologia de diluição em ágar, obteve melhor concordância entre as CIMs obtidas (100%), considerando  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição. (Tabela 6).

Entre os isolados de *P. aeruginosa*, utilizando a metodologia de diluição em ágar, foi observada boa concordância (100%) entre as CIMs obtidas com diferentes concentrações de cálcio no meio de cultura, quando considerado  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição. Entretanto, foi obtida uma taxa de 66,7% de erro menor, tanto para polimixina B quanto para colistina. Por meio da técnica de microdiluição em caldo, o aumento da concentração de cálcio para 75µg/mL provocou o aumento da CIM, o que promoveu a ocorrência de erro leve, onde uma amostra sensível à colistina foi considerada intermediária à mesma. Já pela metodologia de Etest, foram observadas taxas de 55,6% e 88,9% de erros leve para polimixina B e colistina, respectivamente. Além disso, por essa metodologia foi observada uma taxa de 11,1% de erro grave quando foi testada polimixina B. A concordância

entre as CIMs pela metodologia de Etest foi menor do que pelas outras metodologias, de 88,9% para ambos antimicrobianos (Tabela 6).

Em geral, foi observada uma discreta elevação da CIM proporcional ao aumento da concentração de cálcio no meio de cultura.

**Tabela 6:** Testes de sensibilidade por distintas técnicas dilucionais, com diferentes concentrações de cálcio no meio de cultura.

Microrganismo/Número da Amostra	DILUIÇÃO EM ÁGAR (CIM µg/mL)						MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CIM µg/mL)						Etest (CIM µg/mL)								
	Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina					
	Ca25	Ca50	Ca75	Ca25	Ca50	Ca75	Ca25	Ca50	Ca75	Ca25	Ca50	Ca75	Ca25	Ca50	Ca75	Ca25	Ca50	Ca75			
<i>Acinetobacter</i> spp.	70028	1	1	1	1	1	1	0,12	0,25	1	0,25	0,25	0,5	1	1	2	0,5	1	1		
	70036	0,5	1	1	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		
	5810	2	1	2	2	1	1	1	1	1	0,12	0,03	0,12	1	1	1	0,5	0,5	0,5		
	A3151	1	1	1	0,5	1	1	0,12	0,12	0,5	0,12	0,12	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		
	A4215	0,5	1	1	1	2	2	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5		
	A4947	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,12	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		
	A5433	0,5	0,5	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	2	1	2	2		
	A5557	0,5	1	1	1	1	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	0,5	0,5	1	0,5		
	146098	2	1	2	2	2	2	0,5	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1		
	146054	8	16	16	8	16	16	4	4	4	4	4	4	8	16	16	8	8	16		
	Até $\pm 1\log_2$ dil <sup>a</sup>	100%		100%		100%		100%		80%		90%		80%		100%		90%		100%	
	Até $\pm 2\log_2$ dil <sup>a</sup>	0		0		0		0		100%		100%		100%		0		100%		0	
	Erro leve	0			0			0			0			0			0				
Erro grave	0			0			0			0			0			0					
<i>P. aeruginosa</i>	P1122	4	8	8	4	8	8	1	2	4	1	2	4	8	8	16	8	8	16		
	P1276	4	4	8	4	8	8	2	2	2	1	2	4	4	8	16	4	8	16		
	P1278	2	4	4	4	4	8	1	2	2	1	2	2	2	8	8	2	4	8		
	P1319	4	4	8	4	8	8	2	2	2	1	2	4	4	8	16	4	8	16		
	P1411	4	4	4	2	4	8	2	2	2	1	2	4	8	8	16	8	4	16		
	P1673	4	4	4	4	4	4	1	2	2	1	2	2	4	4	16	2	4	8		
	P1900	4	4	8	4	8	8	2	2	2	1	2	4	8	16	16	4	16	16		
	P956	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	0,5	0,5	2	2	4	2	2	4		
	P1110	2	2	4	4	4	4	1	1	4	1	1	2	2	4	4	2	4	8		
	Até $\pm 1\log_2$ dil. <sup>a</sup>	100%		100%		100%		100%		88,9%		100%		100%		88,9%		88,9%		88,9%	
	Até $\pm 2\log_2$ dil <sup>a</sup>	0		0		0		0		100%		0		0		100%		100%		100%	
Erro leve	66,7%			66,7%			22,2%			55,6%			55,6%			88,9%					
Erro grave	0			0			0			0			11,1%			0					

<sup>a</sup>Concordância em relação aos resultados obtidos em meio de cultura contendo 50mg/L de solução de cálcio.

## 5.6 Avaliação da influência do tamanho do inóculo nos testes de sensibilidade às polimixinas.

Os isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* foram submetidos aos testes de sensibilidade por diluição em ágar e microdiluição em caldo, conforme preconizado pelo CLSI. Os testes foram realizados com inóculos em diferentes concentrações:  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ . Os resultados foram considerados categoricamente concordantes quando apresentaram uma variação de  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição entre os testes com tamanhos de inóculo diferentes.

Em geral, houve maior concordância para os testes com polimixina B do que com colistina, tanto utilizando a técnica de diluição em ágar quando microdiluição em caldo. Pela metodologia de diluição em ágar, para os isolados de *Acinetobacter* spp. houve discordância de CIMs somente nos testes com colistina (40%), quando a concentração do inóculo foi elevada a  $10^6$ . No entanto, por essa metodologia, foram observadas taxas de erro grave, de 10% e 30% para polimixina B e colistina, respectivamente. Utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, não foram observados erros de categoria de sensibilidade entre os isolados de *Acinetobacter* spp. (Tabela 7).

Entre os isolados de *P. aeruginosa* foram encontradas altas taxas de erro leve, de 33,3% para polimixina B e 66,6% para colistina, pela metodologia de diluição em ágar, apesar de haver concordância de 100% entre as CIMs obtidas. Pela metodologia de microdiluição em caldo, a taxa de erro leve foi menor (11,1%), e foi observada somente nos testes com colistina (Tabela 7).

**Tabela 7:** Testes de sensibilidade às polimixinas por diversas técnicas dilucionais, com diferentes concentrações do inóculo bacteriano comparadas ao padrão ouro  $10^5$

Microrganismo/Número da Amostra	DILUIÇÃO EM ÁGAR (CIM µg/mL)						MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CIM µg/mL)									
	Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina						
	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^4$	$10^5$	$10^6$				
<i>Acinetobacter</i> spp.	70028	1	1	2	1	1	1	0,12	0,12	0,12	0,06	0,25	0,25			
	70036	0,5	0,5	1	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12			
	5810	1	2	2	1	2	2	1	1	1	0,03	0,12	0,03			
	A3151	0,5	1	2	0,5	0,5	4	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12	0,25			
	A4215	0,5	0,5	1	1	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5			
	A4947	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12			
	A5433	0,5	0,5	1	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5			
	A5557	0,5	0,5	1	1	1	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5			
	146098	1	2	4	1	2	4	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5			
	146054	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4			
	Até $\pm 1 \log_2$ dil <sup>a</sup>	100%		100%		100%		60%		100%		100%		80%		90%
Até $\pm 2 \log_2$ dil <sup>a</sup>	0		0		0		90%		0		0		100%		100%	
Erro leve	0			0			0			0						
Erro grave	10%			30%			0			0						
<i>P. aeruginosa</i>	P1122	4	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1			
	P1276	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	1	1			
	P1278	2	2	4	2	4	4	1	1	1	0,5	1	1			
	P1319	4	4	4	2	4	4	2	2	2	1	1	1			
	P1411	2	4	4	2	2	4	2	2	2	1	1	1			
	P1673	4	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1			
	P1900	4	4	4	2	4	4	2	2	2	1	1	4			
	P956	2	4	4	2	4	4	2	2	2	0,25	1	1			
	P1110	2	2	2	2	4	4	0,5	1	0,5	1	1	1			
	Até $\pm 1 \log_2$ dil <sup>a</sup>	100%		100%		100%		100%		100%		88,9%		88,9%		
	Até $\pm 2 \log_2$ dil <sup>a</sup>	0		0		0		0		0		100%		100%		
Erro leve	33,3%			66,6%			0			11,1%						
Erro grave	0			0			0			0						

<sup>a</sup>Concordância em relação aos resultados obtidos com inóculo de  $10^5$

### **5.7 Avaliação de diferentes tempos de incubação para determinação da CIM, por diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest.**

Os isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* foram submetidos aos testes de sensibilidade pelas metodologias de diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest, para polimixina B e colistina, conforme preconizado pelo CLSI. Foram realizadas leituras com 18, 24 e 48 horas de incubação. Foram considerados resultados concordantes, quando houve uma variação de, no máximo,  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição, entre os diferentes tempos de incubação.

Para os isolados de *Acinetobacter* spp. o tempo de incubação não foi um fator que promoveu alteração nas CIMs, pelas três metodologias utilizadas neste estudo, para ambas polimixinas, considerando até  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição. Além disso, não foram observados erros de categoria de sensibilidade entre os três tempos de incubação (Tabela 8).

Entre os isolados de *P. aeruginosa* houve concordância de 100% entre todas as CIMs obtidas nos testes com diferentes tempos de incubação, pelas três metodologias utilizadas. No entanto, por meio da metodologia de diluição em ágar, foi observada uma taxa de 11,1% de erro leve, nos testes com colistina. Além disso, pela metodologia de Etest foram observadas taxas de 33,3% e 44,4% de erro leve, para polimixina B e colistina, respectivamente. A metodologia de microdiluição em caldo, não sofreu alteração nos resultados, quando a leitura foi realizada com diferentes tempos de incubação (Tabela 8).

**Tabela 8:** Testes de sensibilidade às polimixinas por distintas técnicas dilucionais, com leitura em diferentes tempos de incubação.

Microrganismo/Número da Amostra	DILUIÇÃO EM ÁGAR						MICRODILUIÇÃO EM CALDO						Etest						
	Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina			Polimixina B			Colistina			
	18h	24h	48h	18h	24h	48h	18h	24h	48h	18h	24h	48h	18h	24h	48h	18h	24h	48h	
<i>Acinetobacter</i> spp.	70028	1	1	1	1	1	1	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	1	2	2	0,5	0,5	0,5
	70036	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	5810	2	2	2	2	2	2	1	1	1	0,12	0,12	0,12	1	2	2	0,5	1	1
	A3151	1	1	1	0,5	0,5	1	0,12	0,12	0,12	0,12	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	A4215	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	2	2	0,5	0,5	0,5
	A4947	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	A5433	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	1	1	1	1	1	2	2
	A5557	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	2	0,5	1	1
	146098	2	2	2	2	2	2	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	1	1	0,5	0,5	1
	146054	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	8	16	16	8	16	16
	Até $\pm 1\log_2$ dil. <sup>a</sup>	100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	
	Até $\pm 2\log_2$ dil. <sup>a</sup>	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
	Erro leve	0			0			0			0			0			0		
Erro grave	0			0			0			0			0			0			
<i>P. aeruginosa</i>	P1122	4	4	4	4	4	8	1	1	1	1	1	1	8	8	8	8	8	8
	P1276	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	1	1	4	4	8	4	8	8
	P1278	2	2	2	4	4	4	1	1	1	1	1	1	2	4	8	2	4	4
	P1319	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	1	1	4	4	4	4	4	4
	P1411	4	4	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	8	8	8	8	8	8
	P1673	4	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1	4	4	4	2	2	4
	P1900	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	1	2	8	16	16	4	8	16
	P956	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	1	1	2	2	4	2	2	2
	P1110	2	2	2	4	4	4	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	Até $\pm 1\log_2$ dil. <sup>a</sup>	100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	
	Até $\pm 2\log_2$ dil. <sup>a</sup>	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
	Erro leve	0			11,1%			0			0			33,3%			44,4%		
	Erro grave	0			0			0			0			0			0		

<sup>a</sup>Concordância em relação aos resultados obtidos com 24 horas de incubação.

### **5.8 Testes de reprodutibilidade**

Os testes foram realizados em triplicata e foi observado 97,8% de concordância entre as CIMs, considerando uma variação de  $\pm 1\text{Log}_2$ . Esses dados estão de acordo com o Isenberg (2004), que define como aceitável para este tipo de teste concordância superior a 95%.

## 6. DISCUSSÃO

O uso das polimixinas tornou-se, novamente, muito comum em hospitais do mundo todo, devido ao surgimento de microrganismos, principalmente, isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, resistentes a maioria das opções terapêuticas existentes. O uso, cada vez mais freqüente, das polimixinas exige a padronização de testes de sensibilidade a esses antimicrobianos para utilização na rotina laboratorial. A acurácia dos resultados dos testes de sensibilidade a antimicrobianos fornecidos pelos laboratórios clínicos é uma grande preocupação dos serviços de microbiologia. A escolha da melhor metodologia, além de todos os aspectos que impactam na qualidade do resultado deve ser observada antes da liberação do laudo para o clínico.

Existem metodologias simples para determinar a sensibilidade aos antimicrobianos, como, por exemplo, a técnica de disco-difusão. Porém, essa técnica possui limitações, fazendo com que seja necessária a utilização de outros testes para confirmação do fenótipo de resistência. Técnicas dilucionais mais acuradas, como diluição em ágar e microdiluição em caldo, são recomendadas pelo CLSI para determinação da CIM. Entretanto, essas técnicas são laboriosas, tornando difícil estabelecer sua utilização na rotina laboratorial. A metodologia de Etest é uma técnica dilucional para determinação da CIM, mais fácil de realizar na rotina de laboratórios clínicos. No entanto, discordâncias entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias tem sido observada (Heijden *et al.*, 2007).

Ainda não existe consenso sobre a melhor técnica para o teste de sensibilidade às polimixinas (Tan & Ng, 2007). Observou-se, neste estudo, uma tendência em obter CIMs mais elevadas quando utilizada a técnica de diluição em

ágar em relação à microdiluição em caldo. Esse resultado já foi, anteriormente, relatado por outros autores (Gales *et al.*, 2001 e Hogardt *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos por Etest mostraram alta concordância entre as CIMs em relação à metodologia de referência diluição em ágar, tanto para isolados de *Acinetobacter* spp. quanto para *P. aeruginosa*, concordando com resultados obtidos em estudos anteriores (Nicodemo *et al.*, 2004; Tan & Ng, 2007; Goldstein *et al.*, 2007). Ainda assim, foram observados casos de erro leve e erro grave, entre os isolados de *P. aeruginosa*, os quais apresentaram CIM próximas aos pontos de corte. Dessa forma, a diferença de  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição levou a uma mudança de categoria de sensibilidade.

A comparação entre microdiluição em caldo e Etest mostrou uma tendência do Etest em superestimar a CIM, como já descrito em estudos publicados anteriormente (Arroyo *et al.*, 2005; Heijden *et al.*, 2007), levando à categorização errônea de isolados sensíveis à polimixina como resistente.

O Etest apresentou uma concordância maior com a técnica de diluição em ágar, do que com microdiluição em caldo. Esse resultado pode estar relacionado com a taxa de crescimento do microrganismo no meio de cultura, em relação à velocidade de difusão do antimicrobiano no meio sólido, podendo gerar resultados diferentes em comparação à metodologia realizada em meio de cultura líquido (Nicodemo *et al.*, 2004; Arroyo *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2007; Tan & Ng, 2007). Porém, o CLSI considera ambas as técnicas, em meio sólido (diluição em ágar) e líquido (microdiluição em caldo), aceitáveis como referência para testes de sensibilidade (CLSI, 2009). Além disso, a melhor concordância entre as técnicas de microdiluição em caldo e Etest se deve, provavelmente, ao pequeno número

de amostras testadas. Essa também deve ter sido a razão pela qual não foram detectados erros graves ou muito graves, já que somente uma das amostras foi resistente às polimixinas. O grande número de variáveis testadas neste estudo foi a causa da opção por um pequeno número de isolados utilizados para as análises.

Em geral, foi possível observar uma concordância maior entre as CIMs de polimixina B que aquelas de colistina, o que vem de encontro com resultados descritos por outros autores (Nicodemo *et al.*, 2004; Heijden *et al.*, 2007). Além disso, para todas as metodologias testadas houve uma variação de resultados maior entre os isolados de *P. aeruginosa* do que entre os isolados de *Acinetobacter* spp., assim como descrito em estudos publicados anteriormente, levando à categorização errônea de isolados sensíveis às polimixinas como resistentes (Tan & Ng, 2007; Goldstein *et al.*, 2007).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos para polimixinas foi especialmente problemático para isolados de *P. aeruginosa* porque as técnicas que apresentam boa correlação tiveram uma taxa de erro grave inaceitável, enquanto que a técnica que apresentou uma taxa de erro grave aceitável, não teve boa concordância com as outras técnicas. Diferenças de  $\pm 1 \text{ Log}_2$  de diluição nos valores da CIM determinadas pela mesma técnica de sensibilidade em ocasiões distintas, ou entre técnicas diferentes são consideradas aceitáveis e poderiam justificar os resultados observados. Para saber qual a técnica aceitável seria importante correlacionar estes resultados com a evolução clínica dos pacientes.

Qualquer que seja a metodologia de escolha para a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, é necessário que essa seja realizada criteriosamente, pois diversos fatores podem promover uma alteração no resultado final do teste, como o meio de cultura, concentração de cálcio, tamanho do inóculo e tempo de incubação (Hogardt *et al.*, 2004).

O CLSI e a BSAC preconizam o meio de cultura Müller-Hinton e o Iso-Sensitest, respectivamente, para a determinação da CIM pelas diferentes metodologias. Na literatura encontram-se relatos em que, diferentes marcas de meio de cultura ou, até mesmo diferentes lotes, da mesma marca, apresentam resultados discordantes nos testes de sensibilidade (Andrews *et al.*, 2002; Fernández-Mazarrasa *et al.*, 2009).

Com a finalidade de verificar possíveis alterações nos resultados dos testes de sensibilidade às polimixinas neste estudo, foram utilizados diferentes meios de cultura, como Müller-Hinton, Iso-Sensitest e BHI. Os meios de cultura Müller-Hinton e Iso-sensitest apresentaram excelente concordância (100%) na obtenção das CIMs quando utilizadas as metodologias baseadas em difusão do antimicrobiano em meio sólido. O mesmo não foi observado quando utilizada a metodologia de microdiluição em caldo, onde as taxas de concordância foram baixas (60% e 55,6%, para *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*), nos testes com colistina. Essa maior concordância deve ser explicada por uma particularidade dos testes, que são realizados em ágar, em relação aos testes realizados em caldo.

Em geral, foi possível observar, em nosso estudo, uma diminuição da CIM, sempre que testado no meio de cultura BHI, em relação aos meios Müller-Hinton e Iso-Sensitest. Até o momento, não foram encontrados na literatura relatos que

discutam a eficácia do meio BHI para determinação das CIMs de polimixinas. Em um estudo realizado em 1974, por Duncan *et al.*, foram observados resultados idênticos nos testes de sensibilidade à gentamicina, quando utilizados os meios de cultura Müller-Hinton e BHI, para isolados de *P. aeruginosa*. O CLSI indica o meio BHI para triagem de resistência a vancomicina por *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (Voss *et al.*, 2007; Lulitanond *et al.*, 2006; Kohner *et al.*, 1997). Neste estudo, a avaliação do BHI foi incluída com o intuito que este meio pudesse ser utilizado como um método de triagem para detecção de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* que apresentaram redução da sensibilidade às polimixinas. Nossos resultados sugerem que o meio BHI não seria um meio de cultura para realização de testes de sensibilidade às polimixinas, principalmente, quando a metodologia de escolha for Etest, no qual foram observadas maiores diferenças entre as CIMs, em relação ao meio recomendado pelo CLSI, Müller-Hinton.

A concentração de cátions na composição do meio de cultura também pode influenciar na determinação da CIM, em testes de sensibilidade. Os cátions cálcio e magnésio estão relacionados com o mecanismo de ação das polimixinas, interferindo na ligação desse antibiótico com a membrana celular, podendo alterar a atividade da droga (Storm *et al.*, 1977). Sendo assim, a concentração inadequada desses íons no meio de cultura pode levar a um erro de interpretação do teste de sensibilidade.

Estudos relatam que existem diferenças na concentração de cálcio e magnésio, conforme marca e lote do meio de cultura (D'Amato *et al.*, 1975; Kenny *et al.*, 1980; Fernandez-Mazarrasa *et al.*, 2009).

Neste estudo foi observado um aumento na CIM, proporcional ao aumento da concentração de cálcio. Ocorreram casos de erro leve pelas três metodologias utilizadas e para ambos antimicrobianos, entre os isolados de *P. aeruginosa*. A diminuição na atividade *in vitro* de diversos antimicrobianos, pela influência de íons, já foi relatada em estudos anteriores (D'Amato *et al.*, 1975; Christie *et al.*, 1982; Blaser e Lüthy, 1988; Fernandez-Mazarrasa *et al.*, 2009). Provavelmente, os íons interfiram no mecanismo de ação das polimixinas, que agem deslocando cálcio e magnésio, que são responsáveis por estabilizar as moléculas de LPS da membrana celular bacteriana.

Os resultados encontrados neste estudo mostram a importância em suplementar a concentração de cálcio no meio de cultura para a realização de testes de sensibilidade às polimixinas. Entretanto, as marcas comerciais de meio de cultura não disponibilizam a concentração de íons em cada lote, dificultando a suplementação correta do meio de cultura. Dessa maneira, os laboratórios de rotina devem ficar atentos aos resultados das cepas de controle de qualidade. Por exemplo, CIMs muito altas ou baixas para os aminoglicosídeos quando se testa a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ou tetraciclina para qualquer cepa ATCC é testada, podem indicar que a concentração de cálcio e magnésio está muito alta ou baixa no meio de cultura (CLSI, M100 –S19, 2009). A concentração de outros cátions como zinco e manganês provavelmente também interferem na avaliação da sensibilidade às polimixinas (Fernandez *et al.*, 2009), o controle de qualidade com a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 também pode indicar que a concentração de zinco no meio é alta quando CIMs mais altas que os limites esperados são observados para os carbapenens.

Assim como a escolha do melhor meio de cultura, cuidados na obtenção do inóculo bacteriano para realização do teste, também devem ser tomados para que a variação na quantidade de células bacterianas inoculadas não resulte em um erro de interpretação.

Em um estudo recente, foi observado um discreto aumento da CIM de carbapenens e um grande aumento da mesma de cefalosporinas, proporcional ao aumento do inóculo de *Haemophilus influenzae* (Miyazaki *et al.*, 2009). Esse efeito já vem sendo descrito há algumas décadas, com diferenças nos níveis de variação da CIM, conforme o antimicrobiano testado (Corrado *et al.*, 1980; Miyazaki *et al.*, 2009). Em geral, foi observada uma leve elevação da CIM, proporcional ao aumento da concentração do inóculo. Em 2005, Mizunaga *et al.* observaram que o aumento da concentração do inóculo de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, de  $10^5$  a  $10^8$  UFC/mL não teve efeito significativo para a determinação da CIM de carbapenens. Entretanto, em nosso estudo, a elevação das CIMs foi suficientes para promover a ocorrência de erro leve, entre os isolados de *P. aeruginosa*. A mudança em  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição é importante quando os isolados testados apresentam CIMs próximas aos pontos de corte, o que explica os erros encontrados neste estudo.

Outro fator que pode influenciar no resultado de testes de sensibilidade é o tempo de incubação. O CLSI preconiza diferentes tempos de incubação para determinação da CIM, conforme o microrganismo e antimicrobiano testado. Até 2005, o CLSI preconizava, para todos os bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, o mesmo tempo de incubação, entre 16 e 20 horas, para polimixina B e colistina (M100-S15, CLSI 2005). A partir de 2006, foi estabelecido um tempo de incubação diferente para testes com esse antibiótico,

para isolados de *Acinetobacter* spp., entre 20 e 24 horas, permanecendo o mesmo para isolados de *P. aeruginosa* (CLSI, 2006; CLSI, 2009).

A metodologia de Etest foi a que mais sofreu influência com a variação no tempo de incubação, neste estudo, onde foram observadas taxas de 33,3% e 44,4% de erro menor, com polimixina B e colistina, respectivamente, entre os isolados de *P. aeruginosa*. Hogdart *et al.*, em 2004 relataram a elevação da CIM, por microdiluição em caldo, com tempo de incubação prolongado até 48 horas. Somente foram observadas alterações nos resultados, com diferentes tempos de incubação, entre os isolados de *P. aeruginosa*. Esse fato, provavelmente, está relacionado com a velocidade de crescimento dessa espécie.

A metodologia utilizada para os testes de sensibilidade em um laboratório clínico deve ser escolhida criteriosamente para que os resultados sejam confiáveis e, conseqüentemente, o tratamento escolhido pelo clínico seja o correto. Cada metodologia possui diversas variáveis que podem interferir na interpretação dos resultados. Portanto, o profissional do laboratório precisa conhecer cada fator que interfere nos resultados obtidos pelas distintas técnicas de sensibilidade e estar principalmente atento ao controle de qualidade para que possam ser controlados e o resultado seja correto.

## 7. CONCLUSÕES

CIMs mais elevadas para as polimixinas foram observadas para as técnicas baseadas na difusão em ágar que àquelas baseadas na diluição em caldo.

Houve uma boa correlação entre as distintas técnicas de sensibilidade à polimixina B e colistina entre os isolados de *Acinetobacter* spp. Porém, entre os isolados de *P. aeruginosa* foi observada uma maior dificuldade em correlacionar os resultados obtidos por diferentes técnicas de sensibilidade.

Para todas as variáveis testadas neste estudo, houve uma melhor correlação entre os resultados obtidos nos testes com polimixina B do que com colistina, nas três metodologias utilizadas. Além disso, os testes realizados com os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram maior discordância.

Houve uma boa concordância (100%) entre os resultados obtidos com meio Iso-Sensitest e o meio Mueller-Hinton, pelas técnicas baseadas em difusão do antimicrobiano em ágar, entre os isolados de *Acinetobacter* spp. Já pela metodologia de microdiluição em caldo, a correlação dos resultados utilizando esses dois meios de cultura foi menor (90% e 60% para polimixina B e colistina, respectivamente).

Entre os isolados de *P. aeruginosa*, a metodologia de Etest foi a que mais sofreu variação de resultados, quando utilizados diferentes meios de cultura para realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

Utilizando o meio BHI, foram obtidas CIM mais baixas do que com o meio Mueller-Hinton, pelas três metodologias utilizadas.

Em geral, ocorreu um aumento em  $\pm 1\text{Log}_2$  de diluição de ambas polimixinas, tanto para *Acinetobacter* spp. quanto para *P. aeruginosa*, proporcional ao aumento da concentração de cálcio no meio de cultura.

Foi observada uma discreta elevação da CIM proporcional ao aumento da concentração de cálcio no meio de cultura. A metodologia de Etest foi a que sofreu maior influencia dessa variável.

A metodologia de diluição em ágar sofreu maior influencia do inóculo bacteriano do que a metodologia de microdiluição em caldo, com uma taxa de erros leve de 10% (polimixina B) e 30% (colistina), para *Acinetobacter* spp. e, 33,3% (polimixina B) e 66,6% (colistina), para *P. aeruginosa*.

O tempo de incubação promoveu a ocorrência de erros de interpretação somente entre os isolados de *P. aeruginosa*. Além disso, a metodologia de Etest foi a que apresentou maior variação na determinação das CIMs, com leitura em diferentes tempos de incubação. Já pela metodologia de microdiluição em caldo, não foi observada influencia dessa variável.

## 8. REFERÊNCIAS

Andrews, J.; Walker, R.; King, A. Evaluation of media available for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by BSAC methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 50:479-486.

Appleman, M. D.; Belzberg, H.; Citron, D. M.; Heseltine, P. N.; Yellin, A. E.; Murray, J.; Berne, T. V. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44:1035-1040.

Arroyo, L. A.; García-Curiel, A.; Pachón-Ibañez, M. E.; Llanos, A. C.; Ruiz, M.; Pachón, J.; Aznar, J. Reliability of the E-Test Methods for Detection of Colistin Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(2):903-905.

Arruda, E. A. G.; Marinho, I. S.; Boulos, M.; Sinto, S. I.; Caiaffa, H. H.; Mendes, C. M.; Oplustil, C. P.; Sader, H. S.; Levy, C. E.; Levin, C. E. Nosocomial Infections Caused by Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1999; 20:620-623.

Blaser, J.; Lüthy, R. Comparative study on antagonistic effects of low pH and cation supplementation on in-vitro activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. 1988; 22(1):15-22.

Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48:1-12.

Brodsky, I. E.; Ernst, R. K.; Miller, S. I.; Falkow, S. *mig-14* is a *Salmonella* gene that plays a role in bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Journal of Bacteriology*. 2002; 184(12):3203-3213.

Campos, M. A.; Vargas, M. A.; Regueiro, V.; Llompert, C. M.; Albertí, S.; Bengoechea, J. A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*. 2004; 72(12):7107-7114.

Casillas, E.; Kenny, M. A.; Minshew, B. H.; Shoenknecht, F. D. Effect of ionized calcium and soluble magnesium on the predictability of the performance of Mueller-Hinton Agar susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* with gentamicina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1981; 19(6):987-992.

Chen, X.; Dings, R. P. M.; Nesmelova, I.; Debbert, S.; Haseman, J. R.; Maxwell, J.; Hoye, T. R.; Mayo, K. H. Topomimetics of Amphipathic-Sheet and Helix-Forming Bactericidal Peptides Neutralize Lipopolysaccharide Endotoxins. *J. Med. Chem.* 2006; 49:7754-7765.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved

standard M7-A7 – Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2006a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Information Supplement Approved Standard M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2006b.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. Approved Standard M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2009.

Christe, M.; Vaudaux, P.; Waldvogel, F. A. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides: effect of free calcium and magnesium. *Schweiz Med Wochenschr.* 1982;112(7):234-241.

Corrado, M. L.; Landesman, S. H.; Cherubin, C. E. Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin, and N-formimidoyl thienamycin (MK0787) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1980; 18(6):893-896.

D'Amato, R. F.; Thornsberry, C.; Baker, C. N.; Kirven, L. A. Effect of Calcium and Magnesium Ions on the Susceptibility of *Pseudomonas* Species to Tetracycline,

Gentamicin, Polymyxin B and Carbenicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1975; 7(5):596-600.

Drabick, J.J.; Bhattacharjee, A. K.; Hoover, D. L.; Siber, G. E.; Morales, V. E.; Young, L. D.; Brown, S. L.; Cross, A. S. Covalent polymyxin B conjugate with human immunoglobulin G as an antiendotoxin reagent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42:583-588.

Duncan, I. Susceptibility of 1,500 Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin, Carbenicillin, Colistin and Polymyxin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1974; 5(1):9-15.

Fernandez-Mazarrasa, C.; Mazarrasa, O.; Calvo, J.; Del Arco, A.; Martínez-Martínez, L. High concentrations of manganese in Müller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *Journal Clinical Microbiology*. 2009; 47(3):827-9.

Galani, I.; Kontopidou, F.; Souli, M.; Rekatsina, P.D.; Koratzanis, E.; Deliolanis, J.; Giamarellou, H. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008; 31:434-439.

Gales, A. C.; Reis, A. O.; Jones, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal Clinical Microbiology*. 2001; 39:183-190.

Gales, A. C.; Jones, R. N.; Sader, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isolates of Gram negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clinical Microbiology Infection*. 2006; 12:315-321.

Garcia, I.; Fainstein, V.; LeBlanc, B.; Bodey, G. P. In vitro activities of new  $\beta$ -lactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1983; 24(2):297-299.

Goldstein, F. W.; Ly, A.; Kitzis, M. D. Comparison of Etest with agar dilution for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other multidrug-resistant bacteria to colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 59(5):1039-1040.

Gunn, J. S.; Lim, K. B.; Krueger, J.; Kim, K.; Guo, L.; Hackett, M.; Smiller, S. I. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular Microbiology*. 1998; 27(6):1171-1182.

Heijden, I. M. van der; Levin, A. S.; Pedri, E. H.; Fung, L.; Rossi, F.; Duboc, G.; Barone, A. A.; Costa, S. F. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenems-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2007; 6:1-8.

Hernandes SED, Mello AC, Sant'Ana JJ, Soares VS, Cassiolato V, Garcia LB, et al. The effectiveness of alcohol gel and others hand-cleansing agents against important nosocomial pathogens. *Braz J Microbiol* 2004; 35:33-9.

Hogardt, M.; Schmodt, S.; Götzfried, M.; Adler, K.; Heesemann, J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54:1057-1061.

Horton, J., Pankey, G. A. Polymyxin B, colistin and sodium colistimethate. *Med. Clin. Am.* 1982; 66:135-142.

Kenny, M. A.; Pollock, H. M.; Minshew, B. H.; Casillas, E.; Schoenknecht, F. D. Cation components of Müller-Hinton agar affecting testing of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to gentamicina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980; 17(1):55-62.

Koeth, L. M.; King, A.; Knight, H.; May, J.; Miller, L. A.; Phillips, I.; Poupard, J. A. Comparison of cation-adjusted Müller-Hinton broth with Iso-Sensitest broth for the NCCLS broth microdilution method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000; 46:369-376.

Levin, A.S.; Barone, A. A.; Penco, J.; Santos, M. V.; Marinho, I. S.; Arruda, E. A.; Manrique, E. I.; Costa, S. F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial

infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28:1008-1011.

Li, J.; Nation, R. L.; Owen, R. J.; Wong, S.; Spelman, D.; Franklin, C. Antibigrams of Multidrug-Resistant Clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising Therapeutic Options for Treatment of Infection with Colistin-Resistant Strains. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45:594-598.

Lo-Tem-Foem J. R.; Smet, A. M. G. A.; Diederer, B. M. W.; Kluytmans, J. A. J. W.; Keulen, P. H. J. Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51(10):3726-3730.

Loutet, S. A.; Flannagan, R. S.; Kooi, C.; Sokol, P. A.; Valvano, M. A. A complete lipopolysaccharide inner core oligosaccharide is required for resistance of *Burkholderia cenocepacia* to antimicrobial peptides and bacterial survival *in vivo*. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188(6):2073-2080.

Lulitanond, A.; Chanawong, A.; Sribenjalux, P.; Kaewkes, W.; Vorachit, M.; Chongtrakool, P.; Leumsai, D.; Monpou, P. Detection of heterogeneous, intermediate-vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (hVISA) using low-concentration vancomycin disks. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(4):761-767.

Mathur, J.; Waldor, M. K. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*. 2004; 72(6):3577-3583.

Milne, L. M.; Crow, M. R.; Emptage, A. G. M.; Selkon, J. B. Effects of culture media on detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci by disc diffusion methods. *Journal Clinical of Pathology*. 1993; 46:394-397.

Miyajima, Y.; Hiramatsu, K.; Mizukami, E.; Morinaga, R.; Ishii, H.; Shirai, R.; Kishi, K.; Tokimatsu, I.; Saikawa, T.; Kadota, J. In vitro and in vivo potency of polymixin B against IMP-type metallo-B-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008; 32:437-440.

Miyazaki, H.; Horii, T.; Nagura, O.; Suda, T.; Chida, K.; Nakamura, H. Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of B- Lactamase-Negative, Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae*. *Current Microbiology*. 2009; 58:18-24.

Mizunaga, S.; Kamiyama, T.; Fukuda, Y.; Takahata, M.; Mitsuyama, J. Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on *in vitro* activities and *in vivo* efficacy of fluorquinolones and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56:91-96.

Moskowitz, S. M.; Ernst, R. K.; Miller, S. I. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of Bacteriology*. 2004; 186(2):575-579.

Morohoshi, T.; Saito, T. Beta-Lactamase and Beta-Lactam antibiotics resistance in *Acinetobacter anitratum* (syn: *A. calcoaceticus*). *J. Antibiot (Tokio)*. 1977; 30(11):969-973.

Motti, E. F.; Amato Neto, V. Patterns of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli isolated from patients in intensive care units. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1992; 47(3):131-137.

Navon-Venezia, S.; Ben-Ami, R.; Carmeli, Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2005; 18:306-313.

Nicodemo, A. C.; Araujo, M. R. E.; Ruiz, A. S.; Gales, A. C. *In vitro* susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and Agar dilution methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 53(4):604-608.

Ouder Kirk, J. P.; Nord, J. A.; Turett, G. S.; Kislak, J. W. Polymyxin B Nephrotoxicity and Efficacy against Nosocomial Infections Caused by

Multiresistance Gram negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47(8):2659-2662.

Pollock, H. M.; Minshew, B. H.; Kenny, M. A.; Schoenknecht, F. D. Effect of Different Lots of Müller-Hinton Agar on the Interpretation of the Gentamicin Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1978; 14(3):360-367.

Sader, H. S.; Gales, A. C.; Pfaller, M. A.; Mendes, R. E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R. J. Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2001; 5(4):200-214.

Storm, D. R.; Rosenthal, K. S.; Swanson, P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem*. 1977; 46:723-763.

Tan, T. Y.; Ng, Yong, L. S. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 58:864-867.

Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal Clinical Microbiology*. 1995; 33(9):2233-2239.

Thamlikitkul, V.; Tiengrim, S. Effect of different Müller-Hinton agars on tigecycline disc diffusion susceptibility for *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 62(4):847-848.

Tran, A. X.; Whittimore, J. D.; Wyrick, P. B.; McGrath, S. C.; Cotter, R. J.; Trend, M. S. The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188(12):4531-4541.

Vaara, M.; Fox, J.; Loidl, G.; Siikanen, O.; Apajalahti, J.; Hansen, F.; Frimodt-Møller, N.; Nagai, J.; Takano, M.; Vaara, T. Novel Polymyxin Derivatives Carrying Only Three Positive Charges Are Effective Antibacterial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52(9):3229-3236.

Voss, A.; Mouton, J. W.; van Elzaker, E. P.; Hendrix, R. G.; Goessens, W.; Kluytmans, J. A.; Krabbe, P. F.; de Neeling, H. J.; Sloos, J. H.; Oztoprak, N.; Howe, R. A.; Walsh, T. R. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007; 24(6):9.

Walsh, T. R.; Bolmström, A.; Qwörnström, A.; Ho, P.; Wootton, M.; Howe, R. A.; MacGowan, A. P.; Diekema, D. Evaluation of current methods for detection of *Staphylococci* with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(7):2439-2444.

Winfield, M. D.; Groisman, E. A. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(49):17162-17167.

Winfield, M. D.; Latifi, T.; Groisman, E. A. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(15):14765-14772.

Young, M.L.; Bains, M.; Bell, A.; Hancock, R. W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 36:2566-2568.

Yau, W.; Owen, R. J.; Poudyal, A; Bell, J. M.; Turnidge, J. D.; Yu, H. H.; Nation, R. L.; Li, J. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Infection*. 2009; 58:138-144.

Zavascki, A. P.; Goldani, L. Z.; Li, J. L.; Nation, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60:1206 -1215.