

Universidade Paulista
Instituto de Ciências da Saúde
Curso de Biomedicina

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODO MANUAL E AUTOMATIZADO PARA
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM ISOLADOS DE
UROCULTURAS POTENCIALMENTE DISCREPANTES.**

Samuel Altheman¹, Adriana Taveira da Cruz Peres².

1. Acadêmico do 8º semestre do curso de Biomedicina da Universidade Paulista – campus Chácara Santo Antônio.
2. Docente e orientadora, do curso de Biomedicina da Universidade Paulista – campus Chácara Santo Antônio.

Autor de correspondência

Samuel Altheman, Rua Antônio Júlio dos Santos, 201, bairro Fazenda Morumbi, São Paulo.

(11) 95770-2328, samuelaltheman@hotmail.com.

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

Apresentado em 11/06/2018.

São Paulo

2018

RESUMO

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) configuram uma importante prática nos laboratórios de microbiologia. As metodologias aplicadas para realizar o teste orientam quanto a melhor escolha terapêutica e possibilitam monitorar a evolução dos mecanismos de resistência bacteriana, afim de evitar a disseminação de microrganismos multirresistentes. **Objetivo:** Este trabalho tem por objetivo comparar valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos pelo método automatizado Vitek 2 e por diluição em ágar, de bactérias Gram negativas isoladas de uroculturas positivas, que apresentaram resultados potencialmente discrepantes.

Materiais e métodos: Foram utilizadas cepas de bactérias gram negativas (19 *Escherichia coli* e 2 *Klebsiella pneumoniae*) do banco de cepas do laboratório Cura Imagem e diagnóstico provenientes de uroculturas positivas. Os antibióticos ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, meropenem, ertapenem, amicacina e gentamicina foram diluídos de forma seriadas em meio Muller Hinton em placas de Petri de 10 mm. As cepas foram inoculadas com o auxílio do inoculador de Steers e incubadas em estufa por 24h a 37°C. As mesmas cepas foram submetidas ao sistema Vitek2. Para validar os resultados obtidos, foram incluídas na amostragem cepas de ATCC para controle de qualidade. **Resultados:** Os valores de CIM de todas as ATCC estiveram dentro do limite estabelecido pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), portanto os resultados foram validados. De forma geral, quanto a CIM, houve correlação de aproximadamente 88,5% entre os dois métodos de todas as CIM analisadas. Quanto à classificação categórica houve compatibilidade de aproximadamente 93,2%. **Conclusão:** Houve alta compatibilidade entre as classificações categóricas dos antibióticos testados, no entanto, analisando os testes que apresentaram discrepância, podemos concluir que o método da diluição em ágar apresenta leve tendência à resistência para os antibióticos penicilínicos e cefalosporinas de 1ª geração e ligeira tendência à sensibilidade para aminoglicosídeos e cefalosporinas de 2ª geração.

Palavras chave: Concentração inibitória mínima, isolados discrepantes, β -lactâmicos

1. INTRODUÇÃO

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) configuram uma importante prática nos laboratórios de microbiologia. As metodologias aplicadas para realizar o teste orientam quanto a melhor escolha terapêutica e possibilitam monitorar a evolução dos mecanismos de resistência bacteriana afim de evitar a disseminação de microrganismos multirresistentes⁽¹⁾.

O tratamento das infecções é realizado pela administração de antibióticos, que são compostos químicos naturais ou sintéticos com capacidade bactericida, causando a morte do microrganismo, ou bacteriostática, causando inibição da proliferação bacteriana. Os antibióticos são apresentados em diversas classes. Dentre elas, podemos citar os aminoglicosídeos, as quinolonas, os β -lactâmicos entre outros. A classificação é feita de acordo com sua origem, biossíntese, mecanismo de ação, ação predominante e estrutura química ⁽²⁾.

Os aminoglicosídeos são carboidratos que contêm aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica⁽²⁾. Dentre os principais aminoglicosídeos podemos citar a estreptomicina, a gentamicina e a amicacina. Os aminoglicosídeos atuam na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo o processo de tradução e consequentemente impedindo a síntese proteica, conferindo efeito bactericida. Pela necessidade de oxigênio para penetrar no microrganismo alvo, os aminoglicosídeos possuem efetividade em bactérias aeróbias, e pela sua característica polar devem ser administrados por via intravenosa parenteral⁽³⁾.

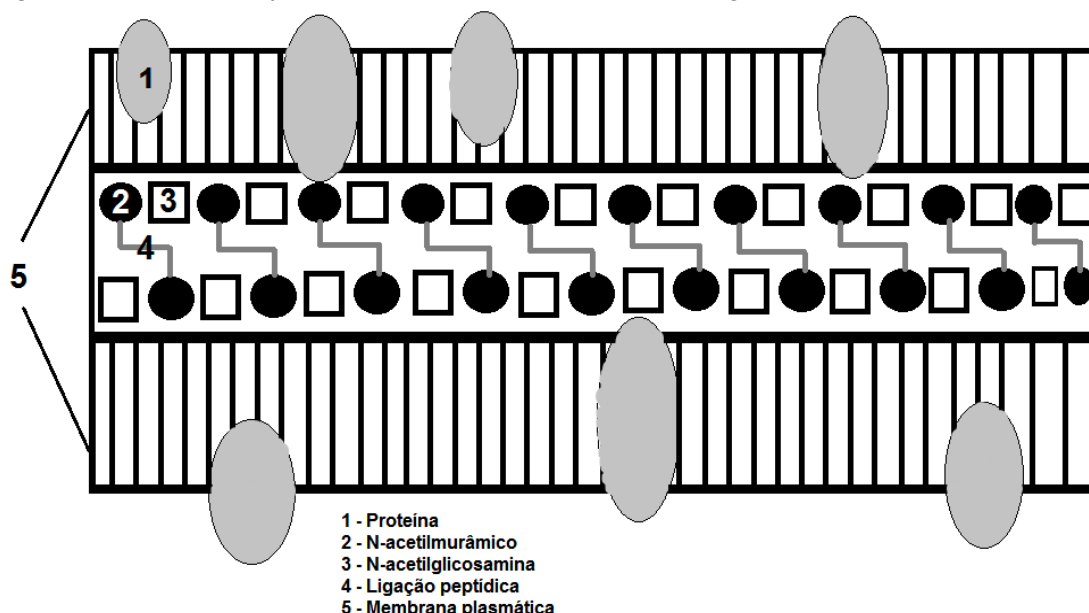
As quinolonas constituem o grupo de antibióticos derivados do ácido nalidixico, tendo a ciprofloxacina seu principal representante. As quinolonas atuam inibindo a enzima DNA girase das bactérias, impedindo o processo de duplicação do material genético, e consequentemente, a multiplicação bacteriana⁽⁴⁾.

Os antibióticos β -lactâmicos correspondem aos fármacos mais utilizados na conduta terapêutica de bactérias Gram negativas. São substâncias bactericidas que contêm um anel β -lactâmico em sua estrutura molecular, são representados pelas

penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactams, que atuam inibindo o processo de síntese da parede celular bacteriana.

A parede celular bacteriana é uma estrutura formada por camadas de peptídeoglicano composta por moléculas de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), e por uma porção peptídica, que liga as porções NAM das diferentes camadas⁽⁵⁾. Os β -lactâmicos, devido a morfologia do anel β -lactâmico, atuam na inibição irreversível da enzima transpeptidase, impedindo então que a porção peptídica da parede celular una as moléculas de NAM das camadas, o que resulta em uma parede instável, deixando a bactéria exposta a ação do sistema imunológico e suscetível a lise por osmose⁽²⁾.

Figura 1 - Estrutura da parede celular bacteriana em Gram negativos.



Moléculas de NAG e NAM ligadas entre si formando as camadas da parede, e a ligação peptídica unindo as moléculas de NAM das diferentes camadas. **Fonte:** Adaptado de Vieira *et al*⁽⁶⁾

1.1 Mecanismos de resistência bacteriana

Apesar da grande variabilidade de antibióticos com mecanismos de ação distintos, as bactérias podem apresentar ou desenvolver mecanismos de resistência. A resistência natural, ou intrínseca consiste em uma característica específica de determinados tipos de microrganismos, que, independentemente do contato prévio com algum antimicrobiano, já apresenta mecanismos para neutralizar a ação do fármaco⁽⁷⁾. Este tipo de resistência pode ocorrer devido a questões particulares

referentes à incompatibilidade morfológica entre a molécula do antibiótico e estruturas bacterianas, pela presença de genes codificantes de enzimas capazes de hidrolisar antimicrobianos, como, por exemplo, as espécies de *Klebsiella pneumoniae* que são naturalmente resistentes a ampicilina devido à codificação cromossômica da enzima β -lactamase SHV-1⁽⁷⁾, ou até mesmo pelo microrganismo não possuir determinada atividade metabólica ou estrutura que seria influenciada pelo antibiótico, como, por exemplo, as bactérias Gram positivas não são afetadas pela colistina, devido a ausência da membrana celular externa, apenas presentes em Gram negativos⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

Além da resistência natural, há a possibilidade de aquisição de alguns tipos de mecanismos de resistência, a exemplo de troca de plasmídeos, que permitem a produção de enzimas específicas que hidrolisam o antibiótico; a alteração da permeabilidade da membrana plasmática, onde há modificação dos canais de entrada, impedindo a entrada das moléculas de antimicrobianos no citoplasma bacteriano; bombas de efluxo, responsáveis pela expulsão de substâncias tóxicas ao microrganismo do seu interior⁽¹⁰⁾, e por fim, a alteração do sítio ativo, que resulta na queda de afinidade da molécula do antibiótico com o sítio alvo⁽⁸⁾.

A resistência adquirida representa grande preocupação para a saúde pública mundial⁽¹¹⁾. A utilização indiscriminada de antibióticos contribui para a adaptação e seleção natural de espécies de bactérias, tornando-as cada vez mais resistentes aos medicamentos disponíveis para a população⁽¹²⁾. Tanto em hospitais como nas comunidades, ocorrem adaptação e disseminação de microrganismos resistentes, influenciadas por fatores como cenário imunológico do paciente, mecanismo de ação do antimicrobiano, quantidade de bactérias no sítio da infecção, entre outros. Porém, nos hospitais, devido ao grande número de indivíduos infectados e em tratamento com antibióticos, ocorre a criação de um ambiente que induz os patógenos a adquirirem mecanismos de resistência⁽¹²⁾, e nos setores de terapia intensiva, o risco é ainda maior, devido a alta vulnerabilidade dos pacientes⁽¹³⁾.

1.1.1 β -lactamases e suas classificações

Em bactérias Gram negativas, a produção de enzimas representa a principal forma de resistência a antibióticos β -lactâmicos. Estes antimicrobianos são

amplamente utilizados na prática clínica no tratamento de infecções⁽¹⁴⁾. Existem 2 classificações gerais das enzimas β -lactamases, uma delas é proposta por Ambler e a outra por Bush e Jacoby⁽¹⁵⁾.

1.1.2 Classificação de Ambler

O esquema proposto por Ambler para classificar as β -lactamases é baseado na homologia da sequência de aminoácidos das enzimas. Este modelo possui quatro grupos, sendo eles A, B, C e D⁽¹⁵⁾.

Inicialmente, Ambler havia proposto apenas dois grupos para as β -lactamases, o grupo A, que continham as serina- β -lactamases e o grupo B, que continham as metalo- β -lactamases⁽¹⁶⁾. Posteriormente, foram descobertas novas serina- β -lactamases que não apresentavam muita semelhança com as enzimas previamente descobertas inseridas no grupo A, o que levou a criação da categoria C, que contém as enzimas conhecidas como AmpC⁽¹⁷⁾, e o grupo D, também conhecido como OXA β -lactamases, que contém resíduo de lisina carboxilado no sítio ativo da enzima⁽¹⁸⁾.

1.1.3 Classificação de Bush-Jacoby

A classificação de Bush-Jacoby é baseada nas propriedades das enzimas, nos seus substratos e na resposta aos inibidores. Neste modelo, as β -lactamases são divididas em 3 grandes grupos. O grupo 1 é representado pelas cefalosporinases, enzimas que tem maior afinidade em cefalosporinas e cefamicinas do que em penicilinas. No grupo 2 estão as serina- β -lactamases, que com 11 subgrupos, representam a maior categoria das β -lactamases, com características distintas quanto a classe de antibiótico em que atua e quanto a inibição ou não por ácido clavulânico e tazobactam. No grupo 3 estão as metalo-B-lactamases. Esta categoria se diferencia das demais basicamente pela capacidade de hidrolisar carbapenêmicos e por necessitarem de um íon zinco em seu sítio ativo⁽¹⁴⁾

Figura 2 – Classificação das β -lactamases

AMBLER	BUSH	SUBSTRATO
A	2 ^a	Penicilinas.
A	2b	Penicilinas e cefalosporinas primárias.
A	2be	Espectro estendido de cefalosporinas e monobactams.
A	2br	Penicilinas resistentes a ácido clavulânico e tazobactam.
A	2ber	Espectro estendido de cefalosporinas e monobactams resistentes a ácido clavulânico e tazobactam.
A	2c	Carbenicilinas.
A	2ce	Carbenicilinas e cefepimas.
A	2e	Espectro estendido de cefalosporinas com resistência variável a ácido clavulânico e tazobactam.
A	2f	Carbapenêmicos com resistência variável a ácido clavulânico e tazobactam.
B	3 ^a	Carbapenêmicos com amplo espectro de hidrólise, sem ação em monobactams.
B	3b	Preferencial hidrólise de Carbapenêmicos, resistentes a ácido clavulânico e tazobactam.
C	1	Cefalosporinas.
C	1e	Cefalosporinas, com aumento de hidrólise em ceftazidima e alguns oximino-B-lactâmicos.
D	2d	Cloxacilina.
D	2de	Espectro estendido de cefalosporinas, cloxacilina, oxacilina e oximino-b-lactâmicos.

Fonte: Adaptação de Bush, Jacoby.⁽¹⁴⁾

1.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos são de suma importância para o tratamento de infecções, permitindo avaliar a escolha do tratamento inicial ou se haverá a necessidade de ajuste terapêutico, a fim de conter a disseminação de microrganismos multirresistentes⁽¹⁾.

Para determinar a eficiência do antimicrobiano, é preciso determinar o valor da concentração inibitória mínima (CIM), que é definido como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano após incubação de 18-24 horas⁽¹⁹⁾. Existem diversos métodos para determinar a CIM de microrganismos, dentre os principais, podemos destacar a diluição em ágar, micro e macrodiluição em caldo, sendo que este último é considerado o padrão ouro para determinação de CIM⁽²⁰⁾.

A diluição em ágar consiste na preparação de diluições seriadas de agentes antimicrobianos no meio de cultura, e após a inoculação das amostras, a placa contendo a menor concentração de antibiótico que não apresentar crescimento visível determinará a concentração inibitória mínima do microrganismo. Os intervalos das concentrações devem definir as classificações categóricas sensível, intermediário e resistente⁽²¹⁾.

Em alternativa a diluição em ágar, existem os métodos de diluição em caldo: a macrodiluição em caldo, que consiste em preparar diluições com concentrações crescente de antibióticos em tubos de ensaio contendo caldo para cultura, e após incubação de 24 horas, é avaliada pela turbidez dos tubos em qual concentração foi o limite para o crescimento bacteriano e, a partir desta informação, determinar a CIM; a microdiluição em caldo, consiste na miniaturização do método anterior, utilizando placas com 96 poços com fundo em “U” ao invés de tubos de ensaios, mostrando-se um teste mais econômico e prático por utilizar menores quantidades de antibióticos e meio de cultura⁽²²⁾.

Com o objetivo de otimizar os testes de suscetibilidade a antimicrobianos, a indústria de equipamentos diagnósticos desenvolveram metodologias

automatizadas, como por exemplo, o sistema Vitek 2, fabricado pela empresa bioMérieux⁽²³⁾. O sistema Vitek 2 utiliza testes bioquímicos para identificação e determina a CIM aplicando algoritmos à cinética de crescimento, monitorada pelo próprio sistema⁽²⁴⁾.

2. JUSTIFICATIVA

Durante a rotina de antibiogramas do laboratório Cura (realizada por automação), foram identificados alguns resultados potencialmente discrepantes, em que alguns isolados apresentavam um perfil de sensibilidade total aos β -lactâmicos, mas se mostravam resistentes ou com resistência intermediária à cefalotina (cefalosporina 1ª geração). Pelo fato destes isolados serem sensíveis a antibióticos de classe mais fraca, como a ampicilina, a resistência isolada à cefalotina alertou para uma possível discrepância dos resultados emitidos pelo equipamento.

3. OBJETIVO

O objetivo deste experimento foi determinar a concentração inibitória mínima de alguns antibióticos por uma metodologia manual, e então comparar o valor destas concentrações com o método automatizado, e verificar se são equivalentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada a diluição em ágar dos antibióticos ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, meropenem, ertapenem, amicacina e gentamicina, em meio Muller Hinton, dispensados em placas de Petri de 10 mm. As concentrações das diluições de cada antimicrobiano foram definidas baseadas nas classificações categóricas estabelecidas pela *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) para enterobactérias.

Figura 3 – Antibióticos e concentrações utilizadas.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)
Ampicilina	1 – 64
Cefalotina	1 – 64
Ceftriaxona	0,5 – 64
Ertapenem	0,25 – 32

Meropenem	0,25 – 16
Gentamicina	0,25 – 16
Amicacina	0,25 – 32

Os isolados foram obtidos do banco de cepas do laboratório Cura Imagem e Diagnóstico, em que 21 cepas de enterobactérias, sendo 19 *Escherichia coli* e 2 *Klebsiella pneumoniae* provenientes de uroculturas positivas, foram submetidas a diluição em ágar e a metodologia Vitek2. Para cada antibiótico testado, foram incluídas 2 linhagens da ATCC para a validação dos resultados. As linhagens ATCC foram escolhidas de acordo com o ponto de corte mais adequado e seguro para a manipulação dos volumes de antibióticos.

Figura 4 – Linhagens da ATCC utilizadas para cada antibiótico testado

ANTIBIÓTICO	ATCC
Ampicilina	25922 e 35218
Cefalotina	25922 e 29212
Ceftriaxona	29213 e 27853
Ertapenem	27853 e 29212
Meropenem	29212 em duplicata
Gentamicina	25922 e 27853
Amicacina	25922 e 27853

Os isolados foram inoculados com o auxílio do inoculador de Steers e incubados em estufa durante 24 horas a 37°C.

5. RESULTADOS

Após a incubação de 24 horas, os valores de CIM para todas as linhagens da ATCC estiveram dentro do intervalo estabelecido pela CLSI, validando os resultados desta pesquisa. Analisando de forma geral, em relação a CIM, 130 testes tiveram 100% de compatibilidade, não ultrapassando diferença de 1log de diluição, e 17 apresentaram discrepâncias.

Figura 5 – Resultados do controle de qualidade realizado com as linhagens da ATCC

ATCC	Ampicilina (CLSI b.p)	Cefalotina (CLSI b.p)	Ceftriaxona (CLSI b.p)	Ertapenem (CLSI b.p)	Meropenem (CLSI b.p)	Gentamicina (CLSI b.p)	Amicacina (CLSI b.p)
25922	8 (2-8)	16 (4-16)				1(0,5-1)	4(0,5-4)
35218	>64 (>=32)						
29212		16(8-32)		8(4-16)	2 (2-8)		
29213			4(1-8)				
27853			64(8-64)	8(2-8)		1(0,5-2)	4(1-4)

Em relação a classificação categórica, 137 testes apresentaram resultados compatíveis entre as duas metodologias e 10 apresentaram discrepâncias.

Os testes com a ampicilina mostraram compatibilidade de aproximadamente 90,4% em relação a CIM, em que apenas as amostras número 2 e 19 apresentaram concentrações inibitórias acima de 1log diferença. Já de acordo com a classificação categórica, a compatibilidade dos resultados foi de aproximadamente 95,2%, no qual a única discrepância foi com a amostra número 12, que de acordo com a interpretação da diluição em ágar, possui resistência intermediária, e de acordo com o Vitek2, possui sensibilidade. Apesar desta diferença, a CIM não ultrapassou 1log de diluição.

Figura 6 – Resultados dos testes realizados com ampicilina

AMOSTRA	AMPICILINA			
	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM VITEK2 (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO (CLSI)	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
1	4	<=2	Sensível	Sensível
2	8	<=2	Sensível	Sensível
3	>64	>=32	Resistente	Resistente
4	4	4	Sensível	Sensível
5	>64	>=32	Resistente	Resistente
6	>64	>=32	Resistente	Resistente
7	>64	>=32	Resistente	Resistente
8	>64	>=32	Resistente	Resistente
9	>64	>=32	Resistente	Resistente
10	>64	>=32	Resistente	Resistente
11	8	4	Sensível	Sensível
12	16	8	Intermediário	Sensível
13	8	4	Sensível	Sensível
14	8	4	Sensível	Sensível

15	>64	>=32	Resistente	Resistente
16	8	4	Sensível	Sensível
17	8	4	Sensível	Sensível
18	8	4	Sensível	Sensível
19	8	<=2	Sensível	Sensível
20	>64	>=32	Resistente	Resistente
21	8	8	Sensível	Sensível

Breakpoints CLSI: <=8 Sensível ; 16 intermediário ; >=32 resistente

As CIMs obtidas para a cefalotina mostraram-se 100% compatíveis, em que nenhuma das 21 amostras apresentaram concentrações superiores a 1log de diluição. Já em relação a classificação categórica, os resultados se correlacionaram em aproximadamente 80,9% das amostras, nas quais as amostras 1, 11, 12 mostraram-se resistentes, segundo a diluição em ágar, e resistência intermediária segundo o Vitek2. A amostra número 6 mostrou-se sensível segundo a diluição em ágar e intermediário segundo o Vitek2.

Figura 7 – Resultados dos testes realizados com cefalotina

AMOSTRA	CEFALOTINA			
	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM VITEK2 (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
1	32	16	Resistente	Intermediário
2	32	32	Resistente	Resistente
3	16	16	Intermediário	Intermediário
4	16	16	Intermediário	Intermediário
5	16	16	Intermediário	Intermediário
6	8	16	Sensível	Intermediário
7	64	32	Resistente	Resistente
8	>=64	>=64	Resistente	Resistente
9	>64	>=64	Resistente	Resistente
10	>64	>=64	Resistente	Resistente
11	32	16	Resistente	Intermediário
12	32	16	Resistente	Intermediário
13	16	16	Intermediário	Intermediário
14	16	16	Intermediário	Intermediário
15	>64	>=64	Resistente	Resistente
16	16	16	Intermediário	Intermediário
17	16	16	Intermediário	Intermediário
18	16	16	Intermediário	Intermediário
19	32	32	Resistente	Resistente
20	>64	>=64	Resistente	Resistente
21	16	16	Intermediário	Intermediário

Breakpoints CLSI: <=8 sensível ; 16 intermediário ; >=32 resistente

Para os testes realizados com a ceftriaxona, houve compatibilidade de aproximadamente 90,4% em relação a CIM, em que apenas as amostras 10 e 20

ultrapassaram 1log de discrepância. Em relação a classificação categórica, apenas a amostra 20 mostrou-se sensível, segundo a diluição em ágar, e intermediário segundo o Vitek2, indicando compatibilidade de aproximadamente 95,2%.

Figura 8 – Resultados dos testes realizados com ceftriaxona.

AMOSTRA	CEFTRIAXONA			
	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM VITEK2 (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
1	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
2	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
3	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
4	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
5	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
6	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
7	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
8	>64	>=64	Resistente	Resistente
9	32	16	Resistente	Resistente
10	32	8	Resistente	Resistente
11	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
12	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
13	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
14	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
15	32	>=64	Resistente	Resistente
16	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
17	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
18	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
19	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível
20	<=0.5	2	Sensível	Intermediário
21	<=0.5	<=1	Sensível	Sensível

Breakpoints CLSI: <=1 sensível ; 2 intermediário ; >=4 resistente

Com os carbapenêmicos ertapenem e meropenem, a compatibilidade das CIMs foi de aproximadamente 90,4% e 80,9% respectivamente, e 90,4% e 95,2% para a classificação categórica. O maior índice de incompatibilidade de CIM entre os β-lactâmicos testados foi do meropenem, nas quais 4 amostras ultrapassaram 1log de diferença.

Figura 9 – Resultados dos testes realizados com ertapenem

ERTAPENEM				
AMOSTRA	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM VITEK2 (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO (CLSI)	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
1	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
2	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
3	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
4	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
5	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
6	<=0.25	4*	Sensível	Resistente
7	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
8	8	>=8	Resistente	Resistente
9	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
10	4	2	Resistente	Resistente
11	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
12	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
13	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
14	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
15	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
16	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
17	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
18	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
19	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível
20	2	<=0.5*	Resistente	Sensível
21	<=0.25	<=0.5	Sensível	Sensível

Breakpoints CLSI: <1 sensível ; 1 intermediário ; >=2 resistente

Figura 10 – Resultados dos testes realizados com meropenem

MEROPENEM				
AMOSTRA	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO (CLSI)	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
		VITEK2 (µg/mL)		
1	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
2	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
3	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
4	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
5	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
6	<=0.25	4	Sensível	Sensível
7	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
8	<=0.25	>=16	Sensível	Resistente
9	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
10	4	>=16	Resistente	Resistente
11	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
12	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
13	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
14	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
15	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
16	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
17	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
18	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
19	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível
20	4	>=16	Resistente	Resistente
21	<=0.25	<=0.25	Sensível	Sensível

Breakpoints CLSI: <=1 sensível ; 2 intermediário ; >=4 resistente

Entre os aminoglicosídeos gentamicina e amicacina, houve compatibilidade de aproximadamente 95,2% e 71,4%, respectivamente, para a CIM. Para a classificação categórica, o teste com a gentamicina teve apenas uma amostra que ultrapassou 1 log de diferença. Nos testes com a amicacina, apesar da CIM mostrar o maior índice de incompatibilidade entre os métodos, a classificação categórica se mostrou 100% compatível, em que todas as 21 amostras foram sensíveis nas 2 metodologias.

Figura 11 – Resultados dos testes realizados com gentamicina

AMOSTRA	GENTAMICINA			
	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM VITEK2 (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO (CLSI)	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
1	1	<=1	Sensível	Sensível
2	1	<=1	Sensível	Sensível
3	>16	>=16	Resistente	Resistente
4	2	<=1	Sensível	Sensível
5	>16	>=16	Resistente	Resistente
6	0.5	8	Sensível	Intermediário
7	2	<=1	Sensível	Sensível
8	0.5	<=1	Sensível	Sensível
9	2	<=1	Sensível	Sensível
10	1	<=1	Sensível	Sensível
11	1	<=1	Sensível	Sensível
12	1	<=1	Sensível	Sensível
13	1	<=1	Sensível	Sensível
14	2	<=1	Sensível	Sensível
15	2	<=1	Sensível	Sensível
16	1	<=1	Sensível	Sensível
17	1	<=1	Sensível	Sensível
18	1	<=1	Sensível	Sensível
19	2	2	Sensível	Sensível
20	2	2	Sensível	Sensível
21	1	<=1	Sensível	Sensível

Breakpoints CLSI <=4 sensível ; 8 intermediário ; >=16 resistente

Figura 12 – Resultados dos testes realizados com amicacina.

AMOSTRA	AMICACINA			
	CIM DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	CIM VITEK2 (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO DILUIÇÃO (CLSI)	INTERPRETAÇÃO VITEK 2
1	4	<=2	Sensível	Sensível
2	4	<=2	Sensível	Sensível
3	4	<=2	Sensível	Sensível
4	4	4	Sensível	Sensível
5	4	<=2	Sensível	Sensível
6	1	16	Sensível	Sensível
7	4	<=2	Sensível	Sensível
8	1	16	Sensível	Sensível

9	4	<=2	Sensível	Sensível
10	8	<=2	Sensível	Sensível
11	4	<=2	Sensível	Sensível
12	4	<=2	Sensível	Sensível
13	4	<=2	Sensível	Sensível
14	8	<=2	Sensível	Sensível
15	4	<=2	Sensível	Sensível
16	2	<=2	Sensível	Sensível
17	8	<=2	Sensível	Sensível
18	4	<=2	Sensível	Sensível
19	8	4	Sensível	Sensível
20	8	4	Sensível	Sensível
21	8	<=2	Sensível	Sensível

Breakpoints CLSI: <=16 sensível ; 32 intermediário ; >=64 resistente

6. DISCUSSÃO

Analisando os dados obtidos entre as metodologias aplicadas, nota-se que alguns isolados apresentaram resistência (plena ou intermediária) isolada a cefalotina dentre os β -lactâmicos. Este fato chama a atenção para um possível mecanismo de resistência alternativo à produção enzimática, já que as cefalosporinases também possuem capacidade de hidrolisar penicilinas.

A resistência à cefalotina em bacilos Gram negativos é descrita com relativa frequência em casos clínicos⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾, no entanto, nestes casos, é notada também a resistência aos penicilínicos⁽²⁷⁾, o que não ocorreu com alguns dos isolados desta pesquisa. Farrar e Krause descreveram um estudo sobre a relação entre as enzimas β -lactamases e a resistência à cefalotina em enterobactérias, sugerindo que esta resistência deve estar atrelada a fatores de permeabilidade de membrana e parede celular⁽²⁷⁾. Outra pesquisa realizada por Zhang e colaboradores pela faculdade de medicina da universidade de Toronto investigou a suscetibilidade à cefalosporinas de amostras de *Escherichia coli*, pelo método automatizado BD Phoenix e por microdiluição em caldo, em que também foram observados isolados com o seguinte perfil de resistência: sensível a ampicilina e a cefazolina (cefalosporina de 1ª geração) e resistente ou intermediário à cefalotina⁽²⁸⁾. Os resultados obtidos por Zhang e colaboradores pela comparação de metodologias confirmam a existência de espécimes com resistência isolada à cefalotina, e que a razão deste perfil de

suscetibilidade ainda é desconhecido, uma vez que não foi evidenciado a presença de cefalosporinases incapazes de inativar a ampicilina⁽²⁸⁾.

Outra função do sistema Vitek2 é a identificação da produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Espinar e colaboradores realizaram um estudo onde compararam o sistema Vitek2 com 2 métodos automatizados (Phoenix BD e MicroScan WalkAway) e 2 métodos manuais (Etest e disco-difusão) para identificar a produção ESBL e concluíram que o sistema Vitek2 tende a reportar maior número de ESBL positivo em relação às outras metodologias, necessitando de testes confirmatórios nestes casos⁽²⁹⁾. Em contraponto, analisando os valores de CIM obtidos neste trabalho pela diluição em ágar, as duas metodologias empregadas mostraram resultados equivalentes na identificação de cepas produtoras de betalactamases de espectro estendido, onde as amostras 9, 10 e 15 apresentaram resistência a ampicilina e cefalosporinas de 1ª e 3ª geração tanto no método manual quanto no automatizado. A amostra número 8 (*Klebsiella pneumoniae*), apesar de amplo espectro de resistência aos β -lactâmicos (confirmada pelas 2 metodologias), foi classificada como ESBL negativa pelo Vitek2. Este resultado não necessariamente indica uma discrepância do equipamento, já que este perfil de resistência pode estar associado à produção de cápsula, perda de porinas e permeabilidade da membrana plasmática⁽³⁰⁾.

Quanto aos carbapenêmicos, existem trabalhos publicados constatando algumas limitações na detecção de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias pelo sistema Vitek2. Lee e Chung testaram a resistência ao ertapenem de 72 enterobactérias pelos métodos MicroScan, Etest, disco-difusão, microdiluição em caldo e Vitek2, onde este último apontou resistência para todas as amostras. Após a determinação das CIM, constatou-se que apenas 20 das 72 amostras eram resistentes ao ertapenem, sugerindo a realização de testes confirmatórios adicionais quando identificada resistência ao ertapenem pelo Vitek2.⁽³¹⁾ Vading e colaboradores investigaram a produção de carbapenemases em 51 cepas de *Klebsiella pneumoniae* pelos métodos Etest, disco-difusão e Vitek2, onde 4 das 51 cepas apresentaram falha na determinação da resistência aos carbapenêmicos pelo sistema Vitek2⁽³²⁾. Neste trabalho foram identificadas 3 amostras (6, 8, 20) discrepantes em relação à classificação categórica dos

carbapenêmicos testados (amostras 6 e 20 discrepantes com ertapenem e amostra 20 com meropenem), sugerindo ligeira tendência do Vitek2 à liberar resultados resistentes em testes com carbapenêmicos.

Em relação aos aminoglicosídeos, constatou-se a existência de duas cepas (3 e 5) resistentes a gentamicina e sensíveis a amicacina confirmada pelas duas metodologias empregadas. Por serem antibióticos da mesma classe, esperava-se que a interpretação categórica dos mesmos fossem iguais, no entanto existe uma diferença estrutural entre as moléculas destes dois aminoglicosídeos que impossibilita a inativação da amicacina pelas mesmas enzimas que inativam a gentamicina. Deste modo, existe uma larga proporção de bactérias gram negativas resistentes a gentamicina e sensíveis a amicacina^(33,34).

7. CONCLUSÕES

Ao término das análises, de maneira geral, a comparação de métodos foi satisfatória e teve bons índices de correlação entre si, tanto para a CIM quanto para a classificação categórica. No entanto, analisando os testes que apresentaram discrepância, podemos concluir que o método da diluição em ágar apresenta leve tendência à resistência para os antibióticos penicilínicos, cefalosporinas de 1ª geração, e ligeira tendência à sensibilidade para aminoglicosídeos, cefalosporinas de 2ª geração e carbapenêmicos, este último apresentou discreta tendência à resistência pelo Vitek2. Tanto o Vitek2 quanto a diluição em ágar mostraram resultados compatíveis na identificação de isolados produtores de β -lactamase de espectro estendido.

Analisando os resultados obtidos com os antibióticos β -lactâmicos, evidenciou-se a resistência ou suscetibilidade intermediária apenas à cefalotina das amostras 1, 2, 4, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, indicando que há um mecanismo de resistência específico contra cefalosporinas de 1ª geração em enterobactérias, necessitando realização de testes específicos para a identificação deste mecanismo, pois de acordo com a classificação Ambler-Bush das β -lactamases, não são descritas enzimas cefalosporinases incapazes de hidrolisar penicilínicos. No entanto, para a conduta clínica destes casos, não se recomenda a administração de penicilínicos para evitar uma possível resistência por indução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barenfanger J, Drake C KG. Clinical and financial benefits of bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1415–8.
2. Guimarães DO, Da Silva Momesso L, Pupo MT. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova.* 2010;33(3):667–79.
3. Oliveira FP, Cipullo P, Burdmann E a. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2006;21(4):444–52.
4. Machado JDAC, Oliveira AC De, Antônio NDS, Canesini R, Rocha JR, Negri D De. Quinolonas: Revisão de Literatura. *Rev Científica Eletrônica Med Veterinária* [Internet]. 2009;12:1–5. Available from: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/lKP7kWV7C8yy91N_2013-6-21-12-13-23.pdf
5. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1999;63(1):174–229. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Vieira DA de P, Fernandes NC de AQ. *Microbiologia Geral*. © Inst Fed Educ Ciência e Tecnol Goiás Este. 2012;1–100.
7. Cabral AB. Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos β -lactâmicos de última geração provenientes de Recife-PE Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos β -. 2011;
8. Baptista MGDfM. *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*. Diss Mestrado, Lisboa, Univ Lusófona Humanidades e Tecnol Fac Ciências e Tecnol da Saúde [Internet]. 2013;51. Available from: [http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos de Resistência aos Antibióticos Maria Galvão Ba.pdf?sequence=1](http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos_de_Resistencia_aos_Antibioticos_Maria_Galvao_Ba.pdf?sequence=1)
9. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the

- management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333–41.
10. Riverón FF, Hernández JL, Martínez LMP, Betarte CM. Resistencia bacteriana. *Rev Bras Med*. 2000;57(10):1129–40.
 11. Caumo K, Duarte M, Cargnin ST, Ribeiro VB, Tasca T, Macedo AJ. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Rev Lib*. 2010;11(16):89–188.
 12. Santos N de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Context Enferm*. 2004;13:64–70.
 13. Lima ME, Andrade D de, Haas VJ. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Ter Intensiva* [Internet]. 2007;19:342–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2007000300013&lang=pt
 14. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
 15. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2015;22(1):90–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
 16. Ambler RP. The Structure of Beta-Lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1980;289(1036):321–31. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2395388>
 17. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases [1]. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):1050–1.
 18. Szarecka A, Lesnock KR, Ramirez-Mondragon CA, Nicholas HB, Wymore T. The Class D β -lactamase family: Residues governing the maintenance and diversity of function. *Protein Eng Des Sel*. 2011;24(10):801–9.
 19. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(March):Suppl. S I .5-16.
 20. Bona EAM De, Pinto FGDS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC De. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da

- concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Pharmacology* [Internet]. 2014;81(3):218–25. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572014000300218&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
21. James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller KCC. *Manual of Clinical Microbiology*, Volume 1. 11(20):1126–7.
 22. Ferraro JHJ and MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis*. 2009;7750:1749–55.
 23. Ling TKW, Tam PC, Liu ZK, Augustine FB, Cheng AFB. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. 2001;39(8):2964–6.
 24. Garcia-garrote F, Cercenado E. Evaluation of a New System , VITEK 2 , for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2108–11.
 25. Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME. Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1402–6.
 26. Phair JP, Carleton J, Tan JS. Comparison of Cefazolin , a New Cephalosporim Antibiotic , with Cephalothin. 1972;2(4):329–30.
 27. Farrar WE, Krause JM. Relationship Between f3-Lactamase Activity and Resistance of Enterobacter to Cephalothin. 1970;2(5):610–6.
 28. Zhang SX, Parisian F, Yau Y, Fuller JD, Poutanen SM, Richardson SE. Narrow-spectrum cephalosporin susceptibility testing of *Escherichia coli* with the BD phoenix automated system: Questionable utility of cephalothin as a predictor of cephalexin susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3762–3.
 29. Espinar MJ, Rocha R, Ribeiro M, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Extended-spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* screened by the VITEK 2 system. *J Med Microbiol*. 2011;60(6):756–60.
 30. Jaskulski M da R. Avaliação da presença de ESBL, carbapenemase do tipo KPC e porinas como mecanismo de resistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Pontifícia Univ Católica do Rio Gd do Sul.

2013;

31. Lee M, Chung H-S. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2015;112:87–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701215000937>
32. Vading M, Samuelsen, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2011;17(5):668–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03299.x>
33. Lortholary O, Tod M, Petitjean O, Cohen Y. Aminoglycosides. *Med Clin North Am* [Internet]. 1995;79(4):761–87. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712516300384>
34. Gonzalez LS 3rd, Spencer JP. Aminoglycosides: a practical review. *Am Fam Physician*. 1998 Nov;58(8):1811–20.

