UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos

DARLAN AUGUSTO DA COSTA ROCHA

Tese para obtenção do título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio.

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos

DARLAN AUGUSTO DA COSTA ROCHA

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em **Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)**.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio.

São Paulo
2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o
programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e
adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R673m

Rocha, Darlan Augusto da Costa
Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos / Darlan Augusto da Costa Rocha. - São Paulo, 2019.
265 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Citometria de fluxo. 2. Condutividade elétrica. 3. Resistência microbiana às drogas. 4. Teste de sensibilidade microbiana. 5. Métodos rápidos. I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello , orientador.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com a seguinte norma, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP ; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo : SIBiUSP, 2016. 100p. : il. -- (Cadernos de estudos ; 9). Disponível em: <http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/view/111/95/491-2>.

Darlan Augusto da Costa Rocha

Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos

Comissão julgadora da tese para obtenção do título de Doutor.

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a)._____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____
Instituição: _____
Julgamento: _____

São Paulo ___ de _____ de 2019.

Dedicatória

Dedico todo esforço que depositei neste trabalho à minha mãe Regina Marcia da Costa (*in memoriam*), que já se foi, mas continua sendo minha maior fonte de força e inspiração na vida, com todo o meu amor e gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a minha esposa Flávia, pessoa com quem amo partilhar minha vida e que não poupou esforços para me ajudar. Sua presença me trouxe segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Jorge, por me acolher em seu laboratório, por ter me proporcionado muito conhecimento científico, ter me motivado, acreditado em meu potencial, além de todas manifestações de caráter e apoio em todos os momentos difíceis dos últimos anos. A minha principal fonte de inspiração e um grande exemplo de vida. É um privilégio e motivo de orgulho trabalhar sob sua liderança.

Ao meu irmão Danilo, que é um dos meus principais incentivadores, que me mantém motivado para atingir meus objetivos, para que “nunca desista !!!”, e me ajuda a distrair com lama e graxa nos fins de semana.

Agradeço também aos maravilhosos momentos que passo com meus familiares quando vou para Minas Gerais ou interior de São Paulo, especialmente ao meu Pai Waldir, Altairzo, Tio José Márcio e Tio Rui Mário e aos amigos que me deram muita ajuda e suporte Fabi, Marina Eloi, Juliana, Mayne, Suely, Aline e especialmente à Bruna pela apresentação há um bom tempo atrás da linguagem R, principal software utilizado nesta tese.

Aos assessores científicos do grupo Fleury Alessandra, Valdemir, Amauri e Karin, bem como os colaboradores do P&D e Microbiologia Danielle, Ellen, Fernanda, Sabrina e Carla que me ajudaram muito, principalmente com treinamentos, utilização dos equipamentos, pedidos de reagentes, consultas ao sistema e leituras de testes realizados nos fins de semana.

Agradeço ao Grupo Fleury pelo apoio financeiro para a execução do projeto, além da disponibilização dos isolados, infraestrutura, equipamentos e corpo técnico científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O aprendizado constante é bom, é estimulante, nos atualiza e assim nos habilita a interagir com os novos desafios e com as permanentes mudanças com muito mais habilidade e competência” ...

” ...estamos sempre aprendendo, estudando, experimentando, observando.”

Floriano Serra

RESUMO

Rocha, D. A. C.. **Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram negativos** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2019.

Introdução. Bacilos Gram negativos são importantes agentes de infecções graves, particularmente no ambiente hospitalar. Nos últimos anos tem havido um número crescente de infecções por isolados produtores de carbapenemases, o que limita as opções de tratamento. Infecções por microrganismos multi-resistentes estão relacionados a taxas de mortalidade mais elevadas e a rapidez no diagnóstico e a terapia empírica combinada podem reduzir as taxas de mortalidade. A espectrometria de massas (MS) trouxe um grande ganho de tempo na identificação microbiana, mas os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA), que fornecem resultados fidedignos e em uso na rotina clínica demandam 16 a 20 horas de incubação. O uso combinado da MS e métodos rápidos de TSA permitiria reduzir o tempo do ajuste terapêutico, potencialmente reduzindo a mortalidade. Há na literatura a descrição de novos métodos para TSA rápidos, mas a maioria não está comercialmente disponível. Dentre eles, a citometria de fluxo (CF) e métodos baseados em condutividade elétrica (CE) potencialmente atendem a demanda.

Materiais e métodos. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo (MC) com leitura visual (18h) foi considerada o padrão ouro. A determinação das CIMs por CF foi realizada após 120 min de incubação a 37ºC, marcação com indicadores celulares, contagem celular padronizada com microesferas e algoritmo em linguagem R para análise de vários arquivos citométricos simultaneamente. A avaliação da sensibilidade foi realizada para polimixina B (PB), amicacina (AMI) e meropenem (MEM). Para padronização do método de CIM foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* 3313 produtora de MCR-1*, Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 produtora de KPC, *K. pneumoniae* J9243971 e *Proteus mirabilis* J9103900, além de 51 concentrados bacterianos provenientes de hemoculturas positivas para diferentes espécies. Além das concentrações convencionais, foram realizados testes com concentrações elevadas de PB e leitura após 15 min de incubação. As aquisições obtidas na presença de PB foram comparadas com aquelas obtidas sem exposição.
O teste rápido por CE foi feito inicialmente padronizado com as cepas *E. coli* 3313 e *P. mirabilis* J9103900. Três tubos foram preparados: um com suspensão bacteriana, o segundo com suspensão submetida a sonicação e o terceiro com suspensão bacteriana exposta à PB. A seguir os três tubos foram analisados por CE.

Resultados e discussão. Para a determinação da CIM por CF houve concordância essencial e categórica de 94,12% para AMI, concordância essencial de 94,12% e categórica de 98,04% para MEM e concordância essencial de 94,12% e categórica de 100% para PB quando comparadas com a CIM não automatizada, dessa forma houve apenas 5,88% de erros menores para AMI e 1,96% para MEM. A análise por CE permitiu diferenciar bactérias íntegras daquelas lisadas, entretanto, os ensaios contendo apenas solução de sulfato de polimixina B ou sulfato de sódio não foram reprodutíveis.

Conclusões. Os resultados da determinação da CIM por CF indicam ótima correlação (>94%) com MC para PB, AMI e MEM. Os ensaios com CE permitiram diferenciar

células íntegras de células lisadas, mas há necessidade de modificação do dispositivo de medição.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Condutividade elétrica. Resistência microbiana a drogas. Teste de sensibilidade microbiana. Métodos rápidos.

ABSTRACT

Rocha, D. A. C.. ***Fast methods for antimicrobial susceptibility assessment in Gram-negative bacilli.*** *Doctoral Thesis. School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, 2019.*

Introduction. *Gram-negative bacilli are important agents of serious infections, particularly in the hospital setting. In recent years there have been a growing number of infections by carbapenemase-producing isolates, which limits treatment options. Multi-resistant microorganism infections are related to higher mortality rates and rapid diagnosis and combined empirical therapy may reduce mortality rates. Mass spectrometry (MS) has brought a great deal of time for microbial identification, but antibiotic susceptibility testing (AST), which provides reliable results and in routine clinical use, requires 16 to 20 hours of incubation. The combined use of MS and fast AST methods would reduce the time to therapeutic adjustment, potentially reducing mortality. New methods for fast AST are described in the literature, but most are not commercially available. Among them, flow cytometry (FC) and methods based on electrical conductivity (EC) potentially meet the demand.*

Materials and methods. *The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution (BD) with visual reading (18h) was considered the gold standard. The determination of MICs by FC was performed after 120 min of incubation at 37ºC, marking with cellular indicators, standardized cellular counting with beads and R language algorithm for analysis of several cytometric files simultaneously. Sensitivity evaluation was performed for polymyxin B (PB), amikacin (AMI) and meropenem (MEM). For standardization of the MIC method, the strains Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, MCR-1 producer E. coli 3313, KPC producer Klebsiella pneumoniae BAA-1705, K. pneumoniae J9243971, Proteus mirabilis J9103900 and 51 bacterial concentrates from positive blood cultures for different species were used. In addition to conventional concentrations, tests with high concentrations of PB and reading after 15 min of incubation were performed. Acquisitions obtained in the presence of PB were compared with those obtained without exposure.*

The fast EC test was initially standardized with E. coli 3313 and P. mirabilis J9103900 strains. Three tubes were prepared: one with bacterial suspension, the second with sonication suspension and the third with bacterial suspension exposed to PB. Then the three tubes were analyzed by EC.

Results and discussion. *The determination of MIC by FC there was an essential agreement and categorical agreement of 94.12% for AMI, essential agreement of 94.12% and categorical agreement of 98.04% for MEM and essential agreement of 94.12% and categorical agreement of 100% for PB when compared to non-automated MIC, thus there were only 5.88% of minor errors for AMI and 1.96% for MEM. The analysis by EC allowed to differentiate intact bacteria from those lysed, however, the assays containing only polymyxin B sulfate solution or sodium sulfate were not reproducible.*

Conclusions*. The results of the MIC determination by FC indicate an excellent correlation (> 94%) with BD for PB, AMI, and MEM. The EC assays allowed differentiating intact cells from lysed cells, but there is a need for modification of the measuring device.*

Keywords: *Flow cytometry. Electric conductivity. Microbial drug resistance. Microbial Sensitivity Test. Fast methods.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 Métodos tradicionais para determinar sensibilidade a antimicrobianos 15
1.2 Microscopia em tempo real 16
1.3 Espectrometria de massas 17
1.4 Métodos baseados em amplificação de DNA 19
1.5 Testes rápidos para detecção de isolados resistentes à carbapenêmicos e polimixinas 20
1.6 Citometria de fluxo 20
1.7 Condutividade elétrica de culturas bacterianas 24
2 JUSTIFICATIVA 27
3 OBJETIVOS 28
3.1 Objetivo geral 28
3.2 Objetivos específicos 28
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 Materiais 29
4.1.1 Isolados 29
4.1.2 Equipamentos 29
4.1.3 Reagentes para citometria de fluxo 29
4.2 Testes de sensibilidade 30
4.2.1 Microdiluição em caldo 30
4.2.1.1 Preparo do inóculo 30
4.2.1.2 Preparo das Placas 30
4.2.1.3 Inóculo 31
4.2.2 Citometria de fluxo 31
4.2.2.1 Avaliação da aquisição de diferentes gêneros bacterianos 34
4.2.2.2 Avaliação da influência da densidade do inóculo nas aquisições 35
4.2.2.3 Avaliação da influência do tempo entre o preparo da suspensão e marcação sobre tamanho e complexidade 35
4.2.2.4 Avaliação da influência do Tween 20 no tamanho e complexidade 35
4.2.2.5 Teste de marcação com os corantes de vitalidade e viabilidade 36
4.2.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo 36
4.2.2.6.1 Ensaio piloto para padronização da técnica 36

4.2.2.6.2 Ensaio de *sorting* para análise de viabilidade e vitalidade bacteriana e definição da interpretação da CIM por CF 37

4.2.2.6.3 Ensaio de reprodutibilidade da determinação da CIM por CF para polimixina B e meropenem 38

4.2.2.6.4 Validação da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo em concentrados bacterianos de hemoculturas positivas 38

4.2.2.7 Teste rápido para triagem de bactérias resistentes à polimixina B 40

4.2.3 Condutividade elétrica de suspensões bacterianas 40

4.2.3.1 Teste com bactérias sonicadas 44

4.2.3.2 Teste de triagem com bactérias expostas à polimixina B 44

4.2.3.3 Teste de reprodutibilidade de medida com polimixina B e sulfato de sódio 44

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 46

5.1 Citometria de fluxo 46

5.1.1 Avaliação da aquisição de diferentes gêneros bacterianos 46

5.1.2 Avaliação da influência da densidade do inóculo nas aquisições 48

5.1.3 Avaliação da influência do tempo entre o preparo da suspensão e marcação sobre tamanho e complexidade 50

5.1.4 Avaliação da influência do Tween 20 no tamanho e complexidade 52

5.1.5 Teste de marcação com os corantes de vitalidade e viabilidade 53

5.1.6 Determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo 55

5.1.6.1 Ensaio piloto para padronização da técnica 55

5.1.6.2 Ensaio de *sorting* para análise de viabilidade e vitalidade bacteriana e definição da interpretação da CIM por CF 64

5.1.6.3 Ensaio de reprodutibilidade da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo para polimixina B e meropenem 72

5.1.6.4 Validação da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo em concentrados bacterianos de hemoculturas positivas 73

5.1.7 Teste rápido de triagem de resistência à polimixina por citometria de fluxo 87

5.2 Condutividade de suspensões bacterianas 90

5.2.1 Teste com bactérias sonicadas 91

5.2.2 Teste de triagem com bactérias expostas à polimixina B 92

5.2.3 Teste de reprodutibilidade de medida com polimixina B e sulfato de sódio 93

6 CONCLUSÕES 96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 97

APÊNDICE 106

1 INTRODUÇÃO

O grupo de bactérias *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanniii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. são frequentemente isolados de casos de infecções nosocomiais, e são geralmente resistentes à maioria absoluta dos antimicrobianos comercialmente disponíveis. Por isso são referenciados com a sigla ESKAPE, pois conseguem "escapar" da ação dos antimicrobianos. A dificuldade no tratamento das infecções causadas por este grupo de microrganismos se reflete em altas taxas de morbidade e mortalidade (EL-MAHALLAWY et al., 2016; FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2017). *Klebsiella pneumoniae* é um dos patógenos mais importantes do grupo ESKAPE por sua maior frequência em relação aos demais, grande diversidade de mecanismos de resistência e capacidade de disseminação de novos mecanismos de resistência (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

As infecções mais importantes causadas por *K. pneumoniae* são bacteremias (12,3%), pneumonias (10,2%), meningites e infecções de pele e tecidos moles (10,4%) (COQUE et al., 2002; GALES et al., 2012; RAMIREZ et al., 2014; WOLOJ et al., 1986).

A alta taxa de colonização de pacientes com *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases (KpPC) tem se tornado um problema epidemiológico e clínico, pois podem causar infecção e se disseminar em ambiente hospitalar causando surtos, e alguns países já consideram esse microrganismo endêmico (TUMBARELLO et al., 2015). Esses microrganismos inativam quase todos os β-lactâmicos disponíveis para uso clínico e usualmente apresentam resistência concomitante a antimicrobianos importantes na prática médica, a exemplo de fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (DAIKOS et al., 2014). Os antibióticos mais ativos são a colistina e tigeciclina; contudo alguns trabalhos indicam aumento na taxa de resistência para esses antimicrobianos, o que dificulta muito o tratamento dos pacientes infectados (DAIKOS et al., 2014). Mais recentemente foi introduzida na prática clínica a associação ceftazidima-avibactam, que tem ação adequada contra a maioria dos isolados produtores de KPC, mas não contra aqueles produtores de metalo-betalactamases e algumas variantes de KPC, a exemplo de KPC-3, KPC-23 e KPC-31(ANTONELLI et al., 2019; GAIBANI et al., 2018; GALANI et al., 2019; HAIDAR et al., 2017; LIVERMORE et al., 2015; SHIRLEY, 2018).

Infecções graves causadas por KpPC apresentam alta taxa de mortalidade média quando comparadas com *K. pneumoniae* não produtoras de carbapenemases, de até 32,1% contra 9,9%, respectivamente (GASINK et al., 2009).

A taxa de mortalidade associada a KpPC varia de 22 a 78%, dependendo da doença de base e idade da população estudada, além disso está associada à maior taxa de mortalidade relacionada com infeções no ambiente hospitalar (TUMBARELLO; LOSITO; GIAMARELLOU, 2018; TUMBARELLO et al., 2015). O maior desafio no tratamento de infecções por KpPC é a escolha adequada do melhor tratamento. Estudos recentes sugerem regimes com dois ou mais antimicrobianos. A taxa de mortalidade é de 44,4% quando o tratamento é monoterápico, enquanto a taxa de mortalidade é de 27,2% quando o tratamento é combinado (DAIKOS et al., 2014; TUMBARELLO et al., 2018; TUMBARELLO et al., 2015). Daikos e colaboradores (2014) descrevem que a taxa de mortalidade utilizando carbapenêmicos em terapia combinada é de 19,9%, indicando um efeito sinérgico e que a monoterapia com colistina ou aminoglicosídeos é menos efetiva (DAIKOS et al., 2014).

A redução no tempo para o diagnóstico de infecções, identificação do agente infeccioso e tratamento do paciente, principalmente aqueles com infecções sistêmicas e causadas por microrganismos resistentes, é fundamental para a diminuição da mortalidade e do tempo de permanência do paciente no hospital (BARENFANGER; DRAKE; KACICH, 1999; CHANDRASEKARAN et al., 2018; CHOI et al., 2017; DOERN et al., 1994; INGLIS; EKELUND, 2019; MACHEN; DRAKE; WANG, 2014; PEREZ et al., 2013; TRENHOLME et al., 1989). Com a introdução da tecnologia de espectrometria de massas MALDI-ToF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight Mass Spectrometry*) na rotina laboratorial de microbiologia clínica, é possível a identificação de bactérias a nível de gênero ou espécie em alguns minutos, desde que haja uma massa bacteriana mínima (PEREZ et al., 2013).

Para a determinação da sensibilidade antimicrobiana, de bactérias em laboratórios clínicos, atualmente são utilizados métodos tradicionais a exemplo da disco-difusão, microdiluição em caldo e gradiente em fita ou sistemas automatizados como Vitek2, Microscan e Phoenix. Existem várias metodologias publicadas que são capazes de reduzir o tempo de análise quando comparado com os métodos tradicionais e automatizados, a exemplo de citometria de fluxo, medidas de condutividade elétrica, espectrometria de massas, microscopia em tempo real, e métodos baseados em amplificação de DNA (Tabela 1). No entanto, essas

metodologias precisam de validação e comparação com os métodos tradicionais, principalmente os que são baseados em concentração inibitória mínima para garantir a segurança do resultado e interpretação pelos pontos de corte preconizados pelo EUCAST ou CLSI (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009) (VAN BELKUM; DUNNE, 2013).

Tabela 1 - Características dos principais métodos utilizados para determinação de sensibilidade ou resistência bacteriana

Método	Princípio do método	Inóculo > 10^5 Células	PC ou CD	Custo	Manual ou automático	CIM Real?	Tempo para resultado (horas)
Diluição em ágar	Inibição do crescimento em meio sólido com antibióticos	Sim	CD	Baixo	Manual	Sim	>10
Testes automatizados (Vitek, Phoenix, Microscan)	Monitoramento do crescimento ou conversão do substrato utilizando sistema óptico	Sim	CD	Baixo	Automático	Sim/ Não	6-18
Microdiluição em caldo	Inibição de crescimento em meio líquido acrescido de antibióticos	Sim	CD	I	Manual e Automático	Sim/ Não	>10
Ágar Cromogênico	Conversão metabólica de compostos cromogênicos presentes no meio	Sim	CD	I	Manual	Não	>10
Disco difusão	Medida de inibição de crescimento em torno de disco contendo antibiótico	Sim	CD	Baixo	Manual e Automático	Sim/ Não	>10
Fita gradiente	Medida de inibição de crescimento em torno de fita contendo gradiente de concentração de antibiótico	Sim	CD	I	Manual e Automático	Sim	>10
PCR	Amplificação de DNA	Não	CD	I	Manual e Automático	Não	<1
Microscopia em tempo real	Registro de divisão bacteriana (em nível celular) em tempo real	Não	CD	NC	Manual	Não	<1
Citometria de fluxo	Medidas de tamanho, complexidade e marcação de células viáveis e inviáveis.	Não	CD/PC	I	Automático	Sim/ Não	<5

Continua

Método	Princípio do método	Inóculo > 10^5 Células	PC ou CD	Custo	Manual ou automático	CIM Real?	Tempo para resultado (horas)
MALDI-ToF MS	Detecção de produção de proteínas e produtos de degradação de antibióticos	Sim	PC	I	Automático	Não	<5
Microfluídos	Monitoramento de crescimento ou conversão de substrato em meio líquido na escala de nanolitros	Não	PC	NC	Automático	Sim/ Não	<5
Sequenciamento de nova geração	Sequenciamento de DNA genômico	Não	CD/PC	Alto	Automático	Não	>10
Medidas de impedância	Monitoramento de características elétricas da suspensão contendo células expostas a antibióticos	Sim	PC	NC	Automático	Não	<5

CD – Comercialmente disponível; PC – Prova de conceito; NC – Não conhecido; I – Intermediário. Adaptado de (VAN BELKUM; DUNNE, 2013).

1.1 Métodos tradicionais para determinar sensibilidade a antimicrobianos

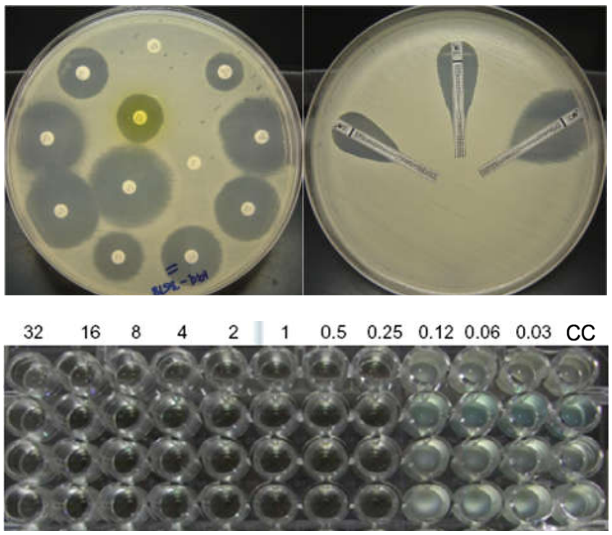
O método de microdiluição em caldo se baseia na diluição seriada do antibiótico em caldo Mueller Hinton, de forma que várias concentrações do antibiótico são testadas na placa. Após o preparo das diluições, uma suspensão bacteriana com uma concentração padronizada (1 a 5 x 10^5 UFC/mL) é inoculada. Em seguida a placa é incubada por 16-20 horas a 35 ± 1˚C. Após o período de incubação, é possível visualizar uma massa bacteriana no fundo dos poços nos quais a concentração do antibiótico não foi capaz de inibir o crescimento. A concentração inibitória mínima é o primeiro poço da diluição no qual não há, visivelmente, crescimento bacteriano (Figura 1) (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

O método de disco-difusão é prático, barato e bem padronizado. O teste é feito inoculando uma suspensão bacterina na concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL sobre a superfície de ágar Mueller Hinton. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com concentrações fixas de antimicrobianos são posicionados na superfície do ágar. A placa é incubada por 16 a 20 horas a 35˚±1°C. Os antibióticos presentes nos discos se difundem concentricamente no ágar, formando um halo de inibição de crescimento. O diâmetro de cada halo é aferido e comparado com tabelas

contendo os pontos de corte, sendo possível categorizar o isolado como sensível (S), sensível aumentando exposição (I) ou resistente (R) para cada antibiótico testado (Figura1) (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

O teste com gradientes em fita é feito inoculando uma suspensão com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL sobre a superfície de ágar Mueller Hinton e fitas, com uma escala em uma das faces e um gradiente de antimicrobiano na outra, são aplicadas na superfície do ágar. A placa é incubada por 16 a 20 horas a 35 ± 1˚C. A leitura do teste é feita na interseção da elipse de inibição com a fita, correspondendo à concentração inibitória mínima (Figura 1) (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

Figura 1 – Testes tradicionais para determinação da sensibilidade aos antimicrobianos



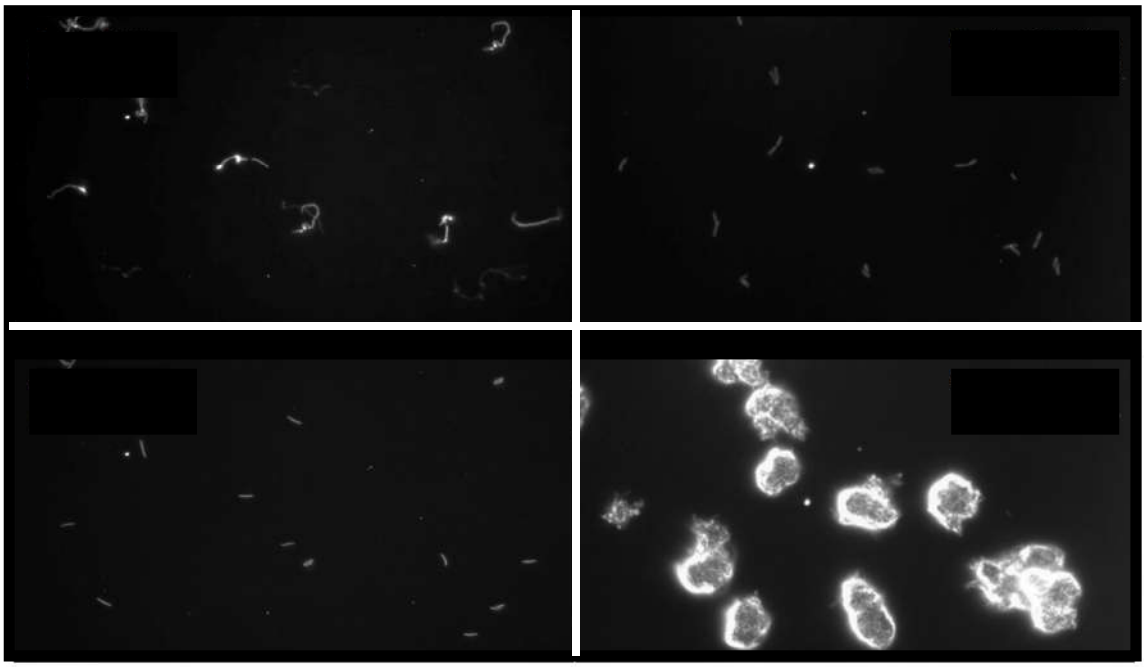
Disco-difusão (superior esquerda), gradiente em fita (superior direita) e microdiluição em caldo (inferior), utilizando polimixina B em *Pseudomonas aeruginosa* com concentrações que variam de 32 à 0,03 mg/L e controle de crescimento (CC) Adaptado de (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

1.2 Microscopia em tempo real

Atualmente há disponível comercialmente o dispositivo Accelerate® (exemplo de análises de densidade óptica de crescimento e microscopia automatizada com análise em tempo real), o qual pode identificar um isolado em até 90 minutos e o antibiograma em aproximadamente 7 horas. É baseado em preparação automática da amostra, no qual a identificação é realizada por FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization* e para o teste de sensibilidade, as células bacterianas são imobilizadas

entre duas lâminas plásticas contendo diferentes concentrações de antimicrobiano, permitindo uma análise microscópica de cada célula, e consequentemente avaliação do crescimento microbiano. A determinação da concentração inibitória mínima é feita pela análise morfo-cinética da amostra, por microscopia de campo escuro das células previamente imobilizadas (Figura 2) (PANCHOLI et al., 2018; PANTEL; MONIER; LAVIGNE, 2018) (BURNHAM et al., 2014; FREDBORG et al., 2013) (CHOI et al., 2013; CHOI et al., 2014; MOHAN et al., 2013; TANG et al., 2013).

Figura 2 – Aquisições do equipamento Accelerate – Análise morfo-cinética de células



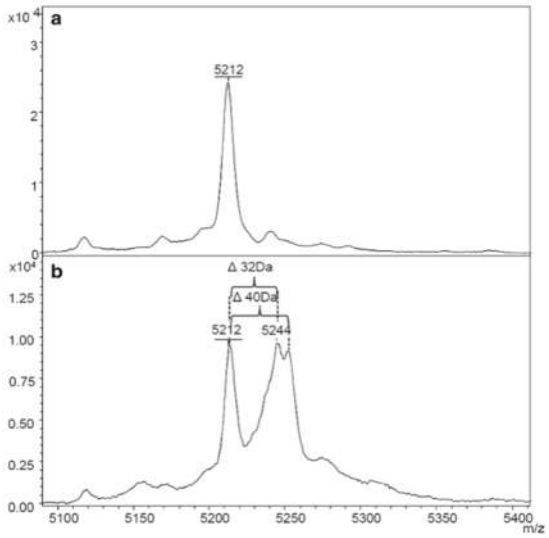
Teste de sensibilidade a antibióticos por análise morfo-cinética. Isolados da esquerda: *Escherichia coli* sensível à piperacilina-tazobactam (CIM=2 mg/L). Figura superior tempo 0 e inferior após incubação. Isolados da direita: *Escherichia coli* resistente à ceftazidima (CIM=32 mg/L), figura superior tempo 0 e inferior após incubação. Retirado de (ACCELERATE DIAGNOSTICS, 2018).

1.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi primeiramente sugerida para utilização na identificação de bactérias em 1975 por Anhalt e Fenselau (ANHALT; FENSELAU, 1975). Uma das maneiras desenvolvidas para a utilização da espectrometria de massas para testes de sensibilidade a antibióticos se baseia na incorporação metabólica de aminoácidos marcados com isótopos estáveis (SILAC – *Stable Isotope*

Labelling by Amino Acids in Cell Culture). O microrganismo é cultivado em duas condições diferentes: a primeira em meio convencional (com abundância de isótopos naturais estáveis) sem antibióticos; a segunda em meio de composição química similar exceto pela presença de uma forma isotopomérica de um aminoácido, como a lisina (que pode ser marcada, por exemplo, com C^{13} e N^{15}) e acrescido do antibiótico testado. As duas culturas são combinadas e analisadas por espectrometria de massas. A detecção de pares isotopoméricos (mais pesados) resultantes da incorporação de aminoácidos pesados, decorrente de síntese proteica, indica a proliferação do microrganismo na presença do antibiótico, ou seja, a resistência (Figura 3) (JUNG et al., 2014).

Figura 3 - Diferentes espectros gerados pelo método Maldi-TOF por SILAC



(A) Espectro de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio de cultura com lisina nativa. (B) Espectro de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio de cultura com lisina marcada com isótopos estáveis. Notar duplo pico com lisina nativa e lisina marcada, Retirado de Jung (2014) (JUNG et al., 2014).

Outra aplicação da espectrometria de massas para o teste de sensibilidade a antibióticos recentemente descrita é mais simples e resumidamente consiste em realizar a leitura do método de microdiluição por espectrometria de massas. Um volume de 6μL de cada poço de um ensaio de microdiluição convencional, é dispensado diretamente na *target plate* do espectrômetro de massas e imediatamente após a inoculação é incubado por até seis horas, sendo então realizada a aquisição no equipamento. No poço no qual não há antibiótico a bactéria não é inibida e há a

produção de proteínas de maneira exponencial, sendo possível a identificação da bactéria; caso contrário, no poço que contém antibiótico, a depender da concentração, as bactérias são inibidas de maneira que a quantidade de proteínas se mantém próxima ou a mesma do inóculo inicial e abaixo do limite de detecção do equipamento. Cada concentração é testada em triplicata. A ausência de identificação da bactéria pelo instrumento indica sensibilidade ao antibiótico testado (IDELEVICH et al., 2018; LI et al., 2018).

1.4 Métodos baseados em amplificação de DNA

O sistema FilmArray é um kit comercialmente disponível, baseado em dupla PCR (*Polymerase chain reaction*), contém vários pares de iniciadores para identificação de patógenos e alguns genes de resistência. O ensaio se baseia em duas etapas de amplificação: a primeira reação amplifica em uma região alvo e sequencialmente o produto se movimenta em uma matriz que contém vários poços, cada um com um par de iniciadores (primers). Numa segunda etapa ocorre amplificação de DNA individualizada por poço e alvos, na qual o fluorocromo LCGreen® intercala com o DNA amplificado revelando os poços com reação positiva. As reações são realizadas em triplicata. Esse sistema pode detectar em 70 minutos 15 gêneros e 11 espécies de bactérias, além de genes de resistência *mecA*, *vanA/B* e bla_{KPC} (MARCH-ROSSELLO, 2017). Métodos moleculares baseados em PCR são bastante confiáveis, e neste caso a sensibilidade está entre 83 a 100% e especificidade superior à 99% para os diferentes alvos. As amostras provenientes de hemoculturas positivas podem ser utilizadas diretamente no kit. No entanto, métodos moleculares, baseados em PCR só amplificam sequências previamente conhecidas, não avaliam expressão dos genes de resistência, porinas e bombas de efluxo, que também resultam em resistência antimicrobiana. Além desse kit, existem outros métodos moleculares baseados PCR multiplex *in house* (QUILES et al., 2015), bem como *microarray* e sequenciamento; entretanto atualmente têm alto custo e o tempo para obtenção de resultados supera o necessário para a realização da microdiluição, que é o padrão ouro. Além disso, é necessária mão de obra especializada para análise.

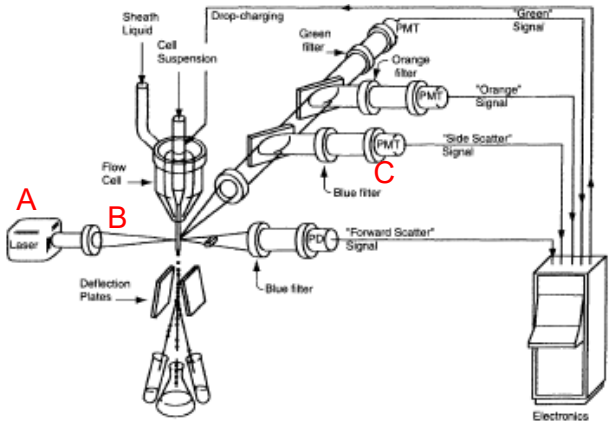
1.5 Testes rápidos para detecção de isolados resistentes à carbapenêmicos e polimixinas

Há também os testes rápidos de triagem para detecção de isolados resistentes à carbapenêmicos, polimixinas e aminoglicosídeos. As carbapenemases inicialmente hidrolisam o anel betalactâmico dos carbapenêmicos e a seguir ocorre reação de descarboxilação, o que resulta na redução do pH do meio (Carba-NP e BlueCarba). No caso das polimixinas ou aminoglicosídeos, o teste se baseia em detectar isolados que são resistentes e, portanto, mesmo após a exposição ao antibiótico são capazes de crescer e metabolizar a glicose, produzindo ácido, após 2 horas de incubação (*Rapid Polymyxin NP*). Esses métodos permitem a detecção rápida (até 2 horas) de bactérias resistentes a altos níveis de antibióticos; no entanto não são capazes de fornecer a concentração inibitória mínima (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016; NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012; PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013).

1.6 Citometria de fluxo

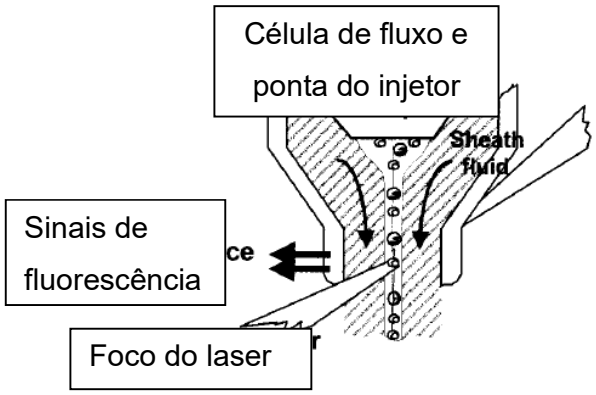
A citometria de fluxo pode ser definida como um método para medida e análise de partículas em suspensão, submetidas a um fluxo. Os dados são obtidos dos sinais da variação da transmissão/absorção e reflexão da luz do laser que incide nas partículas presentes no fluxo (Figuras 4 e 5) (GIVAN, 2001).

Figura 4 – Componentes de um citômetro de fluxo



A – Laser; B- Foco do laser e fluxo com suspensão de partículas; C – Conjunto de detectores e filtros que detectam a informação da variação da transmissão de luz obtida para o computador para ser possível a análise dos dados. Retirado de Givan (2001) (GIVAN, 2001).

Figura 5 – Foco hidrodinâmico do citômetro de fluxo



Foco hidrodinâmico que permite a centralização das células no líquido para a passagem no laser. Retirado de Alvarez-Barrientos (2001) (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000).

O citômetro de fluxo é um equipamento, que apesar do nome, não necessariamente lida apenas com células, mas pode aferir também diversos tipos de partículas que podem ser suspensas em meio líquido e submetidas ao fluxo, e que podem absorver ou dispersar de algum modo a luz emitida pelo laser. A análise dessa dispersão permite obter dados de tamanho, complexidade e capacidade de ligação com cromógenos específicos que são excitados pelo laser (GIVAN, 2001). A grande vantagem da utilização da citometria de fluxo em comparação com a microscopia (método que avalia diretamente as estruturas celulares) é que milhões de células podem ser avaliadas em todos os parâmetros do equipamento em apenas alguns segundos (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; GAUTHIER; ST-PIERRE;

VILLEMUR, 2002), além de menor subjetividade e possibilidade de avaliações quantitativas mais precisas.

Em microbiologia clínica, a citometria de fluxo pode ser utilizada em análises de detecção direta, testes sorológicos e testes de susceptibilidade de bactérias, fungos, parasitas e vírus (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000). Há na literatura diversos trabalhos que aplicam a metodologia de diversas maneiras para os diferentes microrganismos, principalmente em testes de susceptibilidade (Tabela 2) (BARBOSA et al., 2014; FREDRICKS et al., 2006; PINA-VAZ, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2005; SHRESTHA et al., 2011; VALE-SILVA et al.; WANG et al., 2014).

A análise de bactérias em citometria de fluxo com fluorocromos permite a avaliação de parâmetros como a viabilidade celular (integridade) e algumas vias metabólicas (atividade bacteriana) e é possível separar as análises por populações com cada uma dessas características. A avaliação de determinados antibióticos juntamente com os corantes de viabilidade celular permite a avaliação da atividade do antibiótico sobre a célula bacteriana (bactericida ou bacteriostático) além de permitir a análise de milhões de células concomitantemente (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000).

Apesar do grande potencial de aplicabilidade clínica representado pela citometria de fluxo, é necessário o estudo comparativo de métodos tradicionais de susceptibilidade a antibióticos recomendados pelo CLSI e EUCAST com o método de citometria de fluxo para aplicabilidade em laboratórios clínicos. A citometria de fluxo pode reduzir o tempo de análise do antibiograma de 24 horas para até 90 minutos (BROEREN et al., 2013; GAUTHIER et al., 2002); contudo há uma escassez de trabalhos recentes que tenham avaliado a citometria de fluxo, principalmente com espécies que possuem diversos mecanismos de resistência, o que torna o método pouco estudado em relação aos métodos tradicionais de susceptibilidade a antimicrobianos. A Tabela 2 sumariza os principais trabalhos utilizando citometria de fluxo aplicada ao teste de sensibilidade a antibióticos. Não há trabalhos publicados utilizando polimixina B, amicacina e meropenem com os marcadores laranja de tiazol e iodeto de propídio. Além disso, o tempo mínimo para liberação dos resultados é bastante heterogêneo: de 90 minutos a 6 horas (com exceção das micobactérias). Apesar da heterogeneidade de protocolos, a citometria de fluxo pode reduzir substancialmente o tempo para obtenção do perfil de sensibilidade aos antibióticos

com determinação da concentração inibitória mínima e não simplesmente detectar resistência.

Tabela 2 – Revisão de principais trabalhos que realizaram antibiograma por citometria de fluxo

Ano de publicação	Microrganismos estudados	Marcadores para citometria	Tipo de resultado	Tempo mínimo para o resultado	Antibióticos testados	Referência
1982	*Escherichia coli*	Brometo de etídio	CIM	3 horas	Cefazolina, moxalactam, cefamandol	(MARTINEZ et al., 1982)
1989	*Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis*	Brometo de etídio	Categoria	2 horas	Amicacina	(COHEN; SAHAR, 1989)
1996	*Mycobacterium avium***,** *Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium gordonae e Mycobacterium marinum*	Diacetato de fluoresceína	CIM	24 horas	Ciprofloxacino, claritromicina, eritromicina, kanamicina, rifampicina e tobramicina	(BOWNDS et al., 1996)
1997	*Escherichia coli*	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol [DiBAC4(3)]	Contagem de unidades formadoras de colônias	4 horas	Azitromicina, cefuroxima, e ciprofloxacino	(JEPRAS et al., 1997)
1998	*Mycobacterium tuberculosis*	Diacetato de fluoresceína	CIM	24 horas	Rifampicina, isoniazida, etambutol	(KIRK et al., 1998)
2002	*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus e Staphylococcus epidermidis*	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol [DiBAC4(3)] e Iodeto de propídio	Categoria	2 horas	Ampicilina, carbenicilina, ceftriaxona, ceftazidima, gentamicina, nitrofurantoina, norfloxacino, oxacilina, penicilina G, tetraciclina cotrimoxazol e vancomicina	(GAUTHIER et al., 2002)

Continua

Ano de publicação	Microrganismos estudados	Marcadores para citometria	Tipo de resultado	Tempo mínimo para o resultado	Antibióticos testados	Referência
2005	*Mycobacterium tuberculosis*	SYTO 16 e Iodeto de propídio	Categoria	72 horas	Estreptomicina, rifampicina, isoniazida, etambutol	(PINA-VAZ, C. et al., 2005)
2006	*Mycobacterium tuberculosis*	Contagem bacteriana (Sem corantes)	Categoria	24 horas	Pirazinamida	(FREDRICKS et al., 2006)
2011	*Staphylococcus aureus*	BRAG3	Triagem para MRSA	4 horas	Oxacilina	(SHRESTHA et al., 2011)
2012	*Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa*	SYTO9 e Iodeto de propídio	Populações lesionadas e viáveis	5 horas	Ampicilina, gentamicina, cefotaxima, piperacilina, amicacina, ciprofloxacino, ceftazidima, vancomicina	(SOEJIMA; MINAMI; IWATSUKI, 2012)
2013	*Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol [DiBAC4(3)]	CIM + triagem para ESBL	3 horas	Ceftazidima, cefotaxima, ácido clavulânico	(FARIA-RAMOS et al., 2013)
2013	*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*	Contagem bacteriana (Sem corantes)	CIM	90 min	Amoxicilina, piperacilina, gentamicina	(BROEREN et al., 2013)
2017	*Klebsiella pneumoniae*	Hoechst 33342, SYTO® 9 e Iodeto de propídio	Categoria	1 hora	Meropenem, Imipenem, Ertapenem	(MULRONEY et al., 2017;2018)
2018	*Yersinia pestis*	Corante Oxonol (SynaptoGreen C4/FM1–43)	CIM	6 horas	Ciprofloxacino, ampicilina, gentamicina, doxiciclina	(ZAHAVY et al., 2018)

1.7 Condutividade elétrica de culturas bacterianas

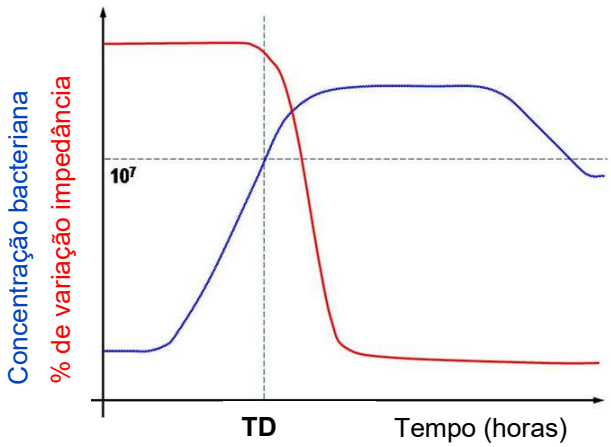
Alguns antimicrobianos como polimixinas, ß-lactâmicos e aminoglicosídeos têm ação bactericida, podendo causar o rompimento bacteriano com consequente liberação de íons, enzimas, proteínas e material genético para o meio extracelular, pois atuam na estrutura da parede e/ou membrana celular (BECKER; COOPER, 2013; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

O aumento da concentração desses compostos liberados no meio extracelular, após a exposição das células bacterianas a um antibiótico, pode ser um indicador de morte ou injúria celular e pode ser aplicado para a determinação da sensibilidade a antibióticos. Métodos químicos e físicos podem ser utilizados para a mensuração desses compostos, a exemplo de eletrodo seletivo de íons, espectrofotometria de absorção atômica, espectrometria de massas, medida de pH, condutividade elétrica, impedância, capacitância e métodos colorimétricos. Vários desses métodos já são comercialmente disponíveis, mas não para esse tipo de aplicação, e apresentam faixas de linearidade que são utilizados para dosagem de níveis séricos em humanos, provavelmente fora da faixa de detecção de biomoléculas liberadas por bactérias expostas a antibióticos e muitas vezes são dispendiosos, um fator impeditivo para laboratórios de pequeno e médio portes.

A condutividade elétrica em culturas bacterianas monitora o crescimento microbiano por um sinal elétrico que corresponde ao movimento dos íons entre dois eletrodos. Esse tipo de metodologia foi descrita inicialmente no final do século XIX (STEWART, 1899). Posteriormente, os métodos de condutividade, impedância e capacitância para o monitoramento de bactérias foram descritos e são utilizados principalmente por indústrias de alimentos, a exemplo da determinação do tempo de prateleira de produtos de consumo, verificação da contaminação por microrganismos em produtos industrializados e também em saúde pública para determinar carga bacteriana em amostras ambientais (BANCALARI et al., 2016; NOBLE, 1999).

Um dos equipamentos comerciais que afere a condutividade, impedância e capacitância é o Bactometer® da bioMérieux, divisão de indústria e ambiente. Foi um equipamento desenvolvido para a indústria farmacêutica, cosméticos, ambiente e alimentos (RAUGEL, 1999); no entanto, há uma publicação descrevendo a utilização deste equipamento para validação da sensibilidade a antibióticos e determinação da concentração inibitória mínima pela medida da impedância em tempo real (HUANG et al., 1998). O princípio de funcionamento do equipamento é a medida da impedância em cada amostra ao longo do tempo de incubação, permitindo a geração de uma curva na qual se avalia o porcentual de variação da medida atual comparada com a anterior. Dependendo do aumento da quantidade de microrganismos ou atividade metabólica, é induzida uma mudança no sinal, levando a uma inflexão da curva e determinando o tempo de detecção (TD), o qual é possível correlacionar com a quantidade de bactérias na amostra (Gráfico 1) (RAUGEL, 1999).

Gráfico 1 – Variação da Impedância em função do crescimento bacteriano



Adaptado de (RAMÍREZ et al., 2009).

Atualmente, com o avanço tecnológico de microcontroladores digitais, há disponibilidade no mercado de equipamentos com código aberto e de baixo custo, a exemplo dos controladores Arduino e ESP32. É possível desenvolver um equipamento controlado por esses dispositivos no qual pode-se aplicar algoritmos capazes de aferir condutância, capacitância e impedância de células em suspensão. Uma vez desenvolvido, faz-se necessária a comparação com métodos tradicionais de susceptibilidade a antibióticos preconizados pelo CLSI e EUCAST e desenvolvimento e validação de testes rápidos ou de triagem para bactérias que apresentam alto nível de resistência. Bactérias sensíveis ao antibiótico testado causariam diferença na impedância enquanto bactérias resistentes não causariam aumento ou exibiriam um padrão distinto.

2 JUSTIFICATIVA

Em microbiologia clínica, para a determinação da sensibilidade a antimicrobianos, são necessárias 16-20 horas de incubação, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, pois não há segurança em liberar o resultado antes do tempo preconizado e não é possível fazer testes com combinação de antimicrobianos nos casos de microbiologia automatizada. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos é necessário para o correto ajuste terapêutico. Em pacientes com infecções graves causadas por bactérias multirresistentes, o tempo para a correção do tratamento antimicrobiano é diretamente proporcional à mortalidade (DAIKOS et al., 2014).

Para que potencialmente se reduza a mortalidade desses pacientes é necessário o desenvolvimento de métodos inovadores que permitam a redução do tempo de liberação dos resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos.

Além disso, os métodos validados não avaliam em tempo real a ação bactericida ou bacteriostática do antibiótico frente ao microrganismo. Utilizando um método de leitura mais sensível, a exemplo da citometria de fluxo, é possível uma redução do tempo de incubação para 2 h, contudo é necessária a comparação e validação com a microdiluição em caldo para a avaliação do desempenho, reprodutibilidade e viabilidade para a prática laboratorial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Utilizar os métodos de citometria de fluxo e condutividade elétrica para desenvolver testes de triagem de cepas resistentes a antibióticos e determinar a concentração inibitória mínima em até três horas.

3.2 Objetivos específicos

Utilizar a citometria de fluxo para desenvolver um protocolo que determine a concentração inibitória mínima para polimixina B, amicacina e meropenem em bacilos Gram-negativos.

Validar a concentração inibitória mínima obtida por citometria de fluxo em 50 bactérias isoladas diretamente de frascos de hemoculturas positivas e comparar com os resultados realizados por microdiluição em caldo, determinando a reprodutibilidade e taxas de erro.

Utilizar a citometria de fluxo para desenvolver um método rápido de triagem para detecção de resistência à polimixina B.

Utilizar a condutividade elétrica para desenvolver um método rápido para detecção de resistência à polimixina B.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Isolados

Para os testes iniciais e padronização das técnicas foram utilizadas as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* 25923, um isolado de *Escherichia coli* MCR-1 3313 (com CIM para polimixina de 4mg/L) e um isolado sensível de *Klebsiella pneumoniae* J9243971 (com CIM para polimixina de 0,125 mg/L) e *Proteus mirabilis* J9103900 (CIM para polimixina > 128 mg/L). Posteriormente foram utilizados 51 concentrados de bactérias Gram negativas isoladas diretamente de hemoculturas positivas para validação da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo.

4.1.2 Equipamentos

Para os ensaios de citometria de fluxo foram utilizados os citômetros de fluxo FACS Canto II BD Biosciences com três lasers (azul 488nm, vermelho 633nm e violeta 405nm) e oito cores (4-2-2). FACS Aria II BD Biosciences (laser azul 488nm).

Para os ensaios de condutividade foi utilizado o microcontrolador ESP32 de 12 bits Espressif, utilizando o software IDE Arduino para a inserção do algoritmo.

4.1.3 Reagentes para citometria de fluxo

Os reagentes utilizados foram caldo Mueller Hinton II – Difco (cátion ajustado). Iodeto de propídio (concentração final de 48 µM), laranja de tiazol (concentração final de 420 nM) e esferas (beads) - BD Biosciences (BD™ *Cell Viability kit – Live and Dead Cell discrimination* - Cód: 349480). Os antibióticos fornecidos pela Sigma Aldrich: polimixina B (PHR 1595), meropenem (PHR 1772) e amicacina (PHR 1860).

4.2 Testes de sensibilidade

4.2.1 Microdiluição em caldo

4.2.1.1 Preparo do inóculo

As suspensões bacterianas foram preparadas utilizando solução fisiológica com concentração de 0,9% de Cloreto de Sódio (NaCl) e colônias isoladas em placas de ágar incubadas por aproximadamente 18-24 horas ou concentrados bacterianos provenientes de hemoculturas positivas. A turbidez de cada suspensão foi ajustada para que coincidisse com a turbidez óptica da escala 0,5 de McFarland (equivalente à concentração de 1,5 x 10^8 UFC/mL) utilizando o equipamento DensiCHECK™ (bioMérieux). Para o inóculo foi realizada uma diluição 1:100 em Caldo Mueller Hinton para atingir a concentração de 1,5 x 10^6 UFC/mL, de maneira que quando inoculada no experimento atingisse aproximadamente 7,5 x 10^5 UFC/mL.

4.2.1.2 Preparo das Placas

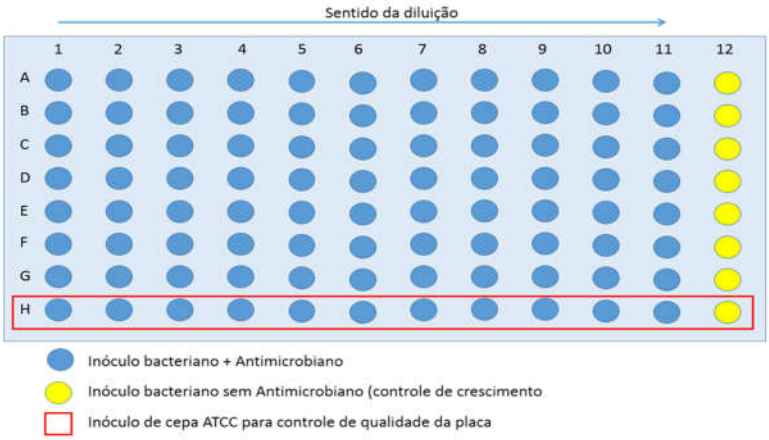
O caldo Mueller Hinton II (cátion ajustado) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e esterilizado. Foram distribuídos 50 µL de caldo em cada um dos poços da placa padrão de 96 poços com fundo em “U”, com exceção da primeira coluna, que foi deixada vazia.

Foram dispensados 100 µL de solução com antibiótico (polimixina B a 64 mg/L, Amicacina a 128 mg/L e Meropenem a 128 mg/L) diluído em caldo Mueller Hinton na primeira coluna e realizada uma diluição seriada até a 11ª coluna, deixando o volume de 50 µL em cada poço, de modo que as concentrações após a adição do inóculo fossem de 32 mg/L até 0,03 mg/L para polimixina B e de 64 mg/L até 0,06 mg/L para amicacina e meropenem. A 12ª coluna foi deixada sem antimicrobiano para avaliação de controle de crescimento bacteriano.

4.2.1.3 Inóculo

Foram dispensados em todos os poços 50 µL da suspensão bacteriana previamente ajustada para a concentração de 1,5 x 10^6 UFC/mL em caldo Mueller Hinton (Figura 6).

Figura 6 - Esquema de placa de microdiluição em caldo.



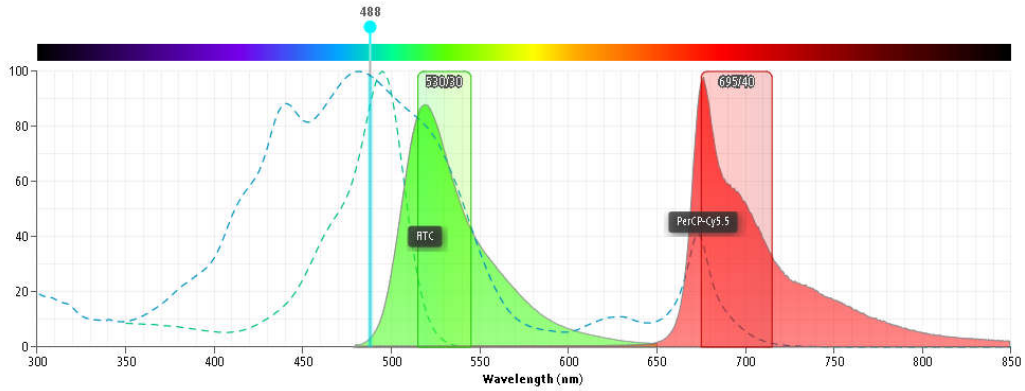
4.2.2 Citometria de fluxo

O equipamento BD FACS Canto II foi utilizado para a análise de citometria de fluxo e o equipamento FACS Aria II para realizar *sorting* bacteriano.

Para a análise inicialmente foram feitos ajustes de tensão para as aquisições em FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) (tamanho e complexidade, respectivamente) detector de fluorescência verde e detector de fluorescência vermelha. Os dados gerados pelos detectores são numéricos e variam de 0 a 262.143. Para a análise, há a necessidade de transformação logarítmica para que a faixa gráfica fique de 10^0 a $10^{5,41}$. Essa configuração é importante para diferenciar o tamanho celular, pois as células bacterianas são do tamanho de estruturas que são consideradas detritos em citometria de células eucarióticas. As análises foram realizadas utilizando o laser azul de 488nm como fonte de excitação, utilizando filtros e detectores para mensurar tamanho, complexidade e a intensidade de luz verde (515 – 545 nm) e luz vermelha (675-715nm) que correspondem ao sinal de emissão dos marcadores laranja de tiazol e iodeto de propídio, respectivamente (Gráfico 2). Dessa

maneira não foi necessário fazer experimentos de compensação de sobreposição de fluorescências.

Gráfico 2 – Visualizador de espectros para citometria de fluxo



Eixo x representa a faixa de comprimento de onda da luz visível em nanômetros (nm) e eixo y representa a intensidade relativa de excitação/emissão de luz em porcentagem (%). Linha Contínua azul paralela ao eixo y em 488nm representa o laser azul. Linha tracejada verde: área excitação para fluorescência verde, linha tracejada azul: área de excitação para fluorescência vermelha. Área FITC representa a área de emissão de luz verde e área PerCP-Cy5.5 representa a área de emissão de luz vermelha. Retângulo verde 530/30 representa o filtro utilizado para detectar somente luz emitida na faixa de 515 – 545 nm e retângulo vermelho 695/40 representa o filtro utilizado para detectar apenas luz emitida na faixa de 675-715nm. Retirado de (BIOSCIENCES, 2019).

O equipamento FACS Canto II foi configurado com os seguintes parâmetros: *threshold*: SSC 200; FSC — 400V, amplificação logarítmica; SSC — 400 V, amplificação logarítmica; FITC (fluorescência verde para laranja de tiazol)— 550 V, amplificação logarítmica; PerCP-Cy5.5 (fluorescência vermelha para iodeto de propídio)— 480 V, amplificação logarítmica; Compensação — nenhuma.

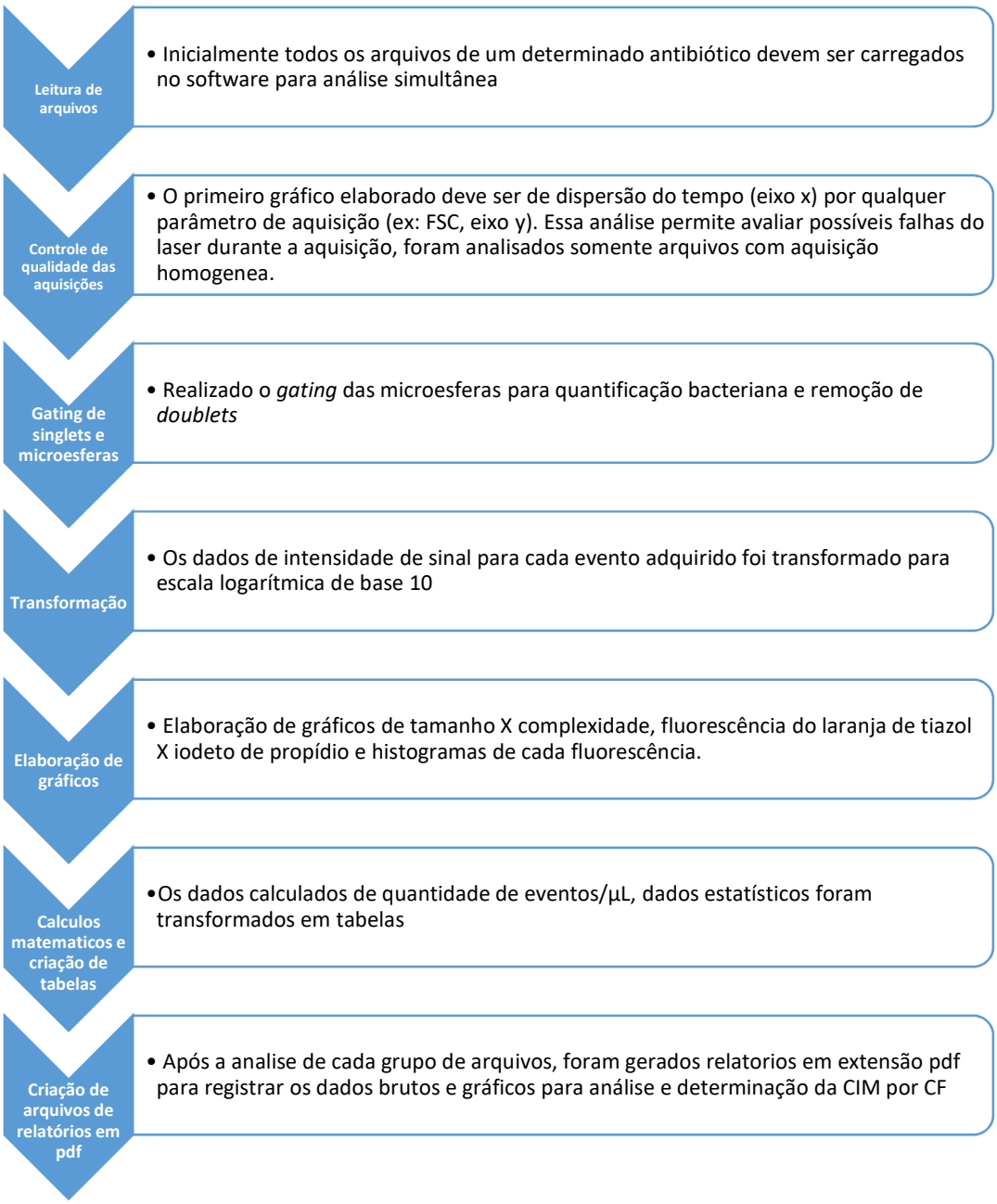
O equipamento FACS Aria II foi configurado com os seguintes parâmetros: *threshold*: SSC 200; FSC — 400V, amplificação logarítmica; SSC — 400 V, amplificação logarítmica; FITC — 750 V, amplificação logarítmica; PerCP — 520 V, amplificação logarítmica; Compensação — nenhuma. O dispositivo *nozzle* com medida de 85µm foi utilizado para o experimento de *sorting*.

A citometria de fluxo gera um tipo de arquivo de extensão “.FCS”, o qual é uma estrutura de dados que armazena todas as informações referentes ao experimento, a exemplo do nome do software de aquisição, equipamento utilizado, data, horário, canais utilizados e a matriz de dados dos diferentes sinais adquiridos para cada evento (tamanho, complexidade, fluorescências e área, largura e altura do sinal). As análises dos dados gerados por citometria inicialmente foram analisados pelo software FlowJo X. Contudo, após a padronização da CIM por CF, foram gerados 12 arquivos de citometria para cada antibiótico e que devem ser comparados simultaneamente,

fazendo com que a análise pelo software FlowJo X fosse mais demorada e manual. Houve a necessidade de utilização de ferramentas de bioinformática para análise dos dados e foi construído um algoritmo em linguagem R capaz de acessar todos arquivos FCS da CIM simultaneamente e extrair informações de quantidade de microesferas, quantidade de eventos adquiridos, transformações logarítmicas, *gating*, cálculos matemáticos e geração de diversos tipos de gráficos de maneira automatizada (algoritmo descrito no apêndice). Para construção do algoritmo em linguagem R, foram utilizadas as seguintes bibliotecas: flowCore, ggcyto, stringr e ggplot2 (ELLIS et al., 2019; VAN et al., 2018; WICKHAM, 2016;2019).

Independentemente do software de análise o Fluxograma 1 foi utilizado para que os resultados obtidos fossem padronizados.

Fluxograma 1 - Fluxograma de análise de arquivos de citometria



4.2.2.1 Avaliação da aquisição de diferentes gêneros bacterianos

As bactérias testadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foram preparadas as suspensões bacterianas equivalentes à escala de McFarland 0,5 (1,5 x 10^8 bactérias por mL) utilizando o equipamento

DensiCheck™ (bioMérieux) em solução fisiológica e imediatamente adquiridas no equipamento BD FACS Canto II.

4.2.2.2 Avaliação da influência da densidade do inóculo nas aquisições

A bactéria testada foi *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram preparadas as suspensões bacterianas com concentrações de $1,5x10^5$ bactérias/mL, $7,5x10^5$ bactérias/mL, $1,5x10^6$ bactérias/mL e $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, em solução fisiológica, utilizando o equipamento DensiCheck™ (bioMérieux) e imediatamente adquiridas no equipamento BD FACS Canto II.

4.2.2.3 Avaliação da influência do tempo entre o preparo da suspensão e marcação sobre tamanho e complexidade

Foram preparados três tubos com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração equivalente a $1,5 \times 10^7$ células/mL, utilizando o equipamento DensiCheck™ (bioMérieux) em solução fisiológica e sequencialmente uma diluição 1:10 em solução fisiológica. O primeiro tubo foi preparado imediatamente antes da aquisição; o segundo foi preparado e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos e uma terceira suspensão foi preparada e imediatamente marcada com os corantes iodeto de propídio (vitalidade – marca DNA de células com membranas alteradas) e laranja de tiazol (viabilidade – marca todas as células bacterianas).

4.2.2.4 Avaliação da influência do Tween 20 no tamanho e complexidade

O Tween 20, segundo o fabricante dos marcadores de viabilidade e vitalidade, pode ser utilizado para auxiliar a marcação celular. Foi feita uma avaliação com Tween 20 para avaliar a influência no tamanho e complexidade das bactérias. Foi preparado 1 tubo com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração equivalente $1,5x10^8$ células/mL, utilizando o equipamento DensiCheck™ (bioMérieux) em solução fisiológica. Foi acrescido Tween 20 e marcado com os corantes de viabilidade e vitalidade, de acordo com o estabelecido pelo fabricante.

4.2.2.5 Teste de marcação com os corantes de vitalidade e viabilidade

Foram preparados dois tubos com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração equivalente 1,5 x 10^8 células/mL, utilizando o equipamento DensiCheck™ (bioMérieux) em solução fisiológica estéril. A avaliação dos corantes foi feita em dois tubos, um contendo apenas a suspensão bacteriana e outro com a adição dos corantes. A análise foi realizada utilizando os canais de fluorescência do equipamento: laranja de tiazol (fluorescência verde) x iodeto de propídio (fluorescência vermelha).

4.2.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo

4.2.2.6.1 Ensaio piloto para padronização da técnica

Foi realizado o teste de sensibilidade por microdiluição em caldo de forma semelhante à metodologia utilizada em placa, contudo foram feitas algumas modificações. A diluição foi realizada em placas com volume final de 200 µL por poço. A incubação foi feita à 37˚C sob agitação (300 rpm) por 1 hora e 45 minutos. Após a incubação, 100 µL foram transferidos para outra placa contendo 1µL de laranja de tiazol (concentração final de 420 nM), 1µL iodeto de propídio (concentração final de 48 µM) e 10µL de microesferas (BD *liquid count beads*) por poço. A primeira placa foi incubada em estufa até atingir 18 horas de incubação para a leitura e a segunda placa foi incubada por mais 15 minutos, nas mesmas condições iniciais. Após a incubação o volume de cada poço foi transferido para tubos de poliestireno utilizados em citometria (tubos específicos para o equipamento FACS Canto II). O iodeto de propídio é um indicador de vitalidade – marca DNA de células com membranas alteradas e laranja de tiazol um indicador de viabilidade – marca todas as células bacterianas.

Os eventos foram obtidos de modo que a contagem de microesferas chegasse à 3.000 eventos para os antibióticos amicacina e polimixina e 1000 eventos para meropenem. Os dados obtidos foram analisados em algoritmo desenvolvido em linguagem R, utilizando biblioteca FlowCore – Bioconductor (ELLIS et al., 2019) para arquivos com extensão “.FCS”. (Vide Apêndice). Para o cálculo do valor absoluto da população bacteriana foi utilizada uma equação que leva em consideração a contagem de microesferas, contagem bacteriana e fator de diluição (Equação 1).

Equação 1 – Equação para determinação de valor absoluto de populações bacterianas analisadas por citometria de fluxo.

$$\frac{\textbf{Número de eventos na região contendo a população celular}}{\textbf{Número de eventos na região contendo a população de esferas}} \; \boldsymbol{X} \; \frac{\textbf{Número de Beads por teste}}{\textbf{Volume do teste}} \; \boldsymbol{X\ Fator\ de\ diluição\ = Concentração\ da\ população\ bacteriana}$$

4.2.2.6.2 Ensaio de *sorting* para análise de viabilidade e vitalidade bacteriana e definição da interpretação da CIM por CF

O experimento de citometria de fluxo com *sorting* foi realizado no equipamento FACS Aria II utilizando a cepa padrão *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e polimixina B. A diluição em caldo foi preparada da mesma maneira que a descrita no item 4.2.1, mas com um volume final de 700µL por concentração de antibiótico. A incubação foi feita em agitador por 1h e 45 minutos à 37 ºC. Uma alíquota de 100 µL de cada concentração foi transferida para uma placa de 96 poços e incubada em estufa à 37 ºC, para análise visual após 18 horas de incubação. Os 600 µL restantes foram adicionados de microesferas, iodeto de propídio e laranja de tiazol nas mesmas proporções descritas anteriormente. As concentrações variaram de 0,03 a 4 mg/L de polimixina B, além de controle de crescimento e controle de esterilidade do meio (este adquirido propositalmente ao final do *sorting*). O *flow rate* durante a aquisição e *sorting* foi de 6.0 (equivalente ao fluxo médio). Foram marcados 3 *gates* para a análise de viabilidade: eventos com sinal menor que 3 para ambos os marcadores foram considerados bactérias viáveis; eventos com sinal maior que 3 para a fluorescência do laranja de tiazol foram considerados bactérias lesionadas e eventos com sinal maior que 3 para a fluorescência do marcador iodeto de propídio foram considerados bactérias inviáveis. O tubo considerado com maior probabilidade de crescimento bacteriano (bactérias viáveis) foi configurado para que ficasse o mais distante dos tubos com menor probabilidade de crescimento bacteriano (bactérias lesionadas e inviáveis), para minimizar a contaminação cruzada. As aquisições e *sorting* duram cerca de 7 minutos para cada concentração testada. Após o *sorting*, 1 µL das suspensões bacterianas adquiridas de cada *gate* e das diferentes concentrações foram semeadas em ágar sangue com o objetivo de obter a contagem de colônias. As placas foram incubadas por 18 horas a 37ºC e os ensaios foram realizados em

triplicata. A média da contagem de colônias e os dados obtidos durante o *sorting* foram comparados.

4.2.2.6.3 Ensaio de reprodutibilidade da determinação da CIM por CF para polimixina B e meropenem

Para a avaliação da reprodutibilidade da determinação da CIM por CF, controle de qualidade do meio de cultura (concentrações de cátions bivalentes), avaliação da concentração bacteriana da escala de McFarland e avaliação concentração do antibiótico, foram realizados 20 testes consecutivos com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram preparadas 5 suspensões independentes da cepa padrão equivalentes à escala 0,5 de McFarland e foi realizado o teste conforme descrito anteriormente, utilizando placas de 96 poços e volume de 200μL por poço. Após a incubação de 1h45 sob agitação a 300 rpm e temperatura de 37ºC, 100uL foram transferidos de cada poço para uma placa, previamente preparada com a proporção de microesferas, laranja de tiazol e iodeto de propídio. A placa com os marcadores foi incubada por mais 15 minutos e imediatamente adquiridas. A placa inicial foi incubada em estufa à 37ºC até atingir 18h de incubação para leitura visual. A interpretação dos resultados foi feita seguindo os pontos de corte para a cepa em estudo, estabelecidos pelo BrCast para polimixina B (entre 0,25 a 2 mg/L) e meropenem (entre 0,03 a 0,25 mg/L) (EUCAST; BRCAST, 2018).

4.2.2.6.4 Validação da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo em concentrados bacterianos de hemoculturas positivas

Para a validação da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo foram utilizados concentrados bacterianos de hemoculturas positivas. O isolamento dos concentrados bacterianos foi realizado de acordo com protocolo previamente descrito por (SECO et al., 2019). Após a positivação da hemocultura, um volume de 3 ml foi transferido para tubo cônico de 15mL (HOYOS-MALLECOT et al., 2014; SECO et al., 2019). Os tubos foram centrifugados a 600 x g por 10 minutos para a separação de células eucariotas e a seguir alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram transferidas para microtubos e submetidas a nova etapa de centrifugação a 20.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 mL de solução salina de cloreto de sódio (0,9%) estéril em cada tubo e homogeneizado em agitador, seguido de centrifugação a 20.000 x g por 1 minuto. O

sedimento foi utilizado para a identificação bacteriana por Maldi-ToF de acordo com as recomendações do fornecedor e preparo da escala 0,5 de McFarland. O protocolo para a determinação da concentração inibitória mínima foi realizado conforme descrito nos itens anteriores. Foram testadas 51 amostras provenientes de hemocultura positivas com bactérias Gram negativas, uma cepa padrão *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sensível aos antibióticos testados e uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 resistente ao meropenem.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo método convencional por microdiluição em caldo. Os resultados foram interpretados de acordo com o guia do FDA (FDA, 2009), que orienta para comparação e validação de testes de sensibilidade a antibióticos. Em relação à concordância das concentrações (concordância essencial), foi aceito como igualdade resultados idênticos ou uma diluição acima ou abaixo da microdiluição em caldo (padrão ouro). E os cálculos dos erros foram realizados de acordo com as equações 2,3,4 e 5. Os resultados também foram subdivididos em categorias (sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência) e os resultados comparados com a CIM obtida pelo padrão ouro. Os resultados falsamente resistentes (resultado sensível pelo método ouro) foram interpretados como erros maiores ou graves (*Major errors*), os resultados falsamente sensíveis (resultado de resistência pelo método ouro) foram interpretados como erros muito maiores ou muito graves (*Very Major errors*) e os resultados que mudaram a categoria I (sensível aumentando exposição) para sensibilidade ou resistência e vice-versa foram interpretados como erros menores (*Minor errors*). De acordo com o documento do FDA, só serão aceitos valores inferiores ou iguais a 1,5% de erros muito maiores e valores inferiores ou iguais a 3% de erros maiores, e concordância categórica >89,99%. Os resultados de concordância categórica menores que 90% só poderão ser aceitos caso a concordância essencial seja ótima e com maioria das discrepâncias categóricas classificadas como erros menores (FDA, 2009).

Equação 2 – Fórmula para cálculo dos essenciais

$$Erros\ essenciais = \frac{quantidade\ de\ erros\ essenciais}{quantidade\ de\ bactérias\ testadas} X\ 100$$

Equação 3 – Fórmula para cálculo dos erros menores

$$Erros\ menores = \frac{quantidade\ de\ erros\ menores}{quantidade\ de\ bactérias\ testadas}\ X\ 100$$

Equação 4 – Fórmula para cálculo dos erros maiores

$$Erros\ maiores = \frac{quantidade\ de\ erros\ maiores}{quantidade\ de\ bactérias\ sensíveis}\ X\ 100$$

Equação 5 – Fórmula para cálculo dos erros muito maiores

$$Erros\ muito\ maiores = \frac{quantidade\ de\ erros\ muito\ maiores}{quantidade\ de\ bactérias\ resistentes}\ X\ 100$$

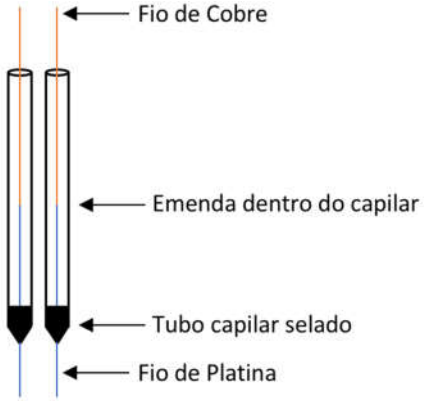
4.2.2.7 Teste rápido para triagem de bactérias resistentes à polimixina B

Foram selecionadas duas cepas resistentes à polimixina B. Uma *Escherichia coli* MCR-1 3313 e um *Proteus mirabilis* J9103900. Foram preparadas as suspensões bacterianas equivalentes à escala de McFarland 0,5. A partir desta suspensão, foram realizados três testes: um sem polimixina, um com polimixina na concentração de 50 mg/L e outro com polimixina à 500 mg/L. Os corantes iodeto de propídio (concentração final de 48 µM) e laranja de tiazol (concentração final de 420 nM) e após a incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas a aquisições no citômetro.

4.2.3 Condutividade elétrica de suspensões bacterianas

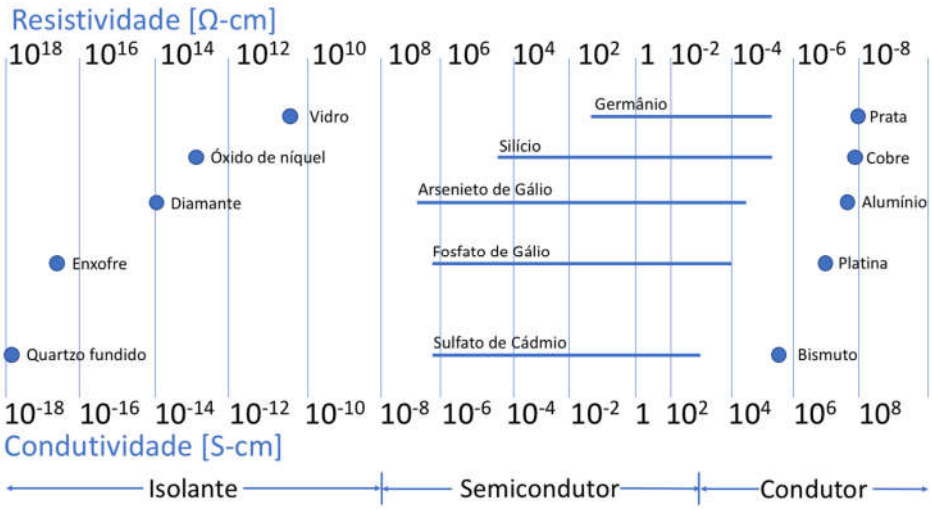
Para o teste de condutividade bacteriana, foi construída uma *probe* para a inserção na amostra, a qual permitisse que a distância entre eletrodos e profundidade na amostra fossem sempre constantes (Figura 7). A *probe* foi construída com fio de platina, por apresentar uma boa condutividade e baixa resistência (Figura 8). O fio de platina foi ligado a um fio de cobre para ser conectado ao microcontrolador. A emenda dos fios foi inserida dentro de um tubo capilar vedado com calor para evitar contato da emenda com a amostra ou eventual oxidação do cobre. O capilar também atua como isolante elétrico por ser de vidro (Figura 8).

Figura 7 – Probe para o teste de condutividade elétrica



Esquema de *probe* fabricada com tubo capilar (vidro - isolante elétrico), fio de platina (azul - baixa resistividade e alta condutividade) e fio de cobre (laranja - interno ao capilar) que leva o sinal da amostra até o microcontrolador.

Figura 8 – Diagrama comparativo de condutividade e resistência elétrica de diversos materiais



Fonte: Adaptado de (BRITANNICA, ENCYCLOPAEDIA 2018).

O microcontrolador escolhido para realização das leituras foi o equipamento ESP32 (Figura 9), devido ao baixo custo e rapidez de processamento, além de ser um controlador que possui um conversor analógico para digital de 12 bits. A faixa de leitura analógica é maior (0 – 4095) quando comparado a outros microcontroladores mais comuns, a exemplo do Arduino Uno que é de 10bits (0 – 1023).

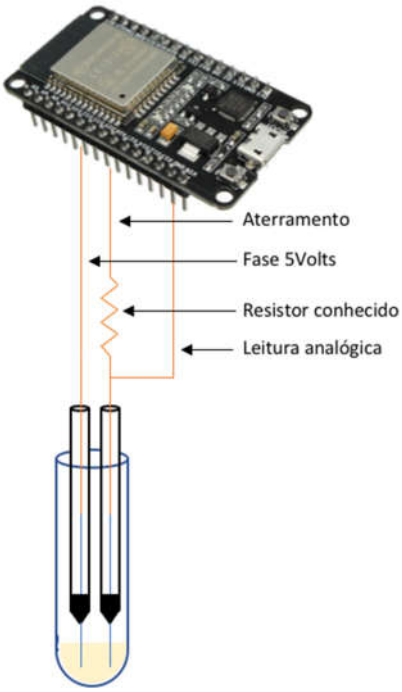
As análises foram feitas com suspensões bacterianas íntegras e sonicadas. Posteriormente foram aferidas as suspensões bacterianas imediatamente preparadas (tempo 1), imediatamente após a adição de polimixina B em altas concentrações

(tempo 2) e após 15 minutos de incubação (tempo 3). A diferença de medidas entre os tempos é a mudança da condutividade elétrica, a qual pode ser um indicativo de lise bacteriana e consequentemente possibilitando categorizar se a bactéria é sensível àquela concentração do antibiótico quando comparados os tempos 2 e 3.

Figura 9 – Microcontrolador Espressif ESP32

O algoritmo utilizado no microcontrolador foi feito para aferir a resistência do sistema, como um simples Ohmímetro (equipamento que afere a resistência), com um resistor conhecido de 10 KOhm. Sendo possível medir a resistência da amostra (recíproca da condutividade da amostra) pela lei de Ohm, no qual a Intensidade = Tensão/Resistência (Equação 6). A Figura 10 mostra o esquema de montagem do equipamento para a leitura da condutividade.

Figura 10 – Esquema de ligação do microcontrolador para leitura de condutividade em suspensões bacterianas



As equações a seguir mostram a lógica aplicada ao microcontrolador para o medir a resistência desconhecida.

Vx: Voltagem desconhecida, aferida pela porta analógica do microcontrolador
I: Intensidade
R: Resistência de 10.000 Ohm (Resistor conhecido)
X: variável que representa a resistência desconhecida
V: Tensão de 3,3 Volts enviada pelo microcontrolador

Equação 6 - Equação da Lei de Ohm:

$$I = \frac{V}{R}$$

Equação 7 - Decomposição da Lei de Ohm no resistor desconhecido X, temos:

$$V - Vx = XI$$

Cálculo substituindo I na equação 7 pela equação 6:

$$V - Vx = X\frac{Vx}{R}$$

$$V = X\frac{Vx}{R} + Vx$$

$$V = \left(\frac{X}{R} + 1\right)Vx$$

$$\frac{V}{Vx} = \frac{X}{R} + 1$$

$$\frac{X}{R} = \frac{V}{Vx} - 1$$

$$X = \frac{VR}{Vx} - R$$

Para a estabilização da leitura analógica do microcontrolador, 21.000 ciclos são realizados, para a estabilização da leitura e foi estabelecida uma média flutuante das últimas 1.000 medidas para aumentar a exatidão da resistência da suspensão bacteriana.

4.2.3.1 Teste com bactérias sonicadas

Os testes com bactérias foram inicialmente realizados com suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* em solução fisiológica ajustadas para a escala de McFarland 4,0 utilizando o equipamento DensiCheck™ (bioMérieux). A análise foi realizada para cada cepa com a bactéria íntegra e bactérias rompidas por processo de sonicação, o qual foi executado no equipamento Branson Digital Sonifier modelo 102C com potência ajustada para 50%. Cada tubo foi mantido em gelo e submetido a pulsos de 2 segundos ligado e 2 segundos desligado por 5 minutos.

4.2.3.2 Teste de triagem com bactérias expostas à polimixina B

Os testes com bactérias foram inicialmente realizados com suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* J9103900 em solução fisiológica ajustadas para a escala de McFarland 4,0 utilizando o equipamento DensiCheck™ da bioMérieux. O experimento foi conduzido utilizando o volume de 90µL de suspensão bacteriana e 10µL de solução de polimixina B à 20mg/L de forma com que a concentração final fosse de 2mg/L, por se tratar do ponto de corte, segundo o BrCast, para esse antibiótico. As medidas foram realizadas da suspensão bacteriana recém preparada, imediatamente após a adição de polimixina B e após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente.

4.2.3.3 Teste de reprodutibilidade de medida com polimixina B e sulfato de sódio

Testes adicionais foram realizados para avaliar a reprodutibilidade de medidas das soluções de sulfato de polimixina B e sulfato de sódio. Foram preparados 20 tubos com solução de polimixina B em uma concentração de 2mg/L e 20 tubos com solução de sulfato de sódio na mesma concentração. Foi realizada uma medida de cada tubo

e gráficos do tipo *boxplot* foram elaborados para avaliação da distribuição dos valores aferidos em cada tubo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

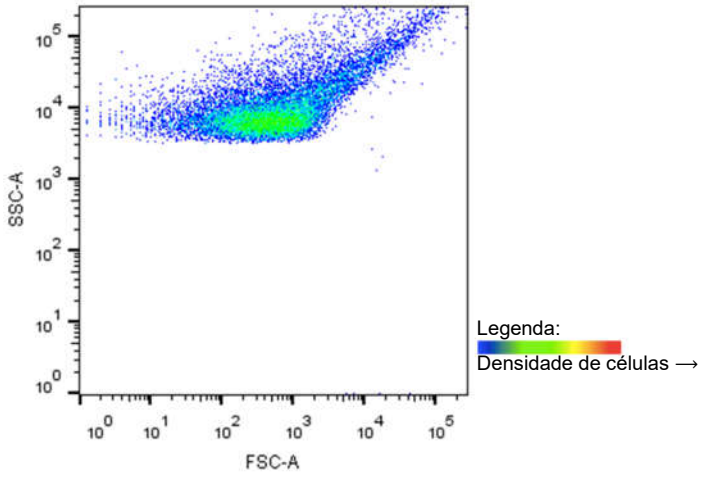
5.1 Citometria de fluxo

5.1.1 Avaliação da aquisição de diferentes gêneros bacterianos

Duas suspensões bacterianas, com turbidez equivalente à escala de McFarland 0,5 (equivalente a uma concentração bacteriana de aproximadamente 1,5 x 10^8 bactérias por mL) foram preparadas para o início das aquisições. As bactérias preparadas para as primeiras aquisições foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ambas suspensões bacterianas foram testadas inicialmente sem exposição aos corantes.

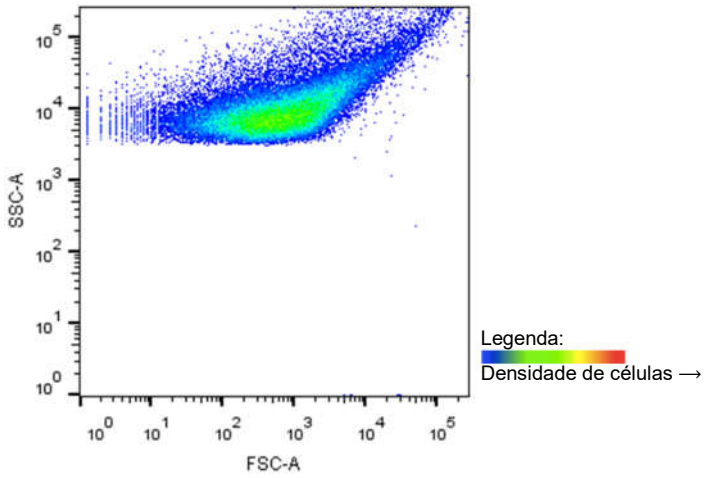
Os gráficos 3 e 4 evidenciam que apesar da estrutura física diferente das duas cepas testadas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), a aquisição foi muito parecida em relação ao centro da dispersão de tamanho e complexidade. Os gráficos foram configurados com cores que simulam a densidade populacional para cada evento, quanto mais fria (azul) menos eventos no mesmo ponto do plano cartesiano e quanto mais quente (vermelha) maior a quantidade de eventos, conforme legendas.

Gráfico 3 – Aquisição de suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Aquisição de suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 eventos/mL. Gráficos de tamanho e complexidade.

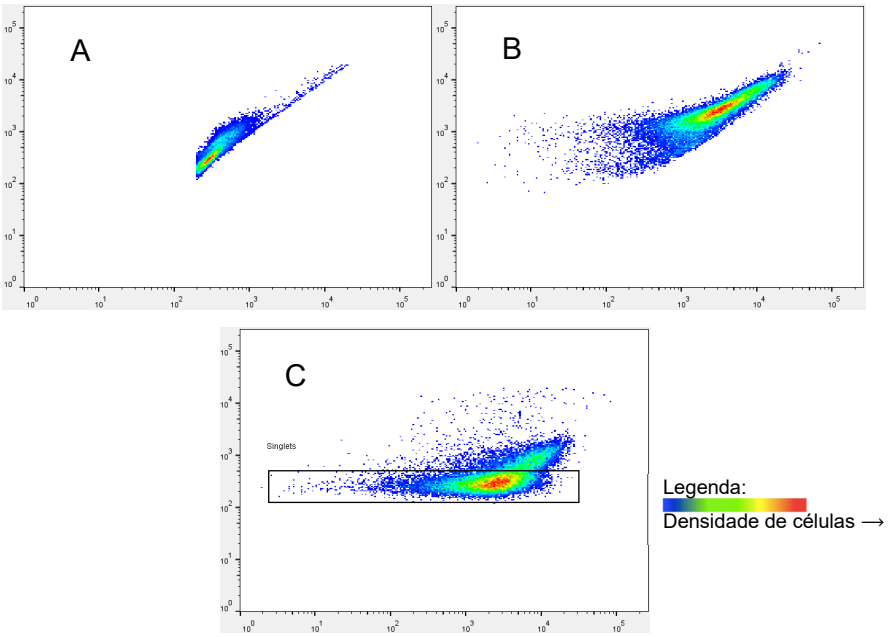
Gráfico 4 – Aquisição de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922



Aquisição de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 eventos/mL. Gráficos de tamanho e complexidade.

A análise inicial da dispersão FSC x SSC foi baseada em que FSC pode ter uma correlação direta com tamanho e SSC pode referir-se ao peso seco, conteúdo proteico ou mesmo ao volume celular (MULLER; NEBE-VON-CARON, 2010). O resultado das primeiras aquisições mostrou que há uma população que tende a formar uma ponta na dispersão. Tal subpopulação pode se tratar de *doublets* (eventos duplos ou agregados) ou bactérias que estão em intensa multiplicação e provavelmente com tamanho e volume alterados em relação ao centro da dispersão (MULLER; NEBE-VON-CARON, 2010). As maneiras mais tradicionais em citometria de fluxo para a eliminação de *doublets* é fazendo correlações entre área(A), altura(H) ou largura(W) dos sinais obtidos de cada evento, a exemplo de em SSC-A x SSC-H e FSC-A x FSC-H (BURT HOUTZ; JOE TROTTER; SASAKI, 2004), contudo, neste trabalho não foi possível separar os *singlets* (eventos únicos) utilizando tais técnicas, portanto, a maneira considerada mais adequada foi selecionando um *gate* abaixo da ponta formada na dispersão (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Exemplo de eliminação de *doublets* em suspensões bacterianas

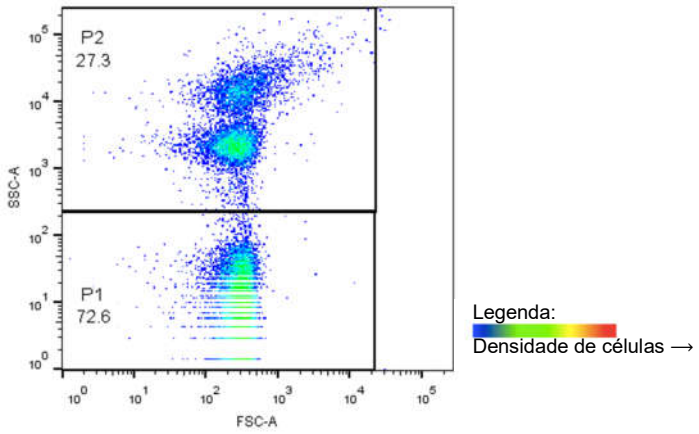


A) SSC-H x SSC-A e B) FSC-A x FSC-H. Os *singlets* neste caso deveriam ter uma correlação linear entre A e H, o que não fica muito evidente nos casos dos gráficos A e B. C) FSC-A x SSA-A, mostra o *gate* separando a dispersão central da ponta que foi considerada uma subpopulação contendo eventos alterados com tamanho e volume celular (considerados como *doublets*).

5.1.2 Avaliação da influência da densidade do inóculo nas aquisições

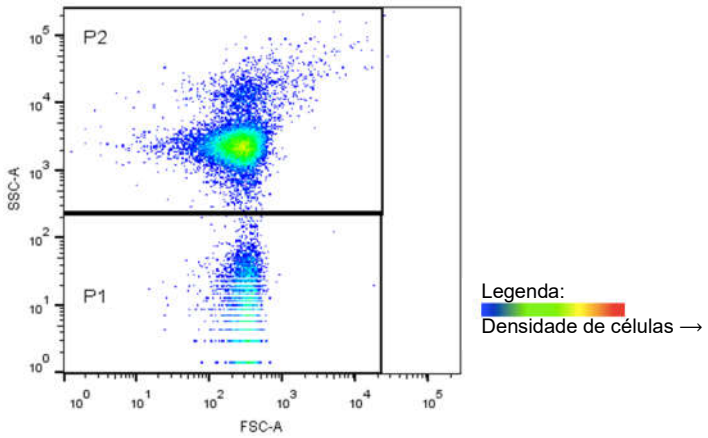
A quantidade de bactérias também foi uma variável testada para avaliar a eficácia do citômetro em contar células de pequena dimensão. Foram testadas as concentrações de 1,5 x 10^5 células/mL, 7,5 x1 0^5 células/mL, 1,5 x 10^6 células/mL e 1,5 x 10^8 células/mL, cujos resultados estão dispostos nos gráficos 6, 7, 8 e 9 respectivamente. Quanto menor a quantidade de células, maior o tempo de aquisição, o que pode ser corrigido com a velocidade do fluxo (baixa, média ou alta). Isso faz com que o tempo de aquisição seja o mesmo independentemente da quantidade de bactérias, no entanto, quanto maior o fluxo, menor a resolução, evidenciando uma população um pouco mais complexa observada no gráfico 4. O gate marcado como P1 foi considerado eventos provenientes de detritos bacterianos ou ruídos, e posteriormente foi configurado um *threshold* (limite) em SSC com valor de 200 (2,3 em escala log de base 10) para eliminar tais eventos das aquisições.

Gráfico 6 – Aquisição para avaliar quantidade de bactérias em suspensão 1,5x10^5 eventos/mL



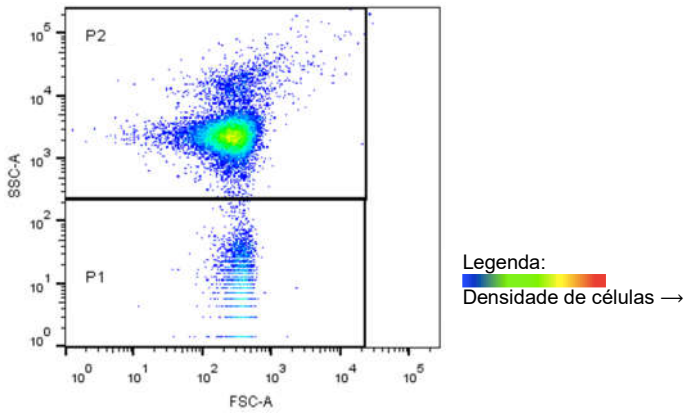
Aquisição de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^5 eventos/mL. Gráficos de tamanho e complexidade. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

Gráfico 7 – Aquisição para avaliar quantidade de bactérias em suspensão 7,5x10^5 eventos/mL



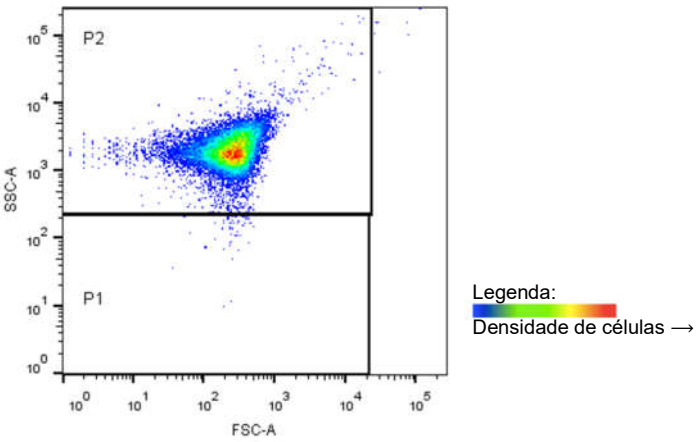
Aquisição de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração de aproximadamente 7,5 x 10^5 eventos/mL. Gráficos de tamanho e complexidade. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

Gráfico 8 - Aquisição para avaliar quantidade de bactérias em suspensão 1,5x10^6 eventos/mL



Aquisição de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^6 eventos/mL. Gráficos de tamanho e complexidade. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

Gráfico 9 - Aquisição para avaliar quantidade de bactérias em suspensão 1, 5x 10^8 eventos/mL



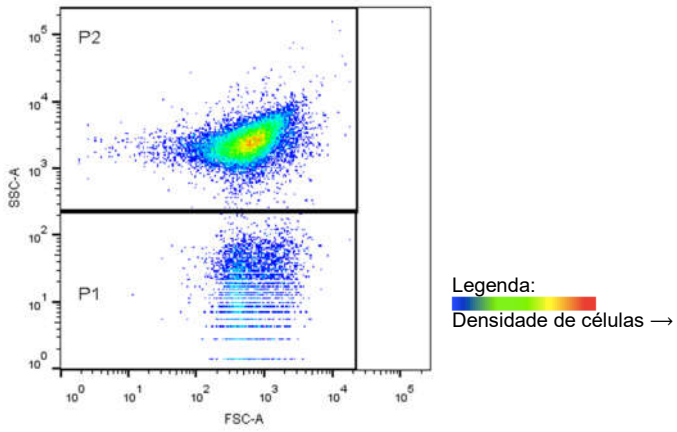
Aquisição de suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 eventos/mL. Gráficos de tamanho e complexidade. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

5.1.3 Avaliação da influência do tempo entre o preparo da suspensão e marcação sobre tamanho e complexidade

Foi avaliado se o tempo entre o preparo da suspensão bacteriana e a aquisição deveria ser uma variável a ser controlada, e se os corantes seriam influenciadores de tamanho e complexidade bacterianos. Tais variáveis foram avaliadas pela necessidade de incubação da suspensão bacteriana com os antibióticos para o teste de sensibilidade. Foram preparados três tubos com concentração bacteriana de

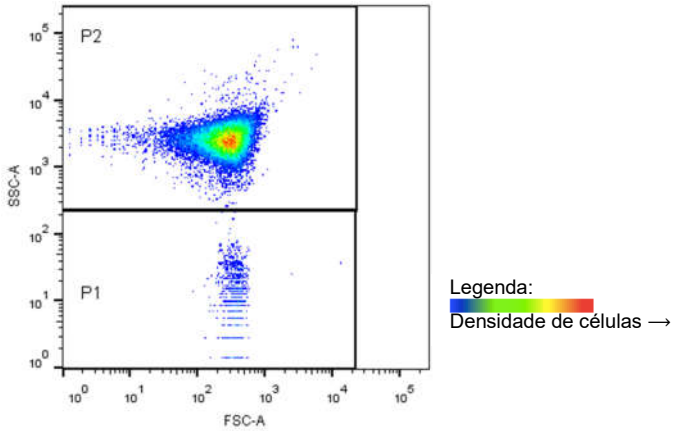
concentração 1,5 x 10^7 células/mL: suspensão preparada imediatamente antes da aquisição; uma suspensão preparada e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e uma terceira suspensão preparada e imediatamente marcada com os corantes iodeto de propídio e laranja de tiazol, cujos resultados estão evidenciados nos, gráficos 10, 11 e 12, respectivamente. Não foram observadas diferenças nas populações adquiridas nem em relação ao tempo, nem em relação à possíveis alterações causadas pelo corante.

Gráfico 10 - Aquisição para avaliar diferença de tempo de aquisição – Bactéria recém preparada



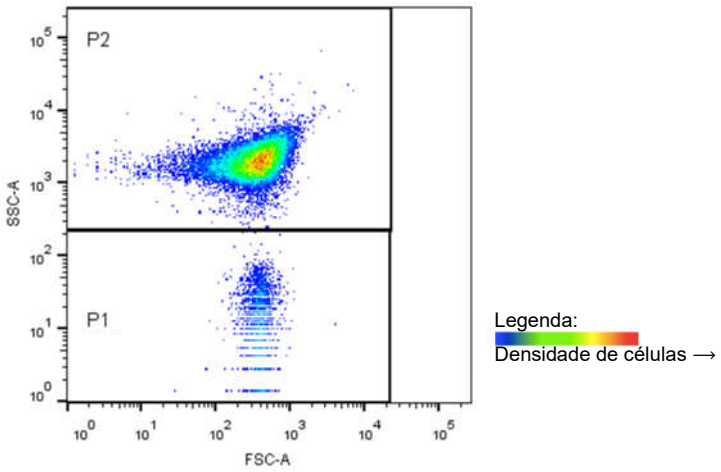
Escherichia coli ATCC 25922 não marcada, suspensão preparada imediatamente antes da aquisição em uma concentração 1,5x10^8 eventos/mL. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

Gráfico 11 - Aquisição para avaliar diferença de tempo de aquisição – Bactéria incubada



Escherichia coli ATCC 25922 não marcada, suspensão preparada e incubada por 15 minutos antes da aquisição em uma concentração 1,5x10^8 eventos/mL. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

Gráfico 12 -Aquisição para avaliar diferença de tempo de aquisição – Bactéria incubada e exposta aos corantes

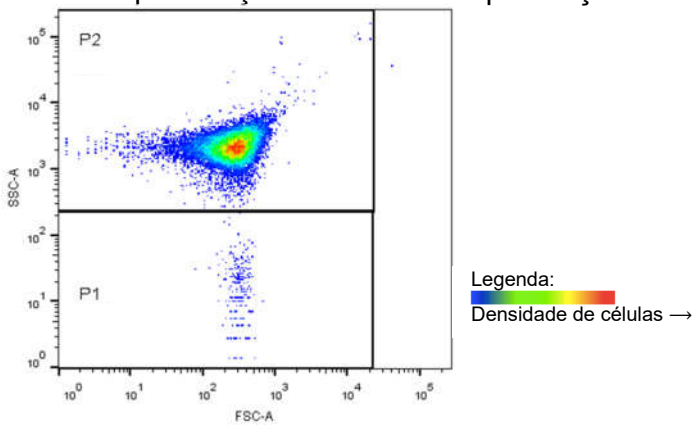


Escherichia coli ATCC 25922 marcada, suspensão preparada e incubada por 15 minutos antes da aquisição em uma concentração 1,5x10^8 eventos/mL. *Gate* P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

5.1.4 Avaliação da influência do Tween 20 no tamanho e complexidade

Foi feita uma avaliação da penetração dos corantes iodeto de propídio e laranja de tiazol: um teste com Tween 20 com a bactéria marcada para avaliar a modificação de tamanho e complexidade. O Gráfico 13 mostra que a adição de Tween 20 não altera tamanho e complexidade quando comparada com aquisições sem esse composto. O Tween 20 pode ser utilizado para melhorar a permeabilidade de membrana bacteriana e melhor penetração dos corantes, no entanto nos ensaios seguintes, não houve a necessidade de utilizar o composto para melhorar a marcação.

Gráfico 13 - Aquisição para avaliar penetração do corante na presença de Tween 20

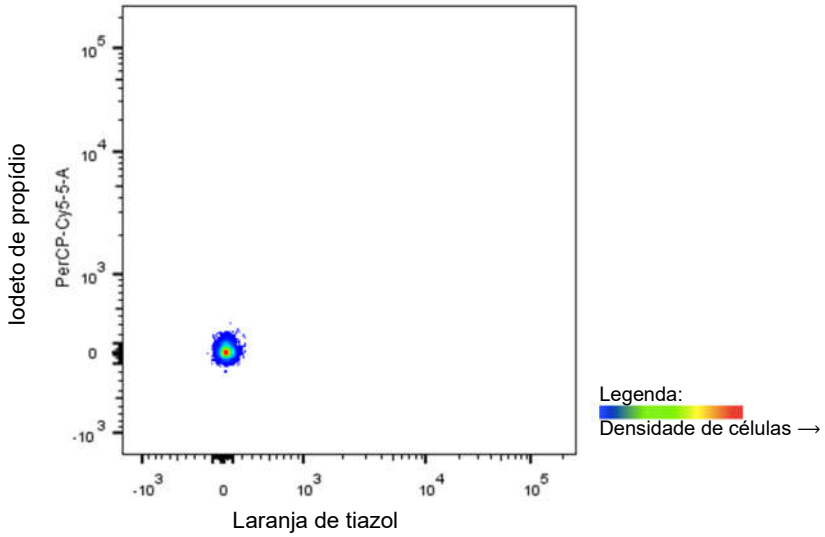


Escherichia coli ATCC 25922 não marcada, suspensão preparada e incubada por 15 minutos antes da aquisição em uma concentração 1,5x10^8 eventos/mL com acréscimo de Tween 20. Gate P1 foi posteriormente eliminado com *threshold* 200 em SSC.

5.1.5 Teste de marcação com os corantes de vitalidade e viabilidade

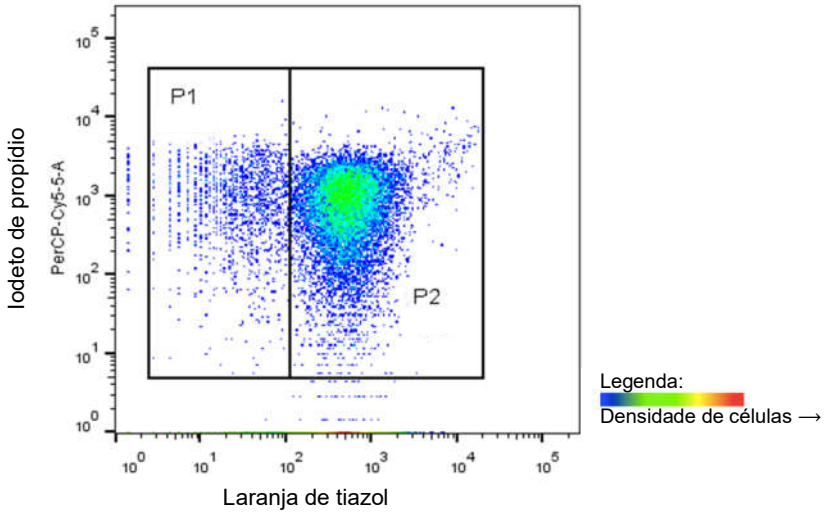
A avaliação dos corantes foi feita em dois tubos, um contendo apenas a suspensão bacteriana e outro feito da mesma maneira com a adição dos corantes. Os gráficos evidenciam a dispersão da marcação dos corantes (por intensidade de fluorescência – escala logarítmica) laranja de tiazol (fluorescência verde) x iodeto de propídio (fluorescência vermelha) em (x,y). No gráfico 14 não há intensidade para os corantes de viabilidade e vitalidade. Quando a suspensão é marcada com os corantes, é possível perceber uma distribuição de eventos com intensidade de fluorescência (Gráfico 15). A suspensão bacteriana, mesmo que preparada recentemente, apresenta uma quantidade de eventos que foram considerados detritos celulares (P1). Para os experimentos com bactérias expostas a antibióticos há a necessidade de conhecer essa quantidade e eliminá-los da análise.

Gráfico 14 – Bactéria não marcada – avaliação da intensidade dos marcadores



Escherichia coli ATCC 25922 sem marcação, suspensão preparada e incubada por 15 minutos antes da aquisição em uma concentração 1,5x10^8 eventos/mL. Gráfico de dispersão avaliando corante laranja de tiazol x iodeto de propídio em (x,y).

Gráfico 15 – Bactéria marcada – avaliação da intensidade dos marcadores



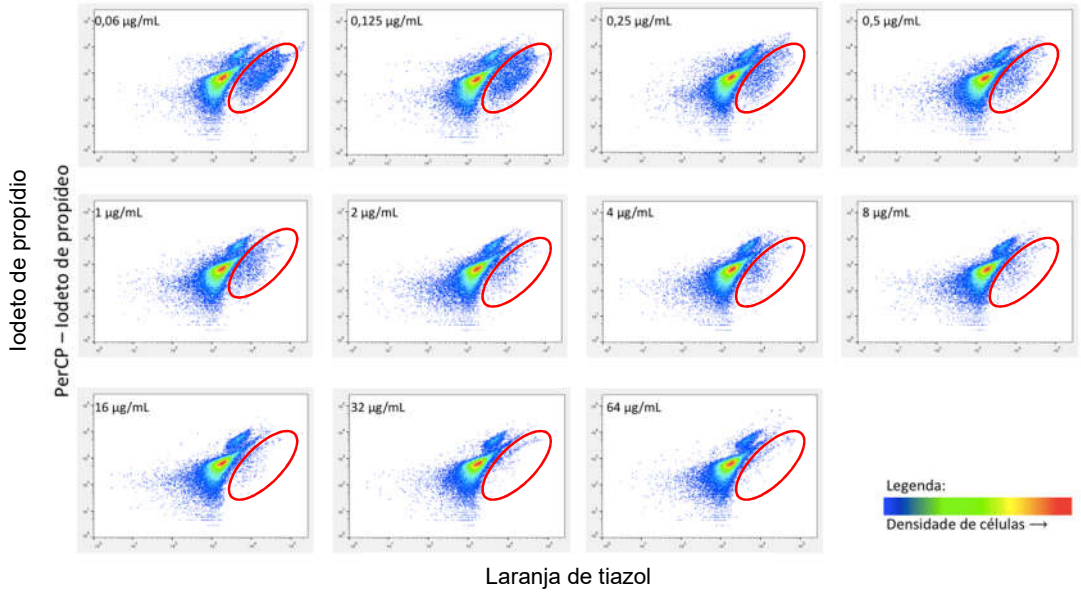
Escherichia coli ATCC 25922 com marcação de corantes laranja de tiazol x iodeto de propídio, suspensão preparada e incubada por 15 minutos antes da aquisição em uma concentração 1,5x10^8 eventos/mL.

5.1.6 Determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo

5.1.6.1 Ensaio piloto para padronização da técnica

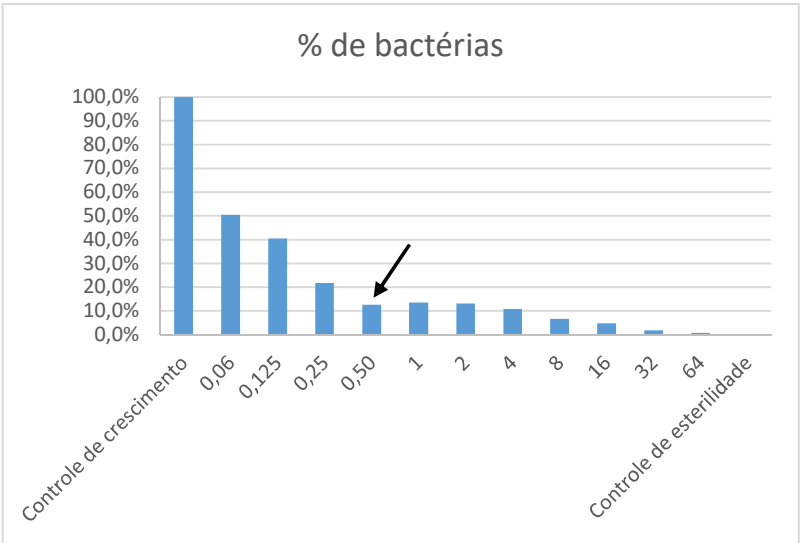
Inicialmente foram realizados ensaios de padronização para a determinação da concentração inibitória mínima utilizando a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 em tubos de poliestireno próprios para o equipamento FACS Canto II, utilizando o meio de cultura caldo MH II (cátion ajustado) e polimixina B, como descrito no item microdiluição em caldo. As concentrações testadas na padronização variaram de 0,06 mg/L até 64 mg/L. Além disso, foram feitos dois controles: controle de esterilidade do meio de cultura e controle de crescimento bacteriano (suspensão bacteriana não exposta ao antibiótico testado). A incubação foi realizada por 1 hora e 30 minutos a 37˚C em agitador a 300 rpm. Imediatamente após a incubação foram realizadas as aquisições. Os ensaios preliminares evidenciaram que há uma população à direita que se altera, sutilmente (elipse vermelha), conforme a concentração do antibiótico aumenta. A quantidade de eventos adquiridos nos controles de crescimento e esterilidade foram consideradas 100% e 0% de crescimento, respectivamente. Desta forma, foi possível calcular as porcentagens da bactéria em cada concentração de polimixina B. Os gráficos 16 e 17 demonstram que a partir da concentração 0,5 mg/L há uma estabilidade na porcentagem de bactérias no *gate* que se altera em função da concentração do antimicrobiano. Provavelmente essa concentração correspondente à concentração inibitória mínima; no entanto uma grande quantidade de eventos foi contada em todos os tubos (inclusive no tubo de controle de esterilidade), podendo ser algum componente presente no meio de cultura ou mesmo contaminação. A análise apenas da quantidade populacional é subjetiva e não permite a avaliação de populações viáveis e inviáveis. Para os testes posteriores o caldo Mueller Hinton cátion ajustado foi esterilizado por filtração em membranas com porosidade de 0,22μm e essa população não foi mais observada.

Gráfico 16 – Primeiro ensaio para determinar a CIM em *Escherichia coli*



Ensaio piloto para a determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo. Note que há uma população à direita que diminui conforme aumenta a concentração da polimixina B (elipse vermelha - *gate* utilizado para o cálculo de porcentagens). A população mais densa se apresentou em todas as aquisições, inclusive no controle de esterilidade.

Gráfico 17 – Determinação da CIM baseado apenas na contagem celular



Determinação da concentração inibitória mínima em *Escherichia coli* ATCC 25922 com polimixina B, incubada por 1 hora e 30 minutos e leitura em citômetro de fluxo. Controle de crescimento considerado 100% (primeira coluna - esquerda) e esterilidade 0% (última coluna - direita). A estabilização da porcentagem acontece a partir de 0,5 mg/L (seta preta), podendo corresponder a concentração inibitória mínima. De acordo com os critérios de interpretação para a cepa em estudo, a variação de CIM pode ser de 0,25 mg/L a 2 mg/L para polimixina B.

Após o experimento piloto, vários testes foram realizados para avaliar a população que se alterava com as diferentes de concentrações do antibiótico. Alguns

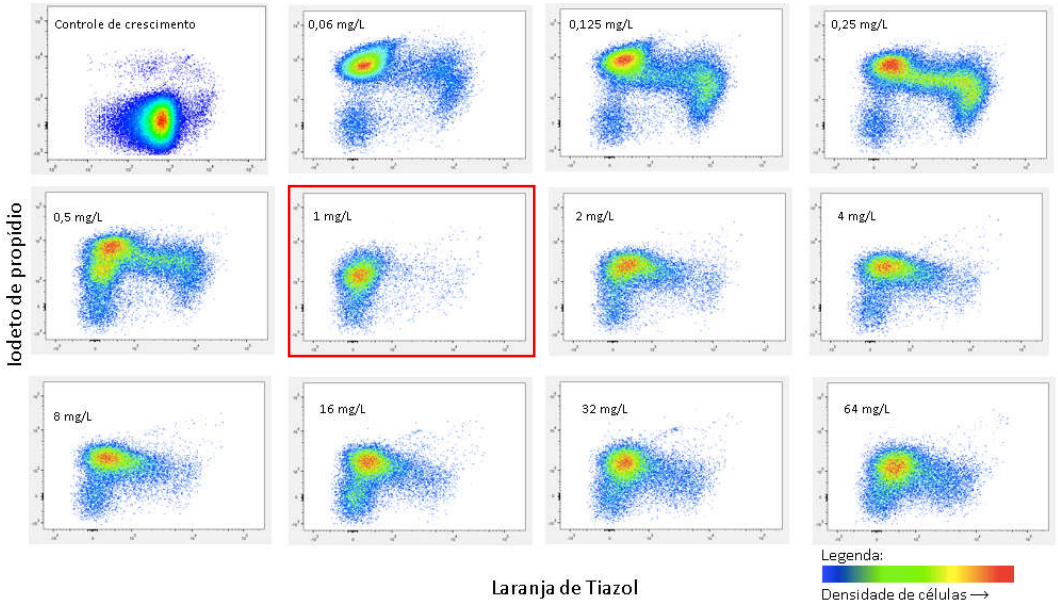
ajustes foram feitos no citômetro em relação à voltagem dos parâmetros de fluorescência para os canais verde e vermelho (dados não apresentados), deixando as populações mais centralizadas nos gráficos e abaixo da intensidade 3. Foram feitos quatro experimentos para a determinação da concentração inibitória mínima com as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, um isolado de *Escherichia coli* MCR-1 3313 e um isolado de *Klebsiella pneumoniae* J9243971. Os resultados de concentração inibitória mínima feitos por microdiluição em caldo para os isolados *Escherichia coli* MCR-1 e *Klebsiella pneumoniae* foram previamente reportados pela rotina do laboratório Fleury e reconfirmados. Para as cepas de referência foram utilizados os pontos de corte preconizados pelo BrCast.

De acordo com as aquisições e análises comparativas entre cada concentração (de 0,06 mg/L a 64mg/L), foi possível determinar a quantidade de bactérias por μL além de separar os *gates* de bactérias viáveis (fluorescência abaixo de 3 para os dois marcadores), lesionadas (eventos com fluorescência maiores que 3 para o marcador laranja de tiazol) e inviáveis (eventos maiores que 3 somente para o marcador iodeto de propídio). Tal marcação permitiu, juntamente com a contagem bacteriana, determinar a concentração de antibiótico no qual a bactéria apresentava-se em menor quantidade e determinar as proporções de bactérias viáveis contra as lesionadas e inviáveis.

Levando em consideração que a probabilidade de a bactéria ser inviabilizada é proporcional ao aumento da concentração do antimicrobiano, a CIM foi determinada quando o perfil da distribuição se alterava para uma proporção maior de células inviáveis ou lesionadas e a quantidade de bactérias por μL diminuía. Os dados obtidos podem ser observados nos gráficos 18, 19 e tabela 3 para a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, gráficos 20, 21 e tabela 4 para a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, gráficos 22, 23 e tabela 5 para a *Escherichia coli* MCR-1 com concentração inibitória mínima para polimixina B previamente conhecida (CIM de 4 mg/L) e gráficos 24, 25 e tabela 6 para *Klebsiella pneumoniae* (CIM de 0,25 mg/L) .

Os dados obtidos nos experimentos iniciais sugeriram que é possível determinar a concentração inibitória mínima por citometria de fluxo para uma bactéria exposta à polimixina B e incubada apenas por 1 hora e 30 minutos e que o experimento foi padronizado com sucesso (Tabela 7).

Gráfico 18 – Aquisições por citometria de fluxo para polimixina B em *Escherichia coli* sensível



Aquisições da Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 exposta a diversas concentrações de polimixina (0,06 à 64mg/L). Notar que a distribuição dos eventos adquiridos se movimenta em função da quantidade de antibiótico. Há uma estabilização a partir da concentração 1mg/L.

Tabela 3 – Distribuição das células de *E. coli* ATCC 25922 de acordo com a marcação por corantes e concentração de polimixina B

Polimixina B (mg/L)	Viáveis	Lesionadas	Inviáveis
Controle de Crescimento	776	16	111
0,06	10	48	373
0,125	9	128	303
0,25	8	190	224
0,5	13	72	233
1	11	3	87
2	9	15	132
4	9	17	154
8	13	15	156
16	25	13	155
32	25	18	152
64	36	27	154

Dados obtidos das aquisições feitas da cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Notar que os valores da contagem total de células diminuíram em função da concentração do antibiótico. Além disso, na concentração de 1 mg/L a relação entre as células consideradas viáveis, inviáveis e lesionadas se altera, podendo indicar a concentração inibitória mínima para a cepa.

Gráfico 19 – Determinação da CIM de *Escherichia coli* sensível por citometria de fluxo

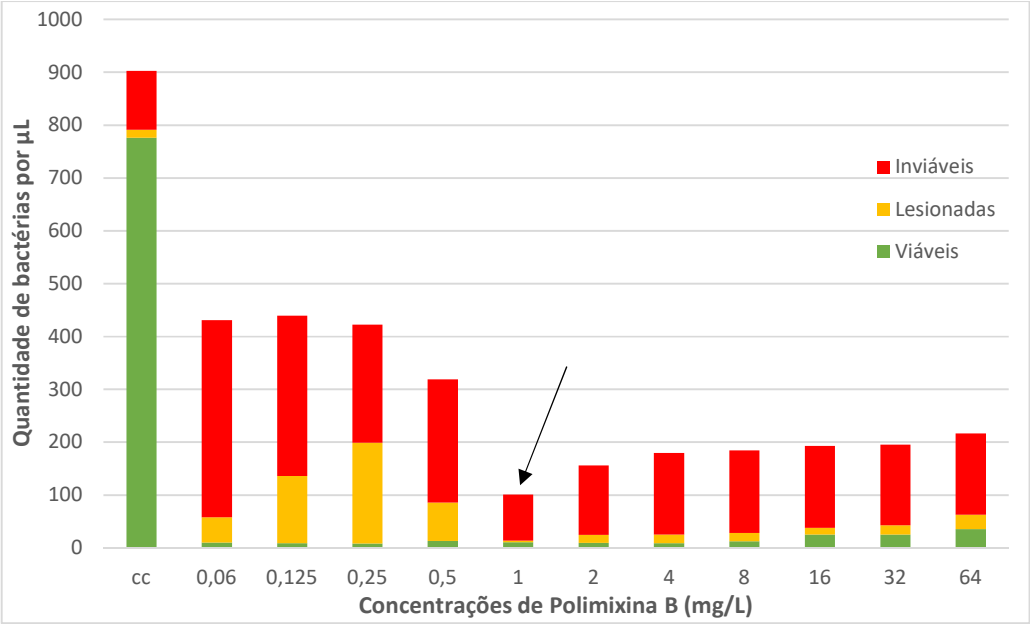
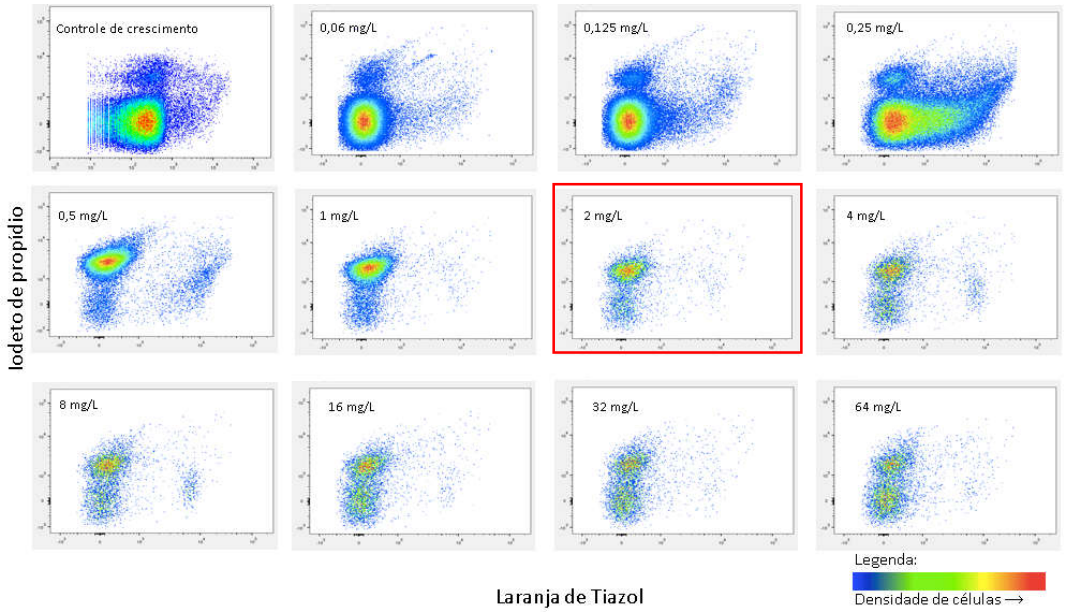


Gráfico correlacionando os dados do gráfico 18 e tabela 3. É possível aferir que na concentração de 1 mg/L de polimixina B houve uma queda substancial na quantidade de bactérias/µL. Além disso, de acordo com as marcações realizadas (dados da tabela 3) nota-se que a proporção de as bactérias interpretadas como viáveis foi menor.

Gráfico 20 - Aquisições citometria de fluxo para polimixina B em *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – Sensível



Aquisições da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 exposta a diversas concentrações de polimixina (0,06 a 64mg/L). Notar que a distribuição dos eventos adquiridos se movimenta em função da quantidade de antibiótico. Há uma estabilização a partir da concentração 2 mg/L.

Tabela 4 – Distribuição das células de *P. aeruginosa* ATCC 27853 de acordo com a marcação por corantes e concentração de polimixina B

Polimixina B (mg/L)	Viáveis	Lesionadas	Inviáveis
Controle de Crescimento	513	13	92
0,06	485	8	73
0,125	532	16	94
0,25	502	166	106
0,5	7	14	229
1	7	1	130
2	6	1	33
4	6	3	22
8	6	3	24
16	13	1	25
32	10	1	20
64	14	1	20

Dados obtidos das aquisições feitas da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Notar que os valores da contagem total de células diminuíram em função da concentração do antibiótico. Além disso, na concentração de 2 mg/L, a relação entre as células consideradas viáveis, inviáveis e lesionadas se altera, podendo indicar a concentração inibitória mínima para a cepa.

Gráfico 21 - Determinação da CIM de polimixina B para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

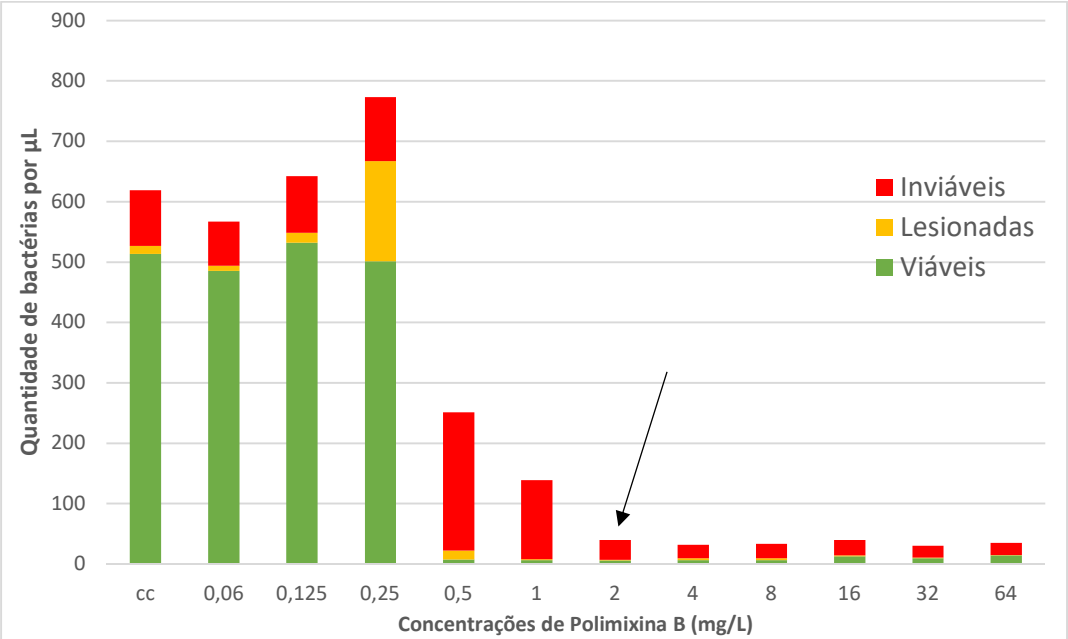
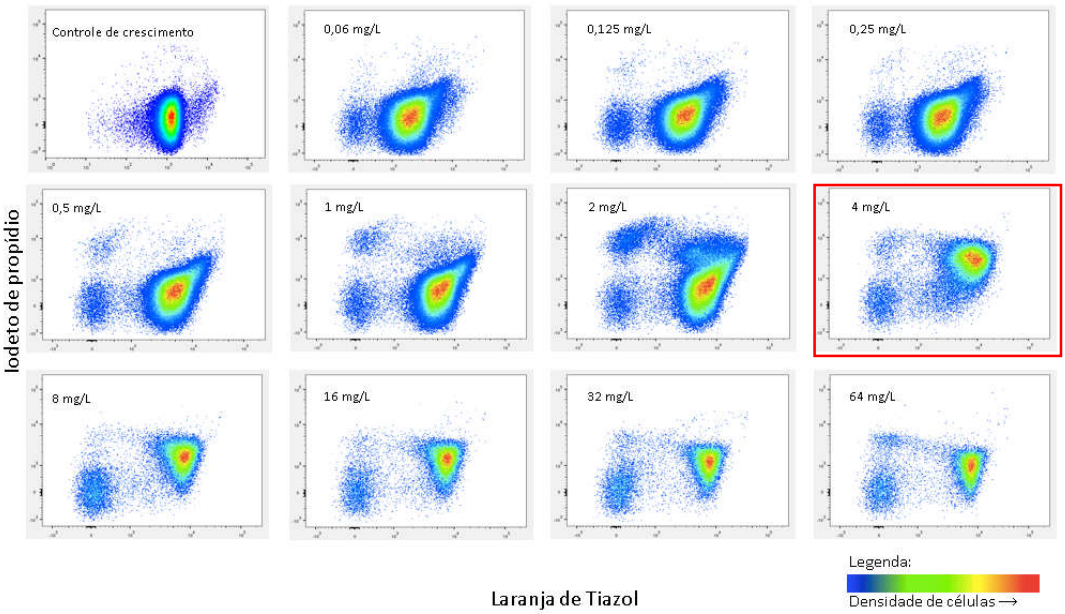


Gráfico correlacionando os dados do gráfico 20 e tabela 4. É possível aferir que na concentração de 2 mg/L de polimixina B houve uma queda substancial na quantidade de bactérias/µL. Além disso, de acordo com as marcações realizadas (dados da tabela 4) nota-se que a proporção de as bactérias interpretadas como viáveis foi menor.

Gráfico 22 - Aquisições citometria de fluxo para polimixina B em *Escherichia coli* Resistente



Aquisições do Isolado de *Escherichia coli* com MCR-1 exposto a diversas concentrações de polimixina (0,06 a 64μg/mL). Notar que a distribuição dos eventos adquiridos se movimenta em função da concentração de antibiótico. Há uma estabilização a partir da concentração 4 mg/L.

Tabela 5 – Distribuição das células de *E. coli* MCR-1 de acordo com a marcação por corantes

Polimixina B (mg/L)	Viáveis	Lesionadas	Inviáveis
Controle de Crescimento	797	40	153
0,06	568	279	116
0,125	192	722	38
0,25	299	742	64
0,5	27	956	9
1	18	1166	12
2	16	897	38
4	14	446	11
8	18	318	5
16	9	236	5
32	12	203	6
64	9	159	8

Dados obtidos das aquisições feitas do isolado de *Escherichia coli* MCR-1. Notar que os valores da contagem total de células diminuíram em função da concentração do antibiótico, além disso na concentração de 4 mg/L a relação entre as células consideradas viáveis, inviáveis e lesionadas se altera, podendo indicar a concentração inibitória mínima para a cepa.

Gráfico 23 - Determinação da CIM de *Escherichia coli* resistente por citometria de fluxo

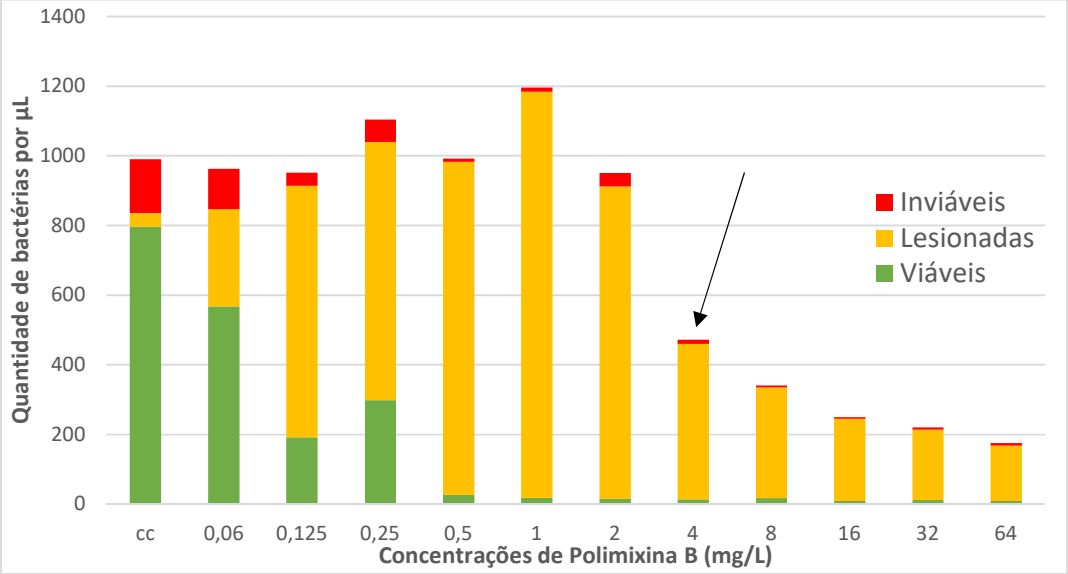
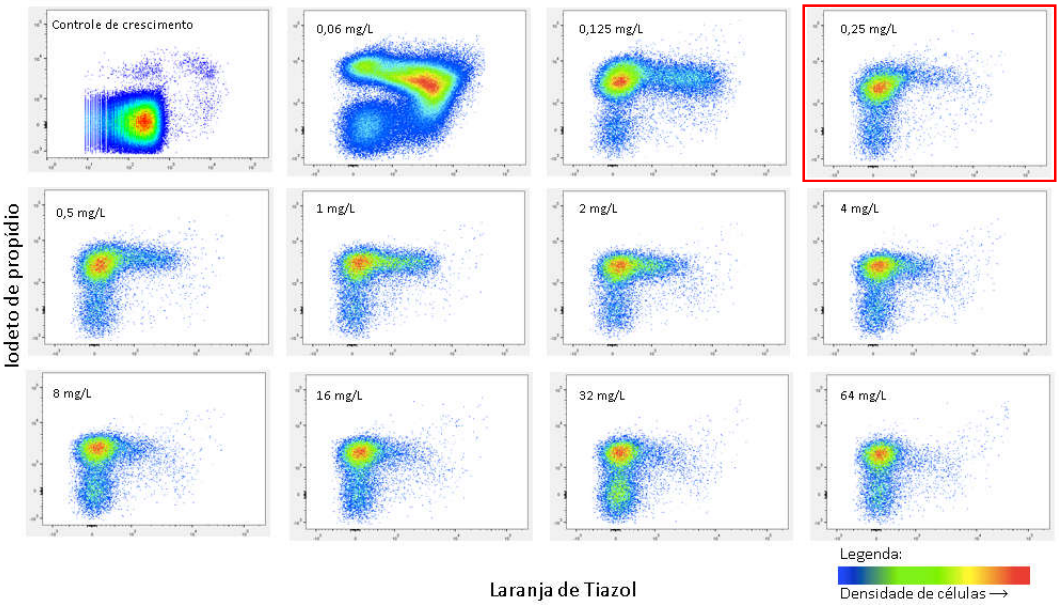


Gráfico correlacionando os dados do gráfico 22 e tabela 5. É possível aferir que na concentração de 4mg/L de polimixina B houve uma queda substancial na quantidade de bactérias/µL. Além disso, de acordo com as marcações realizadas (dados da tabela 5) nota-se que a proporção de as bactérias interpretadas como viáveis foi menor.

Gráfico 24 - Aquisições citometria de fluxo para polimixina B em *Klebsiella pneumoniae* sensível



Aquisições de Isolado de *Klebsiella pneumoniae* exposto a diversas concentrações de polimixina (0,06 à 64mg/L). Notar que a distribuição dos eventos adquiridos se movimenta em função da quantidade de antibiótico. Há uma estabilização a partir da concentração 0,25 mg/L.

Tabela 6 – Distribuição das células de *K. pneumoniae* de acordo com a marcação por corantes

Polimixina B (mg/L)	Viáveis	Lesionadas	Inviáveis
Controle de Crescimento	1453	6	194
0,06	158	1100	580
0,125	8	52	258
0,25	8	5	116
0,5	8	10	123
1	8	15	112
2	7	6	105
4	11	3	97
8	15	3	101
16	12	3	94
32	26	3	73
64	10	2	59

Dados obtidos das aquisições feitas do isolado de *Klebsiella pneumoniae*. Notar que os valores da contagem total de células diminuíram em função da concentração do antibiótico, além disso na concentração de 0,25 mg/L a relação entre as células consideradas viáveis, inviáveis e lesionadas se altera, podendo indicar a concentração inibitória mínima para a cepa.

Gráfico 25 – Determinação da CIM de *Klebsiella pneumoniae* sensível por citometria de fluxo

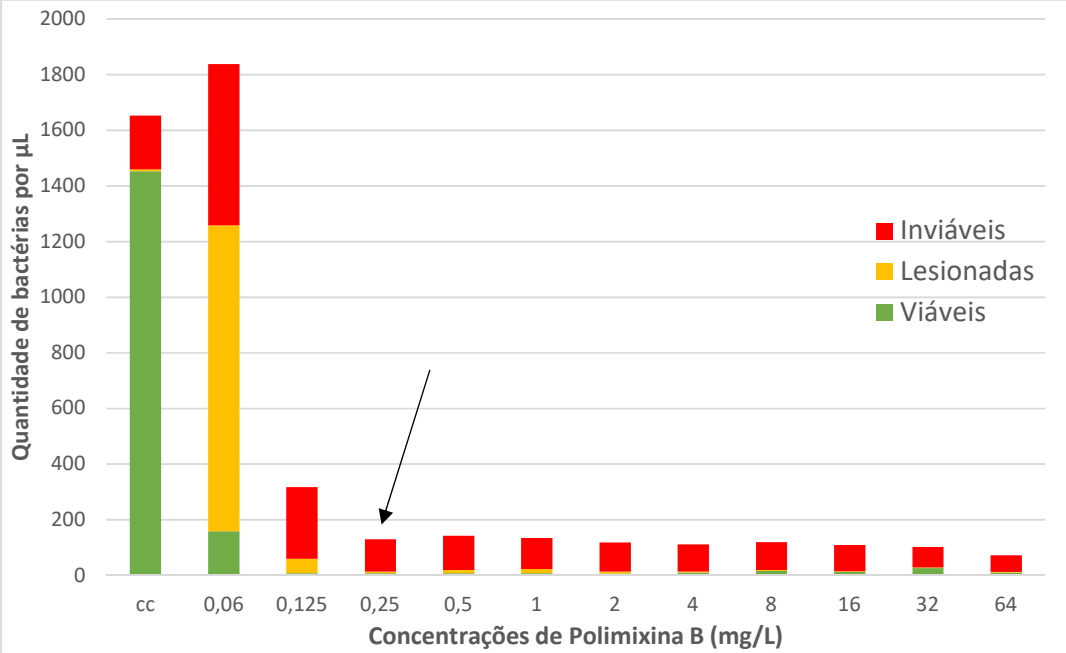


Gráfico correlacionando os dados do gráfico 24 e tabela 6. É possível aferir que na concentração de 0,25 mg/L de polimixina B houve uma queda substancial na quantidade de bactérias/µL. Além disso, de acordo com as marcações realizadas (dados da tabela 6) nota-se que a proporção de as bactérias interpretadas como viáveis foi menor.

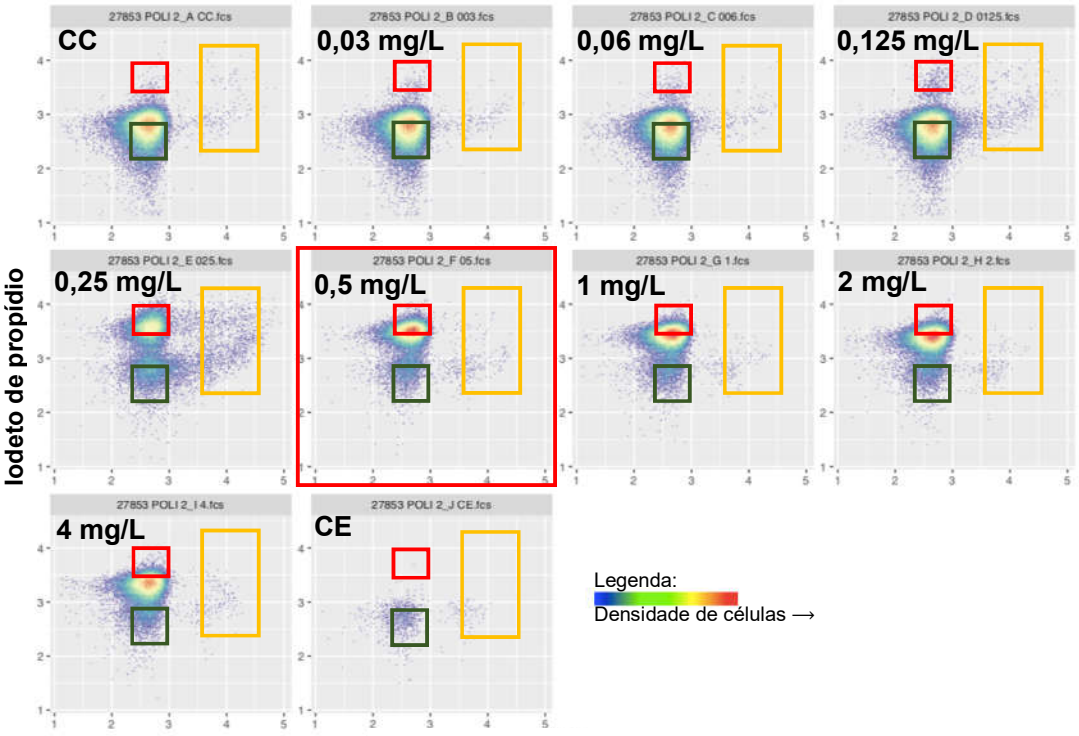
Tabela 7 – Correlação entre intervalo de referência para CIM obtida por microdiluição e valor obtido por citometria de fluxo ao testar polimixina B

Cepa testada	CIM ou faixa aceitável (mg/L)	Resultado obtido por CF (mg/L)	Referência
Escherichia coli ATCC 25922	0,25 - 2	1	(EUCAST; BRCAST, 2018)
Pseudomonas aeruginosa 27853	0,5 - 4	2	(EUCAST; BRCAST, 2018)
Escherichia coli 3313 MCR-1	4	4	-
Klebsiella pneumoniae J9243971	0,25	0,25	-

5.1.6.2 Ensaio de *sorting* para análise de viabilidade e vitalidade bacteriana e definição da interpretação da CIM por CF

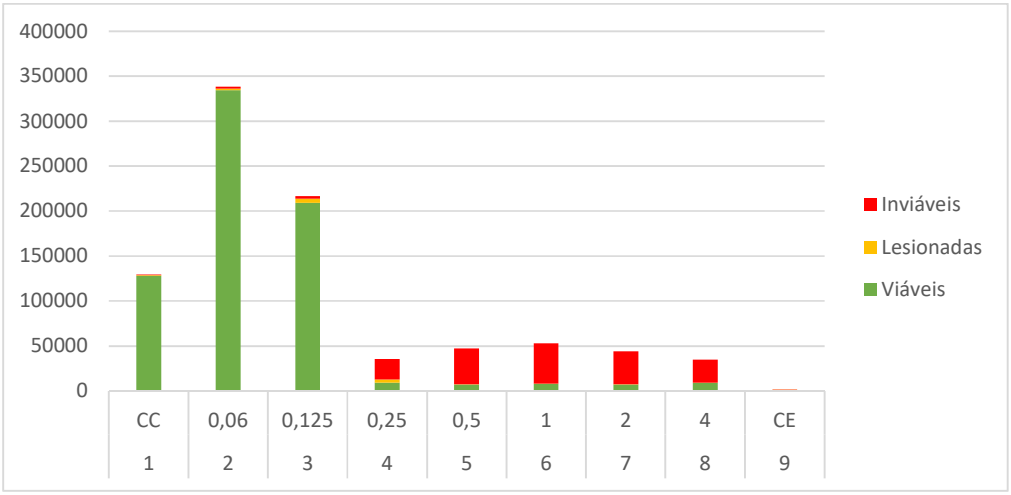
Baseados nos experimentos iniciais, foi proposta a avaliação de viabilidade e vitalidade bacteriana pela técnica de citometria de fluxo com *sorting* (separação de partículas baseadas no fenótipo, adquiridos pelo citômetro). Os experimentos foram conduzidos de maneira que fosse possível diminuir a subjetividade da análise inicial, além de mostrar a capacidade de marcação de eventos que foram considerados bactérias viáveis (eventos que não são marcados), bactérias lesionadas (eventos que são marcados por laranja de tiazol e iodeto de propídio) e bactérias inviáveis (eventos marcados apenas pelo iodeto de propídio). O Gráfico 26 mostra as aquisições realizados no equipamento FACS Aria II para a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 exposta à polimixina B na faixa de 0,03 a 4 mg/L e controle de crescimento (sem antibiótico). O Gráfico 27 mostra a quantidade de eventos contados e que foram separados pelo equipamento.

Gráfico 26 – Distribuição das aquisições obtidas durante o sorting bacteriano – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e polimixina B



O retângulo verde representa o que foi considerado gate com bactérias viáveis, o retângulo amarelo o gate com células lesionadas e o retângulo vermelho foi considerado o gate de bactérias inviáveis. A faixa de concentrações testadas para polimixina foi de 0,03mg/L à 4 mg/L, foram incluídos o controle de crescimento (CC - sem antibiótico) e controle de esterilidade (CE -caldo Mueller Hinton sem inóculo).

Gráfico 27 - Contagem de partículas sorteadas pelo equipamento.



Partículas sorteadas por tubo. É possível correlacionar o volume de amostra adquirido em cada tubo pela quantidade de partículas contadas pelo citômetro em cada concentração.

Após o *sorting*, foi realizada semeadura de 1µL em triplicata de cada tubo em ágar sangue de carneiro 5%. O volume foi pipetado sobre o ágar e semeado em toda a superfície utilizando uma alça calibrada de 1µL de maneira que fosse possível a contagem de colônias. Após 18 horas de incubação, foi realizada a contagem de colônias em cada placa, e calculada a média dos resultados. Os dados foram agrupados de acordo com a concentração do antibiótico e o respectivo *gate* conforme o Gráfico 28.

Gráfico 28 - Contagem de colônias dos *gates* adquiridos pelo *sorting*

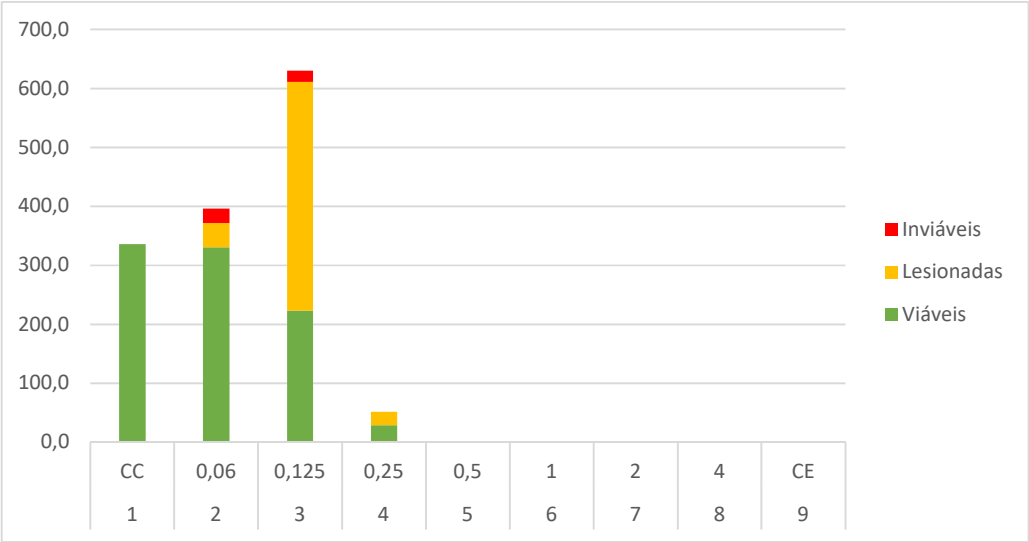


Gráfico de contagem de colônias de cada amostra adquirida por sorting. A unidade de medida está expressa em unidades formadoras de colônia (UCF/ µL).

A partir da contagem de colônias e comparação com os dados obtidos no citômetro, é possível aferir que eventos que se apresentam no gráfico, e não são marcados por iodeto de propídio ou laranja de tiazol (considerados bactérias viáveis), realmente são bactérias que apresentam um ótimo crescimento; contudo em concentrações altas de polimixinas, ainda é possível observar uma certa quantidade de eventos (Gráfico 26), mas que não são células viáveis. A hipótese é de que esses eventos possam ser atribuídos à presença de detritos bacterianos ou bactérias não viáveis e não marcadas. Não foi possível separar esses eventos de bactérias viáveis, contudo não há impacto na análise da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo.

Os eventos que foram marcados pelo laranja de tiazol foram considerados bactérias lesionadas, por apresentarem permeabilidade ao marcador, provavelmente pela ação do antibiótico que possibilita um aumento da permeabilidade das membranas bacterianas (VAARA, 1992). Houve um crescimento substancial de eventos que foram considerados bactérias lesionadas. Isso indica que mesmo apresentando permeabilidade ao laranja de tiazol, as bactérias são viáveis e capazes de crescer após a retirada do antibiótico.

O análise dos eventos considerados inviáveis mostrou que as bactérias se coram pelo iodeto de propídio, mesmo em concentrações mais altas de polimixina B. Não houve crescimento de bactérias para essa população, a não ser nas concentrações nas quais a contagem bacteriana foi muito elevada e esse pequeno crescimento foi considerado como uma sobreposição de *gates* ou mesmo *outliers* que eventualmente foram contados como bactérias inviáveis.

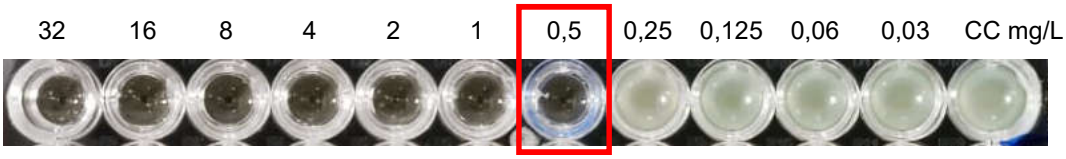
Uma alíquota de cada concentração utilizada para o experimento de citometria de fluxo com *sorting* foi incubada à 37ºC em placa até que atingisse um total de 18 horas para a leitura visual e comparação dos resultados com a citometria (Figura 11). É possível correlacionar que a concentração inibitória mínima para polimixina é aquela em que a quantidade bacteriana é substancialmente reduzida quando comparada com o controle de crescimento e quando a população de bactérias lesionadas desaparece e os eventos que são adquiridos ponto equivalente à CIM são apenas os que foram considerados bactérias inviáveis e uma população de detritos não corada.

Há na literatura uma revisão de Muller e colaboradores (2010) que apresenta resultados de testes com polimixina B e *sorting* para avaliar o potencial de membrana em bactérias. O ensaio utilizou *Sytox Green* e iodeto de propídio para marcação. Os *gates* foram feitos em células marcadas pelo *Sytox Green* e pelo iodeto de propídio, com proporção de eventos de 78% e 1,2% respectivamente. Enquanto o crescimento de bactérias coradas por *Sytox green* foi de 92 para 96 células sorteadas os eventos marcados com iodeto de propídio apresentou apenas crescimento de 1 colônia, o que corrobora com os dados apresentados neste trabalho e confirma que o *sorting* de células com lesão de membranas forneceu dados consistentes quando marcados com iodeto de propídio (MULLER; NEBE-VON-CARON, 2010).

A faixa aceitável para esse controle de qualidade de acordo com BrCast é de 0,5 a 4 mg/L, e o resultado adquirido após 18 horas de incubação e pela citometria de fluxo foi de 0,5 mg/L, portanto valida o resultado em relação à exatidão das

concentrações de polimixina B para a cepa padrão *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 11).

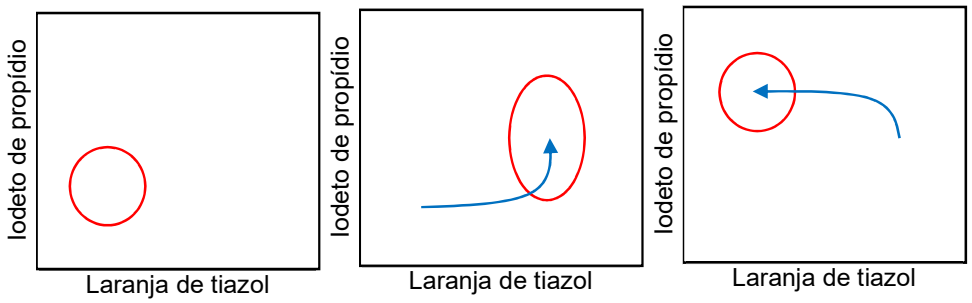
Figura 11 – Microdiluição em caldo para polimixina B em *P. aeruginosa*



Determinação da concentração inibitória mínima realizada por microdiluição em caldo com 18 horas de incubação e leitura visual. A placa foi preparada utilizando uma alíquota de cada concentração utilizada no ensaio de citometria de fluxo com *sorting* para polimixina B para a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Baseado nos resultados do *sorting*, mecanismo de ação e resultados anteriores da CF comparados com aqueles obtidos pela microdiluição em caldo, foram definidas diferentes maneiras de interpretação da determinação da CIM por CF para cada antibiótico testado (polimixina B, amicacina e meropenem). A polimixina, como já evidenciado no experimento de *sorting*, apresenta a CIM na concentração em que a quantidade de bactérias diminui em relação ao controle de crescimento e apresenta uma população marcada pelo iodeto de propídio (bactérias inviáveis) e não há uma quantidade de bactérias marcadas por laranja de tiazol elevada (bactérias lesionadas). O movimento da dispersão dos sinais observados em função do aumento da concentração de polimixina B é mostrado na Figura 12.

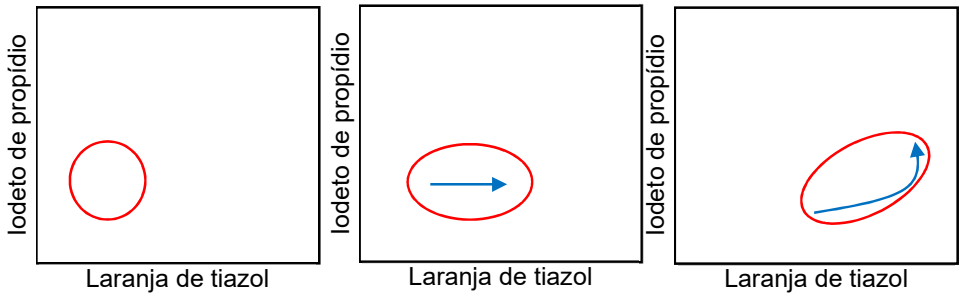
Figura 12 – movimentação da dispersão dos eventos relacionados ao aumento da concentração da polimixina B



O eixo x representa a marcação por laranja de tiazol e o eixo y a marcação pelo iodeto de propídio. A dispersão adquirida no controle de crescimento apresenta valores de intensidade abaixo de 3 e consideradas negativas para os dois marcadores (figura da esquerda). Conforme a concentração de polimixina é aumentada, há uma movimentação na dispersão do sinal adquirido pelo citômetro para a positividade para o laranja de tiazol (figura do meio) e conforme a concentração chega ao ponto da concentração inibitória, a maioria dos eventos são marcados apenas pelo iodeto do propídio (figura da direita).

Da mesma maneira observada para a polimixina, os *gates* para amicacina e meropenem foram definidos. Em função do aumento da concentração dos antibióticos, a dispersão do sinal adquirido vai do considerado negativo (controle de crescimento) para uma zona considerada com positividade para o laranja de tiazol. Quando a maioria dos eventos obtidos saem de uma zona de interseção entre o que é considerado positivo e negativo para o laranja de tiazol, foi considerado como a CIM. Para os dois antibióticos, há uma redução substancial da quantidade de bactérias quando comparado com o controle de crescimento e muitos eventos também são marcados pelo iodeto de propídio como mostrado na Figura 13.

Figura 13 – Movimentação da dispersão dos eventos relacionados ao aumento da concentração de meropenem e amicacina



O eixo x representa a marcação por laranja de tiazol e o eixo y a marcação pelo iodeto de propídio. A dispersão adquirida no controle de crescimento apresenta valores de intensidade abaixo de 3 e consideradas negativas para os dois marcadores (figura da esquerda). Conforme a concentração dos antibióticos meropenem e amicacina é aumentada, há uma movimentação na dispersão do sinal adquirido pelo citômetro para a positividade para o laranja de tiazol, ficando na interseção do que é considerado positivo e negativo (figura do meio). Conforme a concentração chega ao ponto da concentração inibitória, a maioria dos eventos se apresentam marcados pelo laranja de tiazol com tendência à marcação pelo iodeto de propídio (figura da direita).

A polimixina é um antibiótico bactericida e age contra bactérias Gram-negativas. É um antibiótico altamente catiônico, enquanto as moléculas do lipopolissacarídeo bacteriano são aniônicas. Essa diferença de carga resultante faz com que ocorram interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os lipopolissacarídeos e a polimixina B, consequentemente fazendo com que ocorram deslocamentos de cátions bivalentes (cálcio e magnésio) presentes na membrana, responsáveis pela estabilidade da membrana. Uma das hipóteses sobre o mecanismo de ação das polimixinas é que a desestabilização da membrana externa leva à ruptura da célula bacteriana. Essa explicação do mecanismo de ação é amplamente aceita; no entanto, detalhes precisos de como é a morte bacteriana causada pela ação da polimixina

ainda não estão muito claros (O'DRISCOLL et al., 2018; POIREL et al., 2017; TRAN et al., 2016). Existem outras hipóteses que também são aceitas, a exemplo de que a polimixina poderia inibir enzimas respiratórias presentes na membrana, formação de espécies reativas de oxigênio e ligação ao DNA bacteriano, inibindo sua replicação (CLAUSELL et al., 2003; DERIS et al., 2014). O trabalho de Zhang e colaboradores mostrou que a polimixina exerceu uma função letal em *Pseudomonas aeruginosa* sem afetar a força da membrana externa (ZHANG et al., 2000). O'Driscoll e colaboradores (2018) que utilizou citometria de fluxo e microscopia de força atômica, evidenciou que bactérias expostas à polimixinas diminuíram o seu comprimento e formaram agregados, no entanto sem que ocorresse lise bacteriana. Dessa forma o autor sugere que a ação da polimixina não é só por perfuração da membrana, mas esteja envolvida com a troca de fosfolipídios da membrana externa com a membrana plasmática, inibição de enzimas respiratórias ou indução de espécies reativas de oxigênio, fazendo com que a célula fique inviável, mas sem se romper (O'DRISCOLL et al., 2018). A evidências apresentadas por O'Driscoll podem ser relacionadas com dados observados neste estudo. A distribuição das bactérias após exposição à polimixina B, especialmente na concentração inibitória mínima, evidencia uma população positiva para o iodeto de propídio e negativa para o laranja de tiazol. Esse dado é bastante diferente do que foi observado para os antibióticos amicacina e meropenem que possuem mecanismos de ação bastante diferentes. A interpretação da citometria de fluxo para determinar a concentração inibitória mínima para esses dois antibióticos foi a mudança do pico negativo da dispersão no eixo X para a positividade do indicador laranja de tiazol para amicacina, e no caso do meropenem, além do mesmo padrão observado para amicacina, há também a dupla positividade de uma parcela da população nas concentrações iguais e acima das inibitórias. Em nenhum dos casos são observadas bactérias coradas apenas pelo iodeto de propídio. A principal hipótese é que nesses casos as bactérias se rompem com exposição aos antibióticos após algumas gerações.

A molécula da amicacina possui natureza catiônica, e assim como a polimixina B, liga-se primariamente em camadas estruturais aniônicas das células bacterianas. Em Gram-negativos, ligam-se aos lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas presentes na membrana externa, fazendo com que ocorra uma desestabilização da membrana, aumentando a permeabilidade, de forma que algumas moléculas do aminoglicosídeo penetram no espaço periplasmático bacteriano. Algumas dessas

moléculas são transportadas para o espaço citoplasmático com participação do sistema de transporte de elétrons, e uma vez no citoplasma, as moléculas do aminoglicosídeo se ligam na porção 30S dos ribossomos, consequentemente fazendo com que haja produção de proteínas mal traduzidas. As proteínas aberrantes produzidas no citoplasma facilitam a entrada de mais moléculas de amicacina, fazendo com que a célula produza apenas proteínas defeituosas para o funcionamento celular, resultando na impossibilidade de multiplicação e morte bacteriana (HOUGHTON et al., 2010; RAMIREZ; TOLMASKY, 2017; TABER et al., 1987; VAKULENKO; MOBASHERY, 2003; VANHOOF; SONCK; HANNECART-POKORNI, 1995).

Os resultados provenientes da exposição de bactérias à amicacina mostraram que em concentrações próximas e maiores que a CIM, ocorre uma lesão de membranas, permitindo a penetração do marcador laranja de tiazol, assim como observado na polimixina B (*gate* considerado bactérias lesionadas) e uma pequena permeabilidade concomitante do marcador iodeto de propídio. Há uma paralisação da multiplicação celular, evidenciada pela contagem bacteriana, o que corrobora com o mecanismo de ação dos aminoglicosídeos.

O meropenem é um antibiótico β-lactâmico carbapenêmico. Essa classe de antibióticos exerce a função bactericida inibindo a ação das proteínas ligadoras de penicilina (PBP), impedindo a formação da parede celular bacteriana. A exposição de bactérias ao meropenem faz com que haja uma mudança estrutural bacteriana na tentativa de multiplicação celular, formando bactérias com formas filamentosas até que ocorra consequentemente a lise bacteriana (JORGENSEN, S. C. J.; RYBAK, 2018; MOELLERING; ELIOPOULOS; SENTOCHNIK, 1989).

Os resultados observados em bactérias expostas ao meropenem mostraram que havia um aumento de FSC e SSC quando comparadas com o controle de crescimento. Uma vez que o parâmetro citométrico *Forward Scatter* (FSC) representa o tamanho celular e *Side Scatter* (SSC) representa de maneira aproximada o peso seco bacteriano ou conteúdo proteico bacteriano, evidencia que a bactéria continua a síntese proteica após a exposição ao antibiótico; no entanto não conseguem se dividir. Até certa concentração a quantidade de eventos permanece constante, corroborando com o mecanismo de ação do antibiótico, o qual interfere na síntese de parede celular modificando a estrutura bacteriana (AMBRIZ-AVINA; CONTRERAS-GARDUNO; PEDRAZA-REYES, 2014; WALBERG; GAUSTAD; STEEN, 1996). Além disso, foi

observado que na concentração equivalente à CIM ou nas concentrações acima da CIM, as contagens bacterianas apresentaram-se substancialmente menores que o controle de crescimento e houve um padrão de dispersão com bactérias marcadas pelos dois indicadores adicionados (laranja de tiazol e iodeto de propídio).

5.1.6.3 Ensaio de reprodutibilidade da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo para polimixina B e meropenem

O teste de reprodutibilidade é sugerido na tabela 5F do documento M-100 do CLSI (CLSI, 2019) que é o guia de referência sobre a frequência do controle de qualidade para determinação da CIM e para validar testes de sensibilidade de antibióticos que apresentam resultados satisfatórios no controle de qualidade. A validação é sugerida quando há modificações no preparo do inóculo, estudos de verificação de métodos implantados e mudança de incubação de 18h para leitura antecipada da CIM.

Foi realizado o teste de validação apenas para polimixina B e meropenem por motivos práticos e para avaliar a reprodutibilidade da determinação da CIM por CF. Os resultados obtidos por CF foram comparados com os limites preconizados pelo CLSI e BrCast (CLSI, 2019; EUCAST; BRCAST, 2018;2019). A Tabela 8 apresenta os resultados que mostraram uma correlação de 100% com resultados obtidos por leitura visual após 18h de incubação.

Tabela 8 – Tabela de resultados obtidos de 20 repetições consecutivas com cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 para meropenem e polimixina B

Número da replicata	Data do ensaio	Polimixina B MC (mg/L)	Polimixina B CF (mg/L)	Meropenem MC (mg/L)	Meropenem CF (mg/L)
1	06/05/2019	0,5	0,5	0,03	0,03
2	06/05/2019	0,5	0,5	0,03	0,03
3	06/05/2019	0,5	0,5	0,03	0,03
4	06/05/2019	0,5	0,5	0,03	0,03
5	06/05/2019	0,5	0,5	0,03	0,03
6	07/05/2019	0,25	0,25	0,06	0,06
7	07/05/2019	0,25	0,5	0,06	0,06
8	07/05/2019	0,25	0,5	0,06	0,06
9	07/05/2019	0,25	0,5	0,06	0,06
10	07/05/2019	0,25	0,25	0,06	0,06
11	08/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06

Continua

Número da replicata	Data do ensaio	Polimixina B MC (mg/L)	Polimixina B CF (mg/L)	Meropenem MC (mg/L)	Meropenem CF (mg/L)
12	08/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06
13	08/05/2019	0,25	0,25	0,03	0,06
14	08/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06
15	08/05/2019	0,25	0,25	0,03	0,06
16	09/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06
17	09/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06
18	09/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06
19	09/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06
20	09/05/2019	0,25	0,5	0,03	0,06

Os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast para Escherichia coli 25922 para polimixina B 0,25 a 2 mg/L e meropenem 0,03 a 0,25 mg/L.

Os resultados obtidos na validação realizada para polimixina B e meropenem apresentaram valores de CIM dentro dos pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. A concordância essencial pode variar uma diluição para cima ou para baixo da concentração determinada pelo padrão ouro (leitura visual) e, portanto, o ensaio apresentou concordância essencial de 100% com a leitura visual.

5.1.6.4 Validação da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo em concentrados bacterianos de hemoculturas positivas

Concentrados de bactérias Gram-negativas de 51 hemoculturas positivas, provenientes de pacientes diferentes, internados em hospitais atendidos pelo laboratório Fleury, foram utilizados para a validação da determinação da concentração inibitória mínima para amicacina, meropenem e polimixina B, por citometria de fluxo. O tempo médio gasto para a obtenção dos concentrados bacterianos a partir da hemocultura positiva foi de aproximadamente 15 minutos, seguido do protocolo de determinação de CIM por CF com incubação de 2 horas e a aquisição pelo citômetro FACS canto, que levou em média de 10 minutos para amicacina e polimixina B e 5 minutos para meropenem. O desenvolvimento do algoritmo em R permitiu que cada análise fosse realizada em menos de 1 minuto para cada amostra. O tempo médio total para a obtenção do resultado para os três antibióticos a partir dos frascos positivos de hemocultura para cada isolado foi de aproximadamente de 2 horas e 41 minutos.

Os testes tradicionais de isolamento, identificação bacteriana e teste de sensibilidade a antibióticos levam aproximadamente 48 horas para obtenção dos resultados, especialmente em hemoculturas, no qual o isolamento inicia-se a partir da positivação do frasco. O menor tempo de liberação do resultado é essencial para que afete decisões do tratamento inicial e o sucesso do tratamento, principalmente em infecções graves causadas por bactérias multirresistentes. Além disso, impacta diretamente no tempo de internação, melhoria das taxas de mortalidade e morbidade, além dos custos reduzidos com assistência à saúde (BARENFANGER et al., 1999; CHANDRASEKARAN et al., 2018; CHOI et al., 2017; DOERN et al., 1994; INGLIS; EKELUND, 2019; MACHEN et al., 2014; PEREZ et al., 2013; TRENHOLME et al., 1989).

Os métodos tradicionais implantados na rotina de microbiologia clínica, levam em torno de 48h para liberação de um resultado para hemoculturas positivas após a positivação do frasco, o reisolamento do microrganismo que leva de 18 a 24horas e aproximadamente mais 18h de incubação para o antibiograma de acordo com o preconizado pelo CLSI e BrCast (CLSI, 2019; EUCAST; BRCAST, 2018;2019). Quando o frasco de hemocultura fica positivo, as bactérias podem estar misturadas com aproximadamente $1,0x10^9$ eritrócitos e $1,0\ x10^6$ leucócitos por mL de sangue inoculado. Os equipamentos automatizados utilizados atualmente em microbiologia clínica (Vitek2, Phoenix e Microscan) e que poderiam liberar resultados de teste de sensibilidade com bactérias diretamente de hemoculturas, levam aproximadamente 6 horas, têm uma limitação de não conseguir diferenciar a densidade óptica das bactérias em suspensão e elementos sanguíneos, e por esse motivo também necessitam do isolamento do microrganismo antes da execução do teste (CHOI et al., 2017). Há também outras metodologias que ainda não estão disponíveis comercialmente e conseguem liberar o resultado de culturas realizadas diretamente de hemoculturas em 6 horas (CHOI et al., 2017).

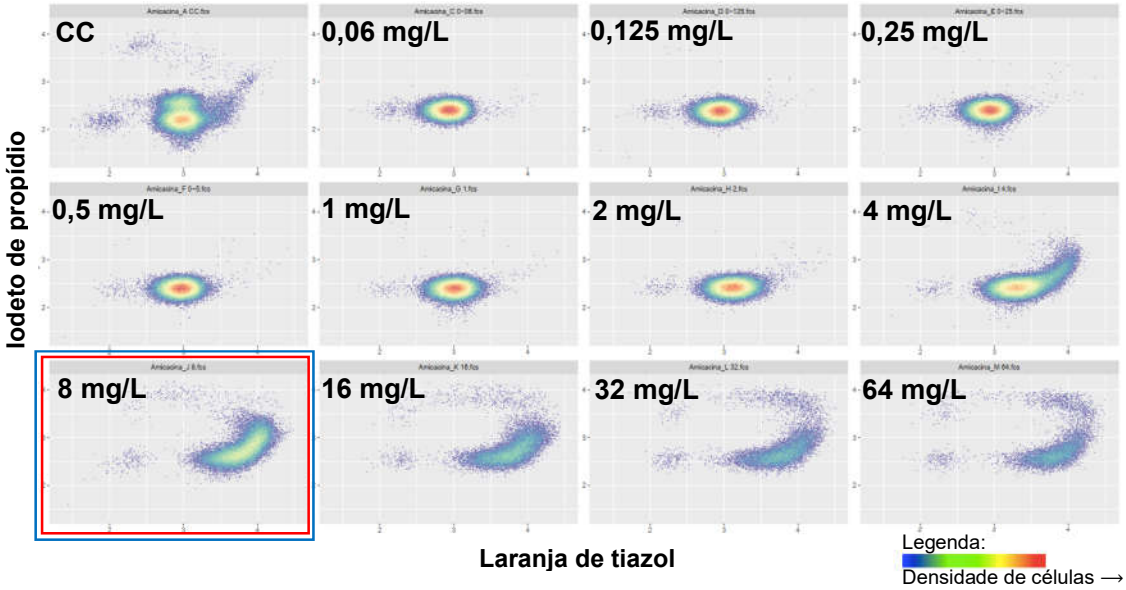
Existem protocolos publicados com menor incubação para isolados provenientes de hemoculturas positivas (CHANDRASEKARAN et al., 2018; EUCAST, 2019), contudo a incubação recomendada é de 4 a 8 horas e foi validado apenas para disco-difusão, metodologia que fornece dados categóricos de sensibilidade aos antibióticos. Chapin (2003), publicou uma validação utilizando bactérias isoladas diretamente de hemoculturas positivas com determinação da CIM de maneira visual e

incubação de 18 a 24 horas com ótima correlação de resultados, minimizando pelo menos 18 horas para o isolamento inicial das bactérias (CHAPIN; MUSGNUG, 2003).

Os trabalhos publicados que utilizam citometria de fluxo para teste de sensibilidade a antibióticos levam em média de 1 a 6 horas para liberação de resultados categóricos ou de concentração inibitória mínima, nenhum executando análise diretamente de hemoculturas positivas (BROEREN et al., 2013; COHEN; SAHAR, 1989; GAUTHIER et al., 2002; MARTINEZ et al., 1982; MULRONEY et al., 2017; ZAHAVY et al., 2018). As medições realizadas neste trabalho mostram que o tempo de análise é consistente com publicações prévias de protocolos utilizando citometria de fluxo e muito mais rápidas que aquelas que utilizam técnicas tradicionais ou automatizadas que estão disponíveis comercialmente, reduzindo de aproximadamente 48 horas para aproximadamente 3 horas de análise. Trata-se, portanto, de um ganho substancial de 45 horas para o ajuste terapêutico.

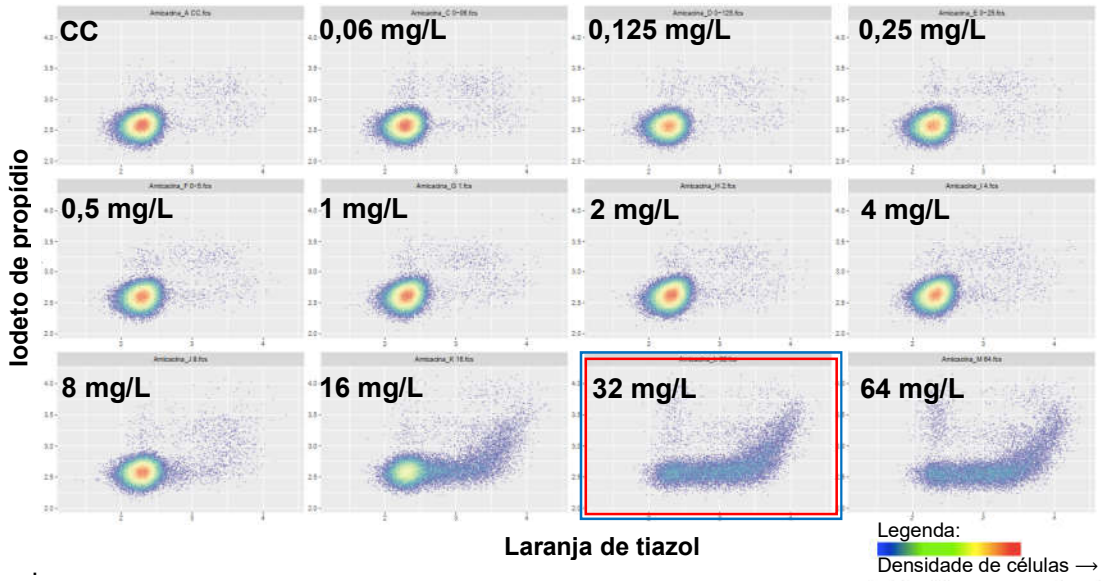
Os resultados gerados pela citometria de fluxo foram utilizados para produção de gráficos utilizando as fluorescências de iodeto de propídio e laranja de tiazol. Os gráficos gerados dos 51 concentrados bacterianos submetidos ao teste de determinação da CIM por CF foram disponibilizados no Apêndice deste trabalho. A interpretação da citometria de fluxo foi marcada com um retângulo azul, enquanto o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura tradicional foi marcado com um retângulo vermelho. Os Gráficos 29, 30 mostram exemplos de interpretação para amicacina para concentrado bacteriano com resultado de sensibilidade e cepa padrão com resultado de resistência, respectivamente. Os Gráficos 31, 32 apresentam exemplos de interpretação para meropenem em concentrado bacteriano com resultado de sensibilidade e cepa padrão com resultado de resistência a meropenem, respectivamente e Gráficos 33, 34 exemplificam a interpretação para polimixina B em concentrados bacterianos com resultado de sensibilidade e de resistência, respectivamente.

Gráfico 29 – Resultado de sensibilidade para amicacina determinado por CF e MC



Concentrado bacteriano BP0860011, *Escherichia coli*. Isolado apresenta resultado sensível para amicacina de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. Resultado CIM: 8mg/L. Retângulo vermelho representa o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura visual após 18 horas de incubação e retângulo azul o resultado obtido por citometria de fluxo com 2h de incubação.

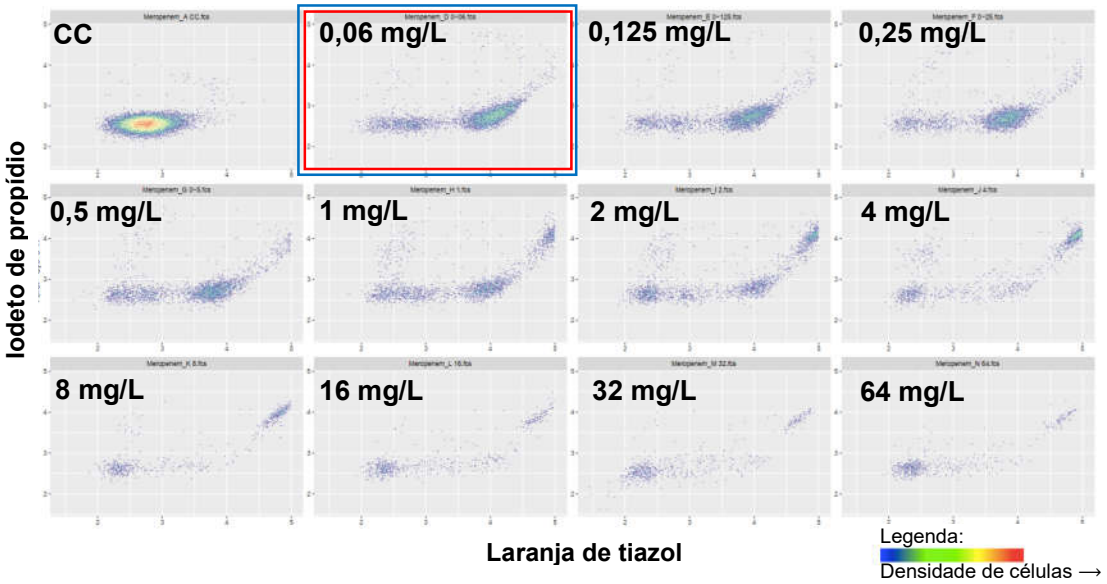
Gráfico 30 – Resultado de resistência para amicacina determinado por CF e MC



.

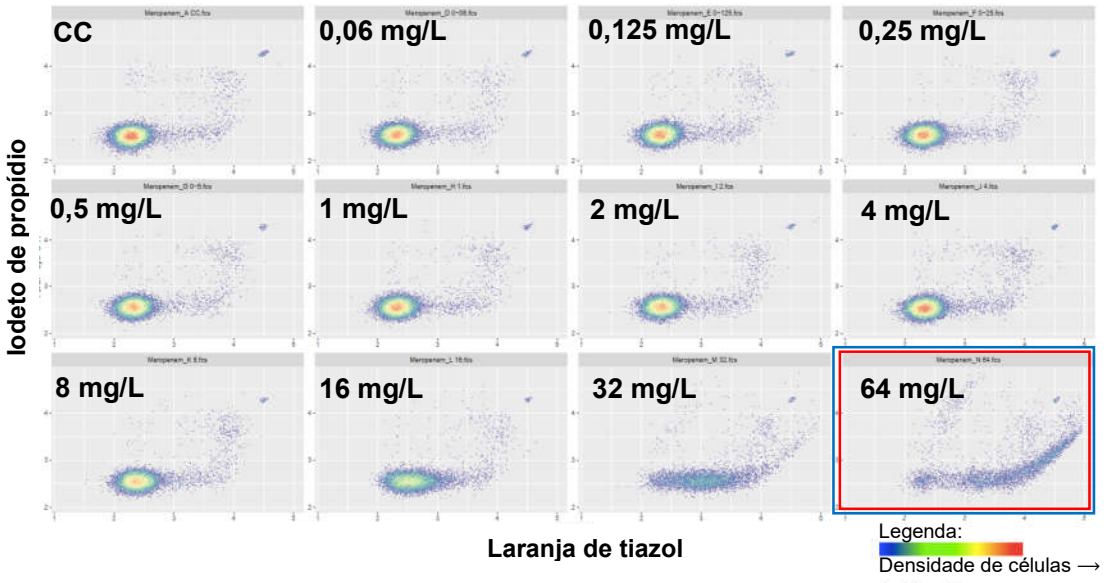
Cepa padrão ATCC BAA1705 - *Klebsiella pneumoniae*. Cepa apresenta resistência para amicacina de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. Resultado CIM: 32 mg/L. Retângulo vermelho representa o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura visual após 18 horas de incubação e retângulo azul o resultado obtido por citometria de fluxo com 2h de incubação.

Gráfico 31 – Resultado de sensibilidade para meropenem determinado por CF e MC



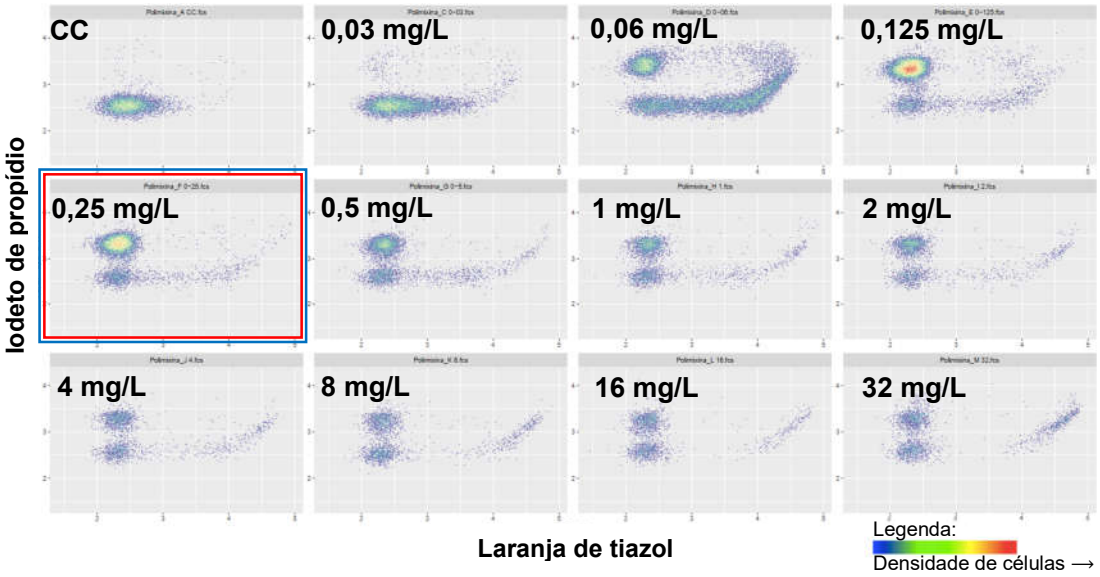
Concentrado bacteriano L2193623 - *Escherichia coli*. Isolado apresenta sensibilidade para meropenem de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. Resultado CIM: ≤0,06 mg/L. Retângulo vermelho representa o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura visual após 18 horas de incubação e retângulo azul o resultado obtido por citometria de fluxo com 2h de incubação.

Gráfico 32 – Resultado de resistência para meropenem determinado por CF e MC



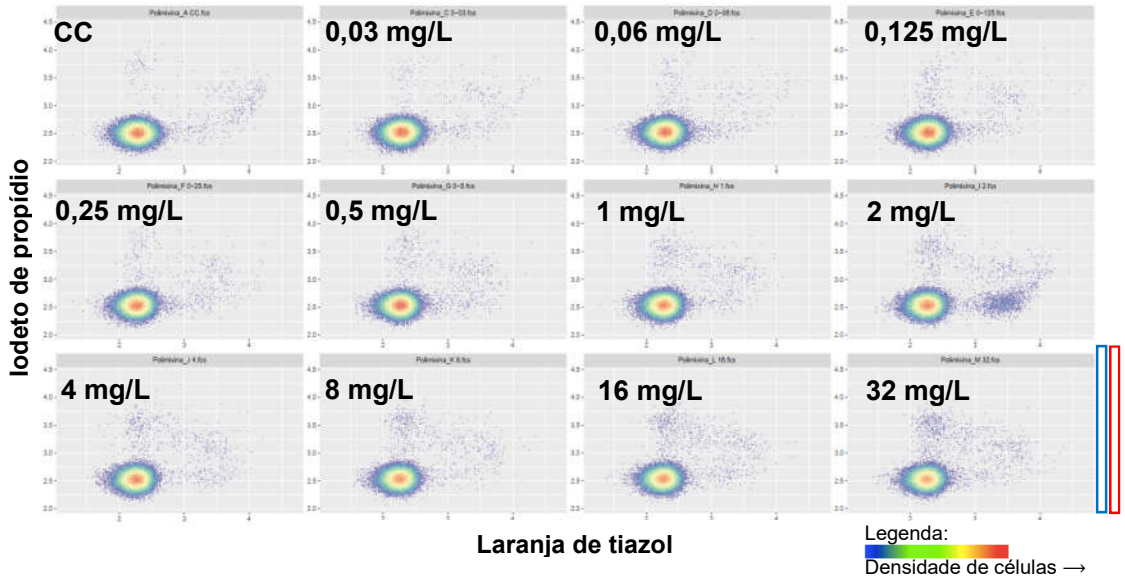
Cepa padrão ATCC BAA1705 - *Klebsiella pneumoniae*. Cepa apresenta resistência para meropenem de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. Resultado CIM: 64 mg/L. Retângulo vermelho representa o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura visual após 18 horas de incubação e retângulo azul o resultado obtido por citometria de fluxo com 2h de incubação.

Gráfico 33 – Resultado de sensibilidade para polimixina B determinado por CF e MC



Concentrado bacteriano L2210228 - *Pseudomonas aeruginosa*. Isolado apresenta sensibilidade para polimixina B de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. Resultado CIM: 0,25 mg/L. Retângulo vermelho representa o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura visual após 18 horas de incubação e retângulo azul o resultado obtido por citometria de fluxo com 2h de incubação.

Gráfico 34 – Resultado de resistência para polimixina B determinado por CF e MC



Concentrado bacteriano L2211345 - *Morganella morganii*. Isolado apresenta resistência para polimixina B de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast. Resultado CIM: ≥64 mg/L (resultado esperado em microrganismo intrinsecamente resistente à polimixina B (EUCAST, 2016). Retângulo vermelho representa o resultado obtido por microdiluição em caldo e leitura visual após 18 horas de incubação e retângulo azul o resultado obtido por citometria de fluxo com 2h de incubação.

Os resultados da interpretação dos gráficos gerados por citometria de fluxo e das concentrações inibitórias mínimas obtidas por leitura visual, após a incubação por 18h encontram-se na Tabela 9. Os resultados numéricos estão expressos em mg/L.

Tabela 9 – Tabela de resultados obtidos da determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo e citometria de fluxo dos concentrados bacterianos obtidos de hemoculturas positivas.

Número do Concentrado	Microrganismo	CIM AMICA (mg/L)	CF AMICA (mg/L)	CIM MERO (mg/L)	CF MERO (mg/L)	CIM POLI (mg/L)	CF POLI (mg/L)
BP0860011	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,25	0,125
L2193623	*Escherichia coli*	8	4	0,06	0,06	0,25	0,125
L2190079	*Escherichia coli*	8	4	0,06	0,06	0,25	0,125
BP0860386	*Pseudomonas aeruginosa*	4	4	0,25	0,5	0,5	0,5
L2202496	*Enterobacter cloacae complex*	2	2	0,125	0,125	0,25	0,25
L2203185	*Escherichia coli*	8	8	0,125	0,125	0,25	0,125
L2204558	*Klebsiella aerogenes*	8	8	0,25	0,25	0,125	0,25
L2204970	*Enterobacter cloacae complex*	8	8	0,06	0,06	0,25	0,125
K9270147	*Salmonella sp.*	2	4	0,03	0,03	0,5	0,5
L0122031	*Klebsiella pneumoniae*	2	2	0,03	0,03	0,25	0,125
L0123398	*Klebsiella pneumoniae*	2	4	16	32	0,125	0,25
L0162009	*Escherichia coli*	4	8	0,03	0,03	0,125	0,125
L0161705	*Escherichia coli*	8	4	0,01	0,01	0,06	0,125
L0174970	*Escherichia coli*	2	4	0,01	0,01	0,125	0,125
L0173433	*Salmonella sp.*	4	2	0,03	0,03	0,25	0,5
L2203966	*Escherichia coli*	4	8	0,06	0,125	0,25	0,25
L2211345	*Morganella morganii*	2	4	0,125	0,5	64	64
L2204558	*Klebsiella aerogenes*	16	4	0,25	0,25	0,125	0,25
L2210228	*Pseudomonas aeruginosa*	8	8	0,125	0,125	0,25	0,25
L2220013	*Klebsiella variicola*	16	16	0,06	0,06	0,125	0,125
L2222184	*Klebsiella variicola*	2	4	0,06	0,06	0,25	0,25
L2220128	*Escherichia coli*	16	4	0,06	0,06	0,25	0,25
L2220460	*Klebsiella pneumoniae*	8	4	64	64	0,125	0,25
L2224197	*Klebsiella pneumoniae*	8	8	128	128	0,03	0,06
L2251725	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,03	0,03
L2264452	*Enterobacter cloacae complex*	4	4	0,25	0,125	0,5	0,5
L2262945	*Klebsiella variicola*	1	2	0,06	0,06	1	0,25
L2264339	*Escherichia coli*	4	8	0,06	0,06	0,25	0,25
BP0866570	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,125	0,25
BP0864836	*Enterobacter cloacae complex*	2	4	0,06	0,06	0,25	0,25
BPM0147590	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,25	0,25
BP0865239	*Klebsiella pneumoniae*	2	2	8	0,5	0,125	0,125
L2270216	*Enterobacter cloacae complex*	1	2	0,06	0,06	0,25	0,25
L2273487	*Escherichia coli*	4	8	0,06	0,125	0,125	0,25

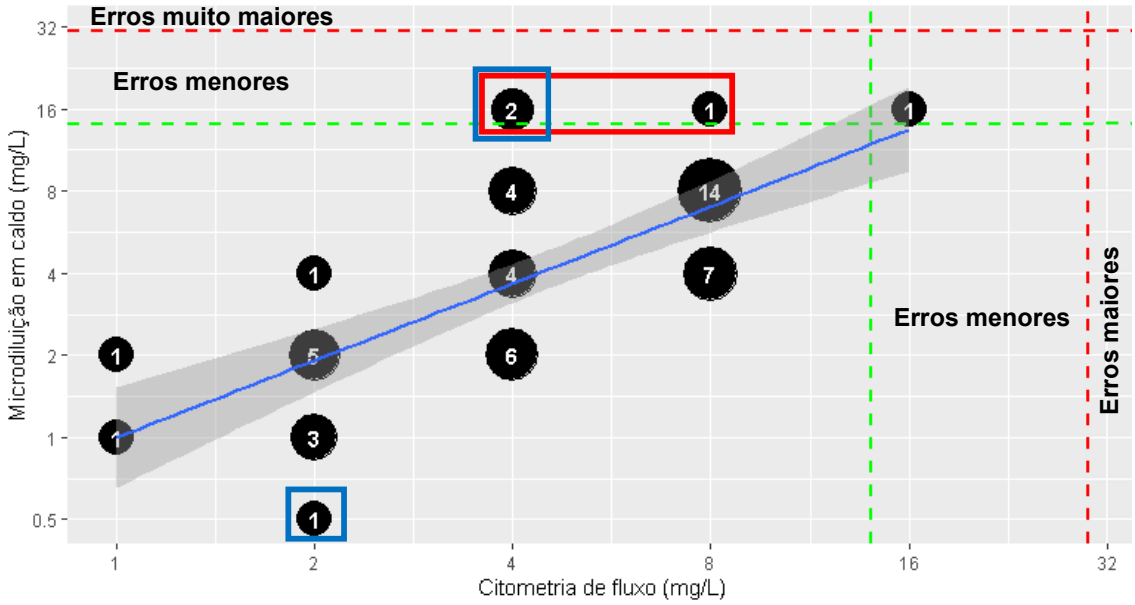
Continua

Número do Concentrado	Microrganismo	CIM AMICA (mg/L)	CF AMICA (mg/L)	CIM MERO (mg/L)	CF MERO (mg/L)	CIM POLI (mg/L)	CF POLI (mg/L)
L3010100	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,25	0,25
L3010142	*Escherichia coli*	16	8	0,06	0,06	0,25	0,25
L3010014	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,25	0,25
L2280193	*Klebsiella oxytoca*	4	8	0,06	0,5	0,25	0,25
BPM0147734	*Klebsiella pneumoniae*	4	8	32	16	0,5	0,5
L2294124	*Citrobacter koseri*	4	8	0,06	0,06	0,125	0,125
L3010100	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,125	0,125
L3021732	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,06	0,06
BP0870831	*Pseudomonas aeruginosa*	2	2	0,25	0,5	1	0,125
L3082000	*Pseudomonas aeruginosa*	2	1	0,25	0,25	0,25	0,125
L3080203	*Escherichia coli*	4	4	0,06	0,06	0,125	0,25
L3081698	*Klebsiella pneumoniae*	1	1	0,06	0,06	0,125	0,125
L3074265	*Enterobacter cloacae complex*	2	2	0,125	0,06	0,125	0,125
L3082117	*Proteus sp. e Klebsiella pneumoniae*	4	4	128	128	64	64
L3081574	*Escherichia coli*	8	8	0,06	0,06	0,06	0,25
L3091305	*Pluralibacter gergoviae*	0,5	2	0,06	0,125	0,06	0,125
L3090118	*Klebsiella pneumoniae*	1	2	0,06	0,06	0,125	0,125

CIM = resultados obtidos por microdiluição em caldo, incubação por 18 horas e leitura visual.
CF = resultados obtidos por citometria de fluxo com 2 horas de incubação. AMICA = amicacina, MERO = meropenem, POLI = polimixina B. Resultados numéricos das concentrações expressos em mg/L.

Os resultados das duas metodologias foram comparados utilizando os critérios estabelecidos pelo FDA, conforme descrito nos métodos, para facilitação da interpretação dos dados, gráficos de dispersão (x,y) foram elaborados (Gráficos 35, 36 e 37) para amicacina, meropenem e polimixina B, respectivamente), mantendo o padrão considerado ouro no eixo y e a metodologia a ser validada no eixo x.

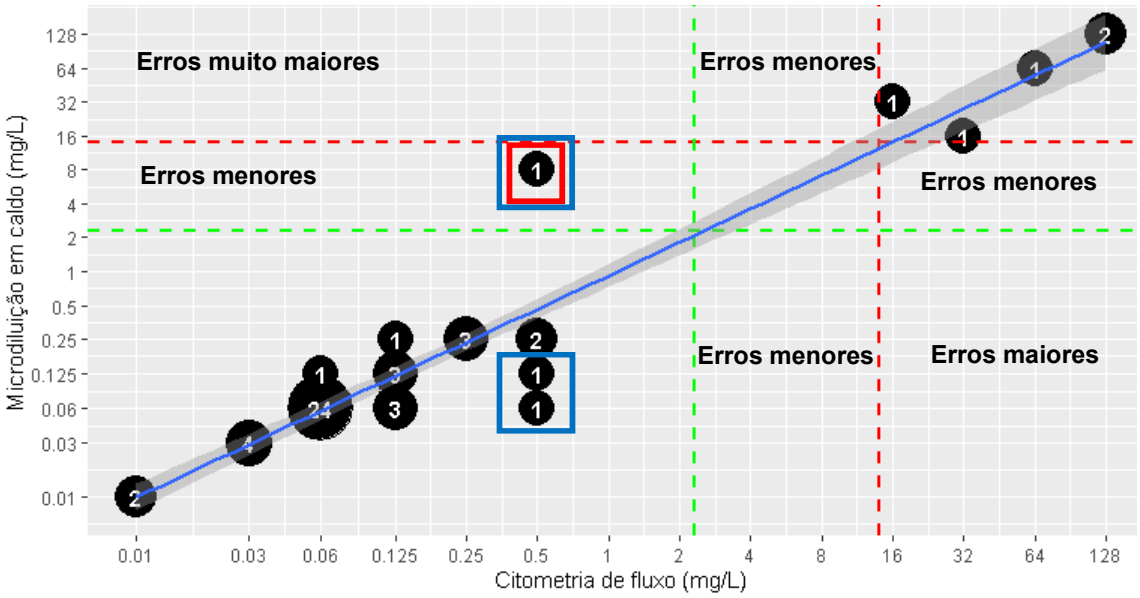
Gráfico 35 – Gráfico de correlação entre resultados obtidos na determinação da CIM por citometria e fluxo e microdiluição para amicacina



O tamanho e número do círculo preto simbolizam quantidade de amostras que obtiveram o mesmo resultado na correlação das concentrações obtidas entre os dois métodos. Linha contínua azul com sombra mostra a correlação linear entre os dois métodos. Linhas tracejadas verdes separam as categorias sensibilidade de sensibilidade intermediária. Linhas tracejadas vermelhas separam as categorias sensibilidade intermediária de resistente. Retângulo vermelho evidencia os erros menores, retângulos azuis mostram erros essenciais.

A validação da metodologia utilizando o antibiótico amicacina apresentou 3 erros essenciais e 3 erros categóricos. Os isolados L2204558 (*Klebsiella aerogenes*) e L2220128 (*Escherichia coli*) apresentaram 16 mg/L para microdiluição em caldo e 4 mg/L para citometria de fluxo, os dois isolados foram contabilizados como erros menores para categoria, assim como erros essenciais, pois a diferença foi maior do que uma diluição para antibiótico entre as metodologias. O isolado L3091305 (*Pluralibacter gergoviae*) também apresentou um erro essencial com resultado de 0,5 mg/L para microdiluição em caldo e 2 mg/L para citometria de fluxo, mas sem apresentar erro de categoria e o isolado L3010142 (*Escherichia coli*) apresentou um erro menor com resultado de 16mg/L para microdiluição em caldo e 8 mg/L para citometria de fluxo, contudo sem apresentar erro essencial. Dessa forma, os resultados foram 5,88% de erros categóricos e essenciais. A concordância categórica e essencial dos resultados obtidos entre as duas metodologias foi de 94,12%.

Gráfico36 - Gráfico de correlação entre resultados obtidos na determinação da CIM por CF e MC para meropenem

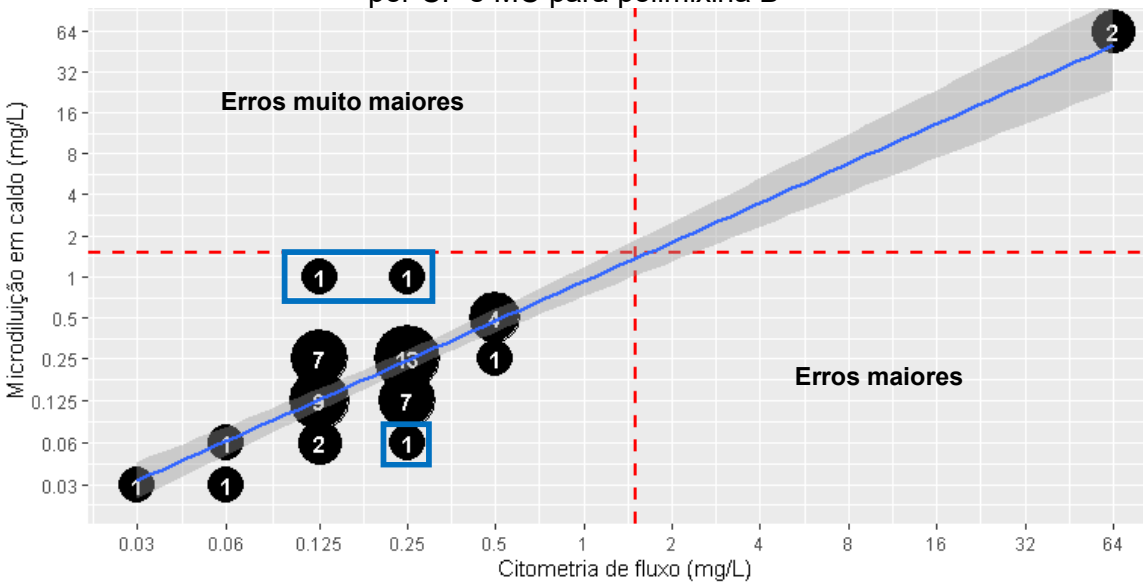


O tamanho e número do círculo preto simbolizam quantidade de amostras que obtiveram o mesmo resultado na correlação das concentrações obtidas entre os dois métodos. Linha contínua azul com sombra mostra a correlação linear entre os dois métodos. Linhas tracejadas verdes separam as categorias sensibilidade de sensibilidade intermediária. Linhas tracejadas vermelhas separam as categorias sensibilidade intermediária de resistente. Retângulo vermelho evidencia os erros menores, retângulos azuis mostram erros essenciais.

Como observado na Tabela 9, e no Gráfico36, para meropenem houve 3 erros essenciais, sendo que um dos isolados também apresentou um erro categórico. O isolado L2211345 (*Morganella morganii*) apresentou um resultado de 0,125 mg/L na microdiluição em caldo e 0,5 mg/L para citometria de fluxo, enquanto para o isolado L2280193 (*Klebsiella oxytoca*) apresentou um resultado de 0,06 mg/L na microdiluição de caldo e 0,5 para citometria de fluxo. Ambos resultados não apresentaram erros categóricos. O isolado BP0865239 (*Klebsiella pneumoniae*) apresentou um erro menor e erro essencial com o resultado de 8 mg/L para microdiluição em caldo contra uma concentração de 0,5 mg/L obtida pela citometria de fluxo.

Os erros essenciais observados para meropenem foram de 5,88% e erros menores de 1,96%. Portanto a concordância essencial entre os resultados obtidos pelo método padrão ouro contra os obtidos por citometria de fluxo foi de 94,12%, enquanto a concordância categórica foi de 98,04%.

Gráfico 37 - Gráfico de correlação entre resultados obtidos na determinação da CIM por CF e MC para polimixina B



O tamanho e número do círculo preto simbolizam quantidade de amostras que obtiveram o mesmo resultado na correlação das concentrações obtidas entre os dois métodos. Linha contínua azul com sombra mostra a correlação linear entre os dois métodos. Linhas tracejadas vermelhas separam as categorias sensibilidade de resistente. Retângulos azuis mostram erros essenciais.

Para polimixina B não foram observados erros categóricos, apenas 3 erros essenciais. O isolado L2262945 (*Klebsiella variicola*) que apresentou um resultado de 1 mg/L para microdiluição em caldo e 0,25 mg/L para citometria de fluxo, o isolado L3081574 (*Escherichia coli*) apresentou 0,06 mg/L para microdiluição em caldo e 0,125 mg/L para citometria de fluxo e o isolado BP0870831 (*Pseudomonas aeruginosa*) que apresentou um resultado de 1 mg/L para microdiluição em caldo e 0,125 mg/L para a citometria de fluxo. O erro essencial calculado foi de 5,88%, com uma correlação de 94,12% para as técnicas comparadas.

Ao longo das últimas décadas testes de sensibilidade a antibióticos diretamente de frascos positivos de hemoculturas foram padronizados por muitos trabalhos, evitando o subcultivo primário e antecipando o resultado obtido de maneira tradicional em aproximadamente 24 horas (BARENFANGER et al., 1999; CHANDRASEKARAN et al., 2018; CHAPIN; MUSGNUG, 2003; CHOI et al., 2017; COYLE et al., 1984; DE CUETO et al., 2004; DOERN et al., 1981; DOERN et al., 1994; FAY; OLDFATHER, 1979; INGLIS; EKELUND, 2019; KIEHN; CAPITOLO; ARMSTRONG, 1982; MACHEN et al., 2014; PEREZ et al., 2013; TRENHOLME et al., 1989; WAITES et al., 1998; WEGNER; MATHIS; NEBLETT, 1976; WEME, 2018; WIMMER et al., 2012). Contudo, a maioria dos testes de sensibilidade a antibióticos utilizados foram

os tradicionais com leitura visual ou em equipamentos automatizados comercialmente disponíveis. Em alguns casos utilizando métodos que ainda não estão disponíveis para laboratórios clínicos no Brasil, a exemplo da microscopia em tempo real. Os resultados do teste de sensibilidade nesses casos foram obtidos entre 6 e 24 horas. Além disso, o EUCAST possui um método próprio e validado para a execução do teste de disco-difusão, diretamente de hemoculturas positivas e leitura de resultados em até 8 horas (EUCAST, 2019).

Há na literatura a descrição de muitos trabalhos utilizando a citometria de fluxo para padronização do teste de sensibilidade a antibióticos (BOWNDS et al., 1996; BROEREN et al., 2013; COHEN; SAHAR, 1989; FARIA-RAMOS et al., 2013; FREDRICKS et al., 2006; GAUTHIER et al., 2002; JEPRAS et al., 1997; KIRK et al., 1998; MARTINEZ et al., 1982; MULRONEY et al., 2017; PINA-VAZ, C. et al., 2005; SHRESTHA et al., 2011; SOEJIMA et al., 2012; ZAHAVY et al., 2018). (BOI et al., 2015; GANT et al., 1993; SHRESTHA et al., 2011; SHRESTHA et al., 2012), além de alguns trabalhos focados exclusivamente em detecção de mecanismos de resistência, passo seguinte da rotina de um laboratório após a determinação da resistência de um microrganismo a determinado antibiótico (FARIA-RAMOS et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Não há muitas publicações sobre testes de sensibilidade a antibióticos diretamente de hemoculturas positivas. Um dos trabalhos pioneiros foi o de Cohen e colaboradores (1989) que utilizou a citometria de fluxo para detectar bactérias em amostras obtidas de sítios estéreis, além do teste de sensibilidade apenas amicacina (COHEN; SAHAR, 1989). Há um trabalho recente publicado e patenteado (patentes com numerações: WO2011138765A1, WO2012164547 A1 e 9,290,790 B2), que utilizou citometria de fluxo para determinar a concentração inibitória mínima, e incubação de até 2 horas, assim como desenvolvido nesta tese (COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2017). Os autores não citam quais os marcadores utilizados na citometria de fluxo, no entanto, de acordo com trabalhos prévios publicados por Pina-Vaz, C., principal autora e CEO da empresa FASTinov (detentora das patentes), sugerem que os marcadores provavelmente utilizados foram iodeto de propídio, SYTO 16 e DiBAC4(3) [Bis-(ácido dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol]. Apesar das patentes citarem de maneira abrangente e genérica os seguintes marcadores fluoresceína diacetato, auramina, acridina, cianina, fluorona, oxazina, fenantridina, rodamina e a utilização de quaisquer outros corantes com ligação ao ácido nucléico ou anticorpos

marcados. Contudo, não há evidências de testes utilizando a combinação de iodeto de propídio e laranja de tiazol nos trabalhos publicados, sendo este último um marcador pertencente à classe de corantes orgânicos cianinas (LESLEY, 2011; NCBI, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019; PINA-VAZ, C. et al., 2005; PINA-VAZ, C. I. A.; RODRIGUES; ANTUNES; MORAIS; et al., 2012; PINA-VAZ, C. I. A.; RODRIGUES; ANTUNES; ROSÁRIO; et al., 2012). Os resultados de 102 hemoculturas positivas testadas pelo trabalho, mostraram 99% de positividade para bactérias Gram-negativas, sendo 88,8% *Enterobacterales* (60% *E. coli*; 18.9% *K. pneumoniae*; 3% *Enterobacter spp.*; 1% *Citrobacter spp.;* 2% *Proteus spp*. e 3% *Serratia spp*.) e 10,8% de Gram-negativos não fermentadores (9,8% *Pseudomonas spp. e* 1% *Acinetobacter spp*.). O tempo para liberação dos resultados realizados por citometria de fluxo foi de aproximadamente 2 horas e os resultados apresentaram concordância categórica de 100% para colistina (polimixina E), 96,96% para amicacina (1,55% de erros menores e 1,77% de erros maiores) e 97,67% para meropenem (0,78% de erros menores, 0,88% de erros maiores e 6,25% de erros muito maiores). O ensaio de validação mostrou de maneira geral uma correlação >96% com o teste considerado padrão ouro (COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2017).

Neste trabalho foram isolados 47 (92,16%) de *Enterobacterales* (41,18% *E. coli*; 27,45% *Klebsiella spp*.; 11,76% *Enterobacter spp*.; 3,92% *Salmonella spp*.;1,96% para *Pluralibacter gergoviae*; 1,96% *Citrobacter koseri*; 1,96% *Morganella morganii*; e 1,96% com 2 microrganismos: *Proteus sp.* e *Klebsiella pneumoniae*) e 4 (7,84%) de bacilos Gram-negativos não fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa*). O tempo médio calculado para a obtenção do resultado foi de 2 horas e 41 minutos. Os resultados categóricos da microdiluição em caldo, que foi considerada padrão ouro, foram de 47 isolados sensíveis e 1 isolado com sensibilidade intermediária para amicacina, 45 isolados sensíveis, 1 isolado intermediário e 5 isolados resistentes para meropenem e 49 isolados sensíveis e 2 resistentes para polimixina B. As taxas de concordância categórica calculadas foram de 94,12% para amicacina (5,88% de erros menores), 98,04% para meropenem (1,96% de erros menores) e de 100% para polimixina B.

De modo geral, os resultados obtidos na validação da metodologia apresentaram uma ótima correlação >94% com o padrão ouro, e apenas apresentaram erros menores, os quais não possuem um limite como erros maiores e erros muito maiores (3% e 1,5%, respectivamente), de acordo com a literatura

consultada e o guia do FDA (FDA, 2009). Apesar da validação de Costa-de-Oliveira (2018) ter apresentado erros maiores e muito maiores para alguns antibióticos, o número total de hemoculturas testadas foi 100% maior, incluindo maior quantidade de bactérias desafio para amicacina e meropenem (16) e os dados de correlação obtidos em ambos trabalhos são equivalentes, com >90% de correlação categórica e porcentual de erros dentro do preconizado.

O principal erro crítico observado na validação para o meropenem, foi com o isolado BP0865239 (*Klebsiella pneumoniae*), o qual apresentou erro essencial e categórico (erro menor), apresentando o resultado de 8 mg/L para microdiluição em caldo contra uma concentração de 0,5 mg/L obtida pela citometria de fluxo. Posteriormente observou-se que o isolado era produtor de cápsula pelas características do crescimento em ágar sangue (colônias mucóides e com alta viscosidade), o que pode ter interferido no preparo da escala de McFarland, fazendo com que o teste fosse realizado com um inóculo menor do que o necessário. De acordo com alguns fabricantes de testes de sensibilidade a antibióticos, nos casos de isolados mucóides o aconselhado é um inóculo equivalente à escala 1,0 de McFarland (BECTON, 2010; BIOMERIÉUX, 2012; BURNS et al., 2000).

Uma das hemoculturas (L3082117) apresentou positividade para 2 isolados de gêneros diferentes; uma *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e *Proteus* sp., resistente intrinsecamente às polimixinas (EUCAST, 2016). O resultado obtido foi concordante quando comparado com a microdiluição em caldo, evidenciando que o método é capaz de produzir resultados fidedignos mesmo com culturas polimicrobianas, por possibilitar a avaliação de uma amostra significativa de populações bacterianas inteiras.

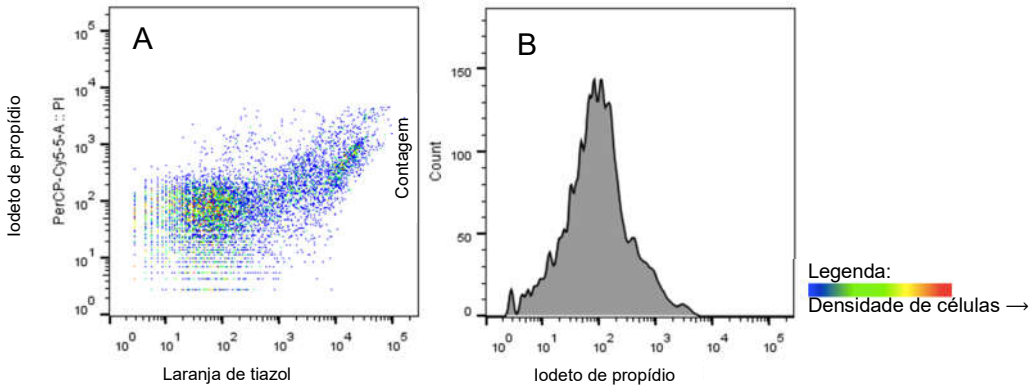
A determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo obteve uma ótima correlação com o método considerado padrão ouro e pode se tornar um exame rápido, com alta exatidão em relação à concordância essencial e categórica, trazendo segurança para ajustes na conduta terapêutica. Embora a validação apresentada nesta tese tenha obtidos ótimos resultados, há a necessidade da realização de uma validação com número de amostras superior, para que seja possível aumentar a segurança do método em relação aos erros essenciais e categóricos, bem como a inclusão de maior número de bactérias desafio (contendo mecanismos de resistência previamente caracterizados, e exemplo da produção de diferentes enzimas de resistência, alteração de permeabilidade, expressão de

mecanismos de efluxo), além da necessidade de implementação de métodos matemáticos e estatísticos que possibilitem diminuir a subjetividade na interpretação das aquisições.

5.1.7 Teste rápido de triagem de resistência à polimixina por citometria de fluxo

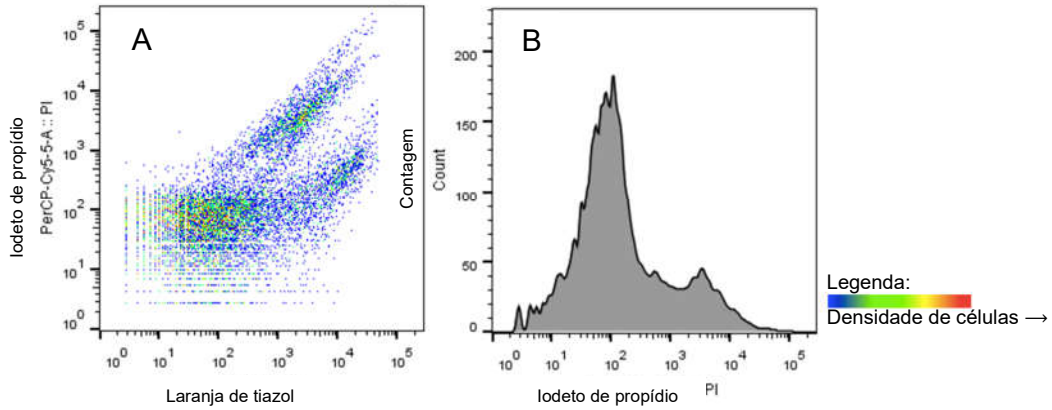
O primeiro teste realizado foi um teste rápido com polimixina B. Duas bactérias diferentes foram testadas. Um *Proteus mirabilis* J9103900 e uma *Escherichia coli* 3313 resistente à polimixina (concentração inibitória mínima de 4 mg/L). As suspensões bacterianas equivalentes à escala de McFarland 0,5 foram preparadas e expostas à polimixina, com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. Três tubos foram preparados para este ensaio: (1) suspensão bacteriana sem polimixina, (2) suspensão bacteriana com polimixina B a 50 mg/L e (3) suspensão bacteriana com polimixina B a 500 mg/L. Todos os tubos foram marcados com os corantes iodeto de propídio e laranja de tiazol. Houve uma mudança do padrão de distribuição, indicando que as células são afetadas quando submetidas a concentrações relativamente altas de polimixina B (50mg/L e 500mg/L), mesmo quando apresentam resistência a concentrações de uso clínico. Neste ensaio não foi utilizada nenhuma cepa ou isolado sensível à polimixina (Gráficos 38, 39, 40, 41, 42 e 43).

Gráfico 38 – *Proteus mirabilis* não tratado com polimixina B



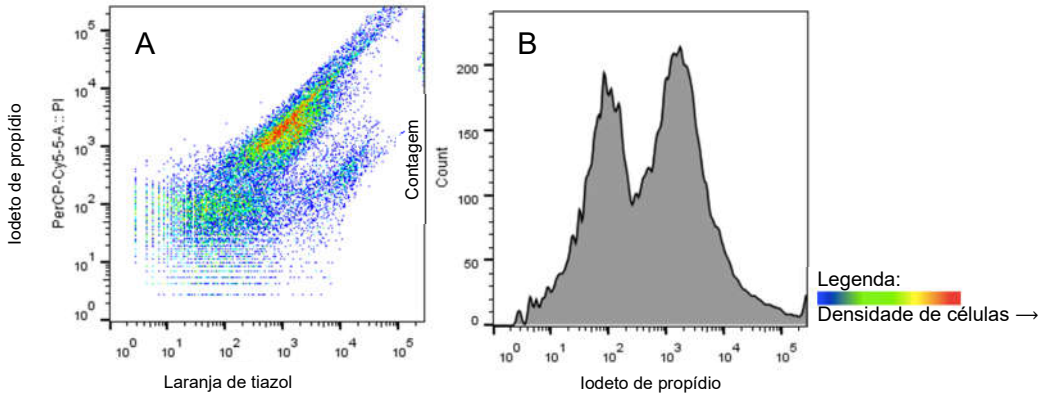
Proteus mirabilis não tratado com polimixina B. Gráfico A mostra a dispersão em relação aos dois corantes: iodeto de propídio e laranja de Tiazol. Gráfico B é a distribuição em relação ao laranja de Tiazol. É possível observar que a distribuição muda conforme a concentração da polimixina B aumenta.

Gráfico 39 -Perfis de vitalidade e viabilidade de *Proteus mirabilis* tratado com 50μg /mL de polimixina B



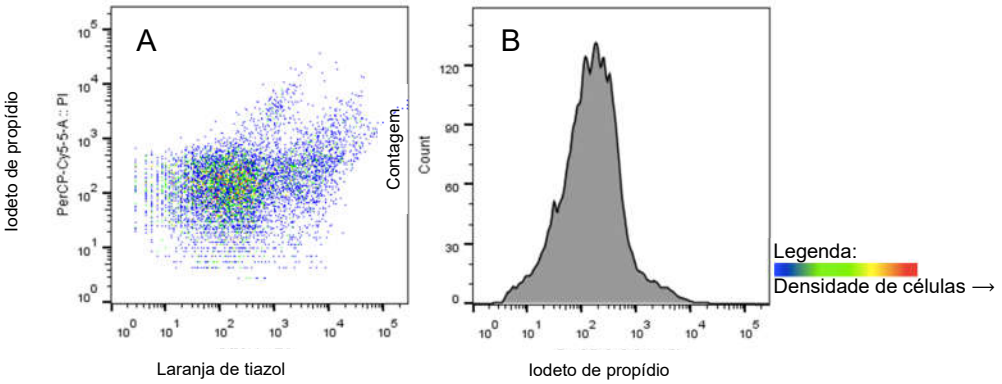
Proteus mirabilis tratado com 50μg /mL de polimixina B. Gráfico A mostra a dispersão em relação aos dois corantes: iodeto de propídio e laranja de Tiazol. Gráfico B é a distribuição em relação ao laranja de Tiazol. É possível observar que a distribuição muda conforme a concentração da polimixina B aumenta.

Gráfico 40 - Perfis de vitalidade e viabilidade de *Proteus mirabilis* tratado com 500μg /mL de polimixina B



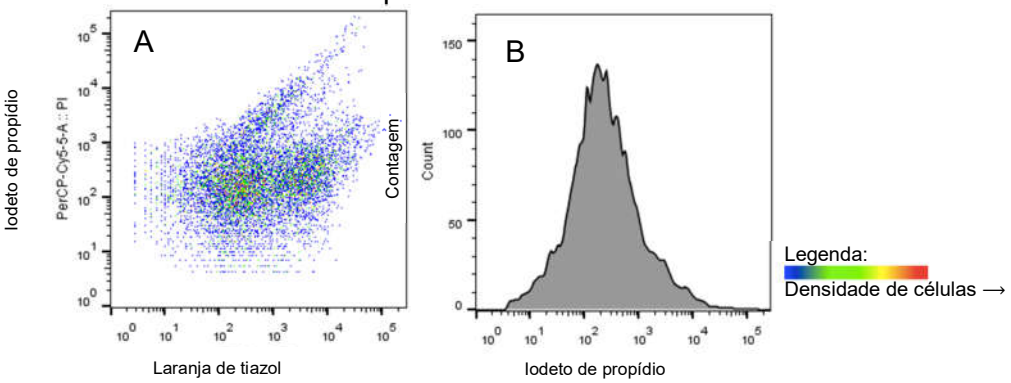
Proteus mirabilis tratado com 500mg/L de polimixina B. Gráfico A mostra a dispersão em relação aos dois corantes: iodeto de propídio e laranja de Tiazol. Gráfico B é a distribuição em relação ao laranja de Tiazol. É possível observar que a distribuição muda conforme a concentração da polimixina B aumenta.

Gráfico 41 – Perfis de vitalidade e viabilidade de *Escherichia coli* não tratada com polimixina B



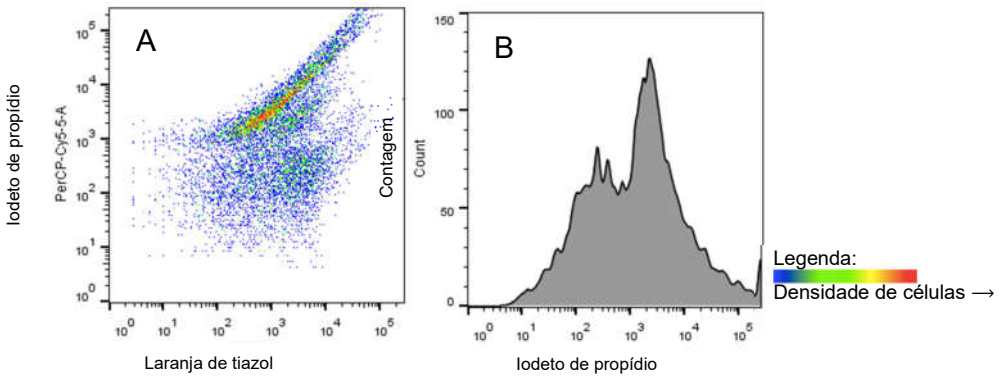
Escherichia coli resistente à polimixina, não tratada. Gráfico A mostra a dispersão em relação aos dois corantes: iodeto de propídio e laranja de tiazol. Gráfico B é a distribuição em relação ao laranja de Tiazol. É possível observar que a distribuição muda conforme a concentração da polimixina B aumenta.

Gráfico 42 – Perfis de vitalidade e viabilidade de *Escherichia coli* tratada com 50μg /mL de polimixina B



Escherichia coli resistente à polimixina, tratada com 50mg/L de polimixina B. Gráfico A mostra a dispersão em relação aos dois corantes: iodeto de propídio e laranja de Tiazol. Gráfico B é a distribuição em relação ao laranja de Tiazol. É possível observar que a distribuição muda conforme a concentração da polimixina B aumenta.

Gráfico 43 - Perfis de vitalidade e viabilidade de *Escherichia coli* tratada com 500μg /mL de polimixina B



Escherichia coli resistente à polimixina, tratada com 500mg/L de polimixina B. Gráfico A mostra a dispersão em relação aos dois corantes: iodeto de propídio e laranja de Tiazol. Gráfico B é a distribuição em relação ao laranja de Tiazol. É possível observar que a distribuição muda conforme a concentração da polimixina B aumenta.

É possível realizar um teste rápido (aproximadamente 15 minutos) par avaliar a integridade de células expostas à polimixina B. No ensaio piloto realizado, foi possível separar populações de células expostas ao antibiótico (de acordo com o aumento das concentrações: 0,50 mg/L e 500 mg/L), mesmo se tratando de isolados com a concentração inibitória mínima de ≥ 4mg/L, considerados resistentes utilizando o ponto de corte preconizado pelo BrCast. Testes subsequentes precisam ser realizados para avaliar a possibilidade de separar as populações quando utilizadas concentrações do antibiótico próximas ao ponto de corte e com bactérias sensíveis, podendo ser um teste de triagem para determinar se a bactéria é sensível ou resistente à polimixina B em 15 minutos.

5.2 Condutividade de suspensões bacterianas

O sistema proposto nas metodologias foi montado, no entanto inicialmente os fios da *probe* foram feitos de cobre (o mesmo fio que é conectado ao microcontrolador). A equação descrita nos métodos foi aplicada no algoritmo em linguagem C++ e salvo no ESP32 utilizando o software IDE Arduino.

Para os primeiros testes foi utilizada uma solução de cloreto de sódio saturada e água deionizada. A partir dos resultados preliminares (dados não mostrados) foi possível avaliar que quando a *probe* era inserida na solução saturada de cloreto de sódio o sinal enviado para o controlador não era constante. Em face dessa evidência

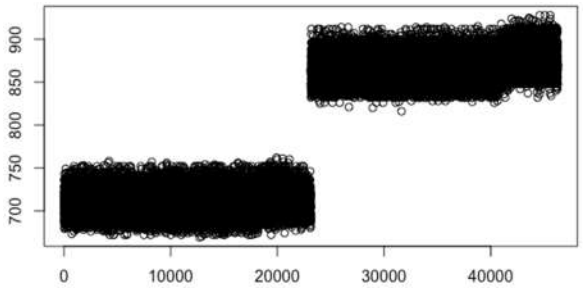
o algoritmo foi alterado para que houvesse uma estabilização do sinal de leitura e uma média móvel de acordo com as últimas 1.000 leituras, descartando a primeira leitura e adicionando a última leitura na média. A alteração na quantidade de leituras não mudou substancialmente o tempo de análise, pois cada ciclo de 21.000 leituras leva menos de 1 segundo. Além disso, foi construído um sistema mecânico com rolamentos e um suporte universal para a estabilização da *probe* para que a profundidade e posição do tubo amostral fossem sempre fixos.

Os testes seguintes foram realizados com uma solução de sulfato de polimixina B com concentração de 10mg/mL. Foi possível observar que quando o controlador ficava incubado por longos períodos, havia uma reação da *probe* com o sulfato de polimixina B, formando provavelmente sulfato de cobre e bolhas de gás, provavelmente decorrente da eletrólise da água. Houve a necessidade da mudança do eletrodo para uma ponta de material que não reagisse com as substâncias presentes na amostra. Por esse motivo a montagem foi feita com a ponta de platina, por se tratar de um metal pouco reativo quimicamente (BRITANNICA, ENCYCLOPAEDIA, 2018; NCBI, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION., 2018).

5.2.1 Teste com bactérias sonicadas

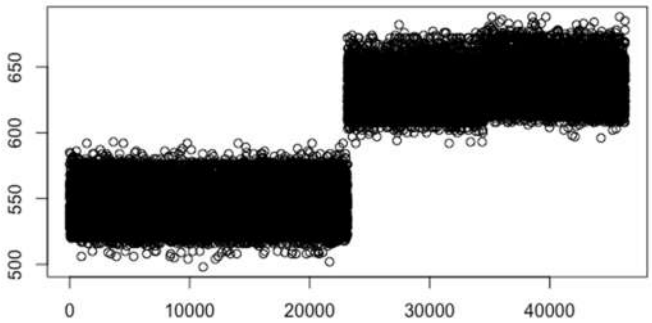
Os testes com bactérias foram inicialmente realizados com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 e um isolado de *Proteus mirabilis* J9103900 ajustados para a escala de McFarland 4,0. A análise foi realizada com a bactéria íntegra e com a suspensão obtida após processo de rompimento bacteriano por ultrassom. É possível inferir, pelos dados obtidos, que quando a bactéria sofre rompimento, consequentemente liberando as biomoléculas para o meio extracelular, alteram-se os valores de leitura de condutividade (Gráficos 44 e 45).

Gráfico 44 - Diferença entre *E. coli* ATCC 25922 íntegras em suspensão e após sonicação



Cada círculo representa uma medida de condutividade. O eixo Y representa o valor analógico liberado pelo condutivímetro e o eixo X representa quantidade de leituras. Na faixa de 0 a ~25000 – Suspensão de *E. coli* ajustada para escala de McFarland 4,0. Na faixa de ~25000 a 50000 – Suspensão de *E. coli* ajustada para escala de McFarland 4,0 submetida ao processo de lise por ultrassom.

Gráfico 45 – Diferença entre *P. mirabilis* J9103900 íntegras em suspensão e após sonicação



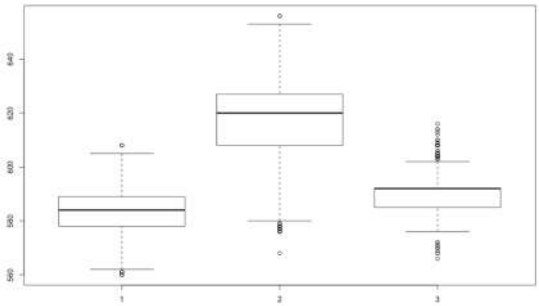
Cada círculo representa uma medida de condutividade. O eixo Y representa o valor analógico liberado pelo condutivímetro e o eixo X representa quantidade de leituras. Na faixa de 0 a ~25000 – Suspensão de *P. mirabilis* ajustada para escala de McFarland 4,0. Na faixa de ~25000 a 50000 – Suspensão *P. mirabilis* ajustada para escala de McFarland 4,0 submetida ao processo de lise por ultrassom.

5.2.2 Teste de triagem com bactérias expostas à polimixina B

Novos experimentos conduzidos utilizando o volume de 90 µL de suspensão bacteriana (realizados para *E. coli* ATCC 25922 e isolado de *P. mirabilis*) e 10 µL de solução de polimixina B a 20 mg/L, de forma com que a concentração final fosse de 2 mg/L, por se tratar do ponto de corte, segundo o BrCast para esse antimicrobiano. As medidas foram realizadas da suspensão bacteriana recém preparada, imediatamente após a adição de polimixina B e após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente (Gráficos 46 e 47). Foi possível observar a diferença na condutividade causada pela adição da polimixina (diferença entre as medidas 1 e 2). A bactéria *Escherichia coli* (sensível a polimixina) apresentou uma queda nos valores analógicos

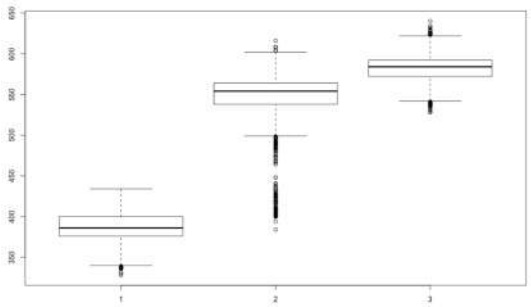
depois de 15 minutos de incubação com polimixina B (diferença entre as medidas 2 e 3), enquanto o *Proteus mirabilis* apresentou um aumento.

Gráfico 46 – *Escherichia coli* ATCC 25922 exposta a polimixina B



Eixo X representa o valor analógico liberado pelo condutivímetro e eixo X cada tempo analisado: (1) suspensão bacteriana, (2) suspensão bacteriana acrescida de polimixina a 2 mg/L e (3) após 15 minutos de incubação.

Gráfico 47 – *Proteus mirabilis* exposto a Polimixina B



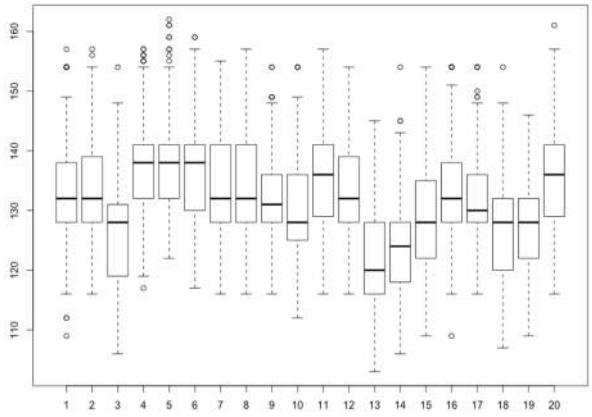
Eixo X representa o valor analógico liberado pelo condutivímetro e eixo X cada tempo analisado: (1) suspensão bacteriana, (2) suspensão bacteriana acrescida de polimixina à 2 mg/L e (3) após 15 minutos de incubação.

5.2.3 Teste de reprodutibilidade de medida com polimixina B e sulfato de sódio

Testes adicionais foram realizados para avaliar a reprodutibilidade de medidas dos sais sulfato de polimixina B e sulfato de sódio. Foram preparados 20 tubos com solução de polimixina B em uma concentração de 2 mg/L e 20 tubos com solução de sulfato de sódio na mesma concentração. Foi realizada uma medida de cada tubo e gráficos do tipo *boxplot* foram elaborados para avaliação da distribuição dos valores aferidos em cada tubo. Os gráficos 48 e 49 mostram que há uma variabilidade considerável entre as medidas, podendo significar falta de precisão para o método de condutividade. Um dos motivos para a falta de reprodutibilidade foi o tipo de corrente aplicada no método desenvolvido (utilização de corrente contínua). Quando a corrente

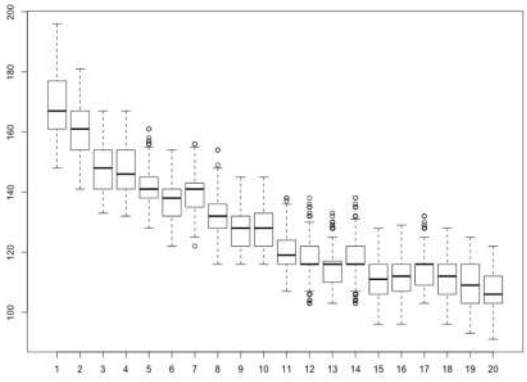
contínua é utilizada para avaliar a condutividade, os cátions migram na solução em direção ao eletrodo negativo, enquanto os ânions migram para o eletrodo positivo (Figura 14). Além disso, pode ocorrer um fenômeno físico chamado de “nuvem” de contra-íons, no qual os íons opostos não deixam que a molécula migre para o eletrodo oposto à sua carga (Figura 15). Para que haja estabilidade na leitura com uma maior precisão, se faz necessário aperfeiçoar o condutivímetro de forma que seja aplicada uma corrente alternada na suspensão bacteriana, desta forma os íons não conseguirão se mover de um lado para outro na solução, pois a cada fração de tempo a polaridade dos eletrodos será alterada (Figura 16) (GRIMALDI, 2018).

Gráfico 48 – Teste de reprodutibilidade com sulfato de polimixina B



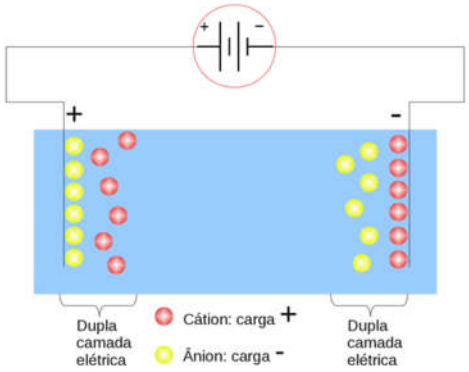
Há uma instabilidade na leitura analógica do microcontrolador, alterando a medida em cada tubo, podendo resultado em um falso resultado quando testado com bactérias.

Gráfico 49 – Teste de reprodutibilidade com sulfato de sódio



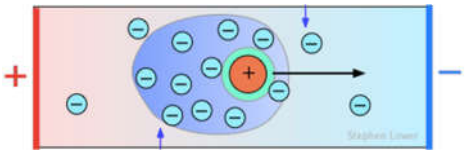
Há uma instabilidade na leitura analógica do microcontrolador, alterando a medida em cada tubo, podendo resultado em um falso resultado quando testado com bactérias.

Figura 14 – Esquema de corrente contínua aplicada em meio líquido



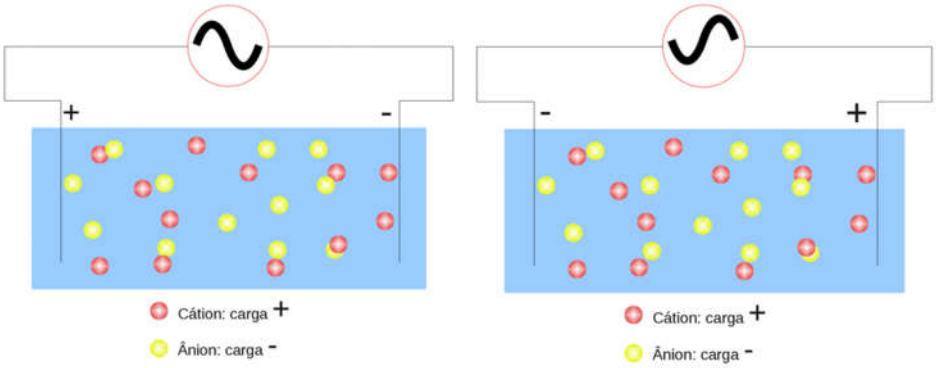
Quando se utiliza a corrente contínua para aferição da condutividade, os ânions tendem a formar uma camada próxima ao eletrodo positivo e os cátions ao eletrodo negativo. Retirado de (GRIMALDI, 2018).

Figura 15 – Nuvem de contra-íons



A “nuvem” de contra-íons ocorre quando há uma quantidade maior dos íons contrários à molécula que está migrando para seu polo oposto. Esse fenômeno não permite a estabilidade de leitura analógica. Retirado de (GRIMALDI, 2018).

Figura 16 – Corrente alternada aplicada em meio líquido



A corrente alternada faz com que os polos se alternem em pequenas frações de tempo, não permitindo que os íons migrem para os polos opostos. Retirado de (GRIMALDI, 2018).

6 CONCLUSÕES

O teste rápido para triagem de isolados resistentes à polimixina B, utilizando citometria de fluxo funciona com altas concentrações do antibiótico mesmo para bactérias intrinsecamente resistentes, tem potencial para funcionar com cepas sensíveis, no entanto concentrações próximas ao ponto de corte precisam ser avaliadas com bactérias com CIMs próximas ao ponto de corte.

A determinação da concentração inibitória mínima para amicacina, meropenem e polimixina B, utilizando citometria de fluxo obteve uma concordância superior a 94% quando comparada com microdiluição em caldo.

O método de condutividade elétrica é capaz de detectar pequenas alterações em meios líquidos, portanto, consegue diferenciar células íntegras das lisadas, seja por lise física ou por exposição ao antibiótico polimixina B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCELERATE DIAGNOSTICS, I. Morphokinetic Cellular Analysis. 2018. Disponível em: < http://acceleratediagnostics.com/technology/mca/ >. Acesso em: 13/09/2018.

ALVAREZ-BARRIENTOS, A. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev,** v. 13, n. 2, p. 167-95, Apr 2000.

AMBRIZ-AVINA, V.; CONTRERAS-GARDUNO, J. A.; PEDRAZA-REYES, M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 461941, 2014.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. v. 47, p. 219–225, 1975.

ANTONELLI, A. et al. KPC-31 expressed in a ceftazidime/avibactam-resistant Klebsiella pneumoniae is associated with relevant detection issues. **J Antimicrob Chemother,** v. 74, n. 8, p. 2464-2466, Aug 1 2019.

BANCALARI, E. et al. Application of Impedance Microbiology for Evaluating Potential Acidifying Performances of Starter Lactic Acid Bacteria to Employ in Milk Transformation. **Front Microbiol,** v. 7, p. 1628, 2016.

BARBOSA, J. et al. Evaluation of Giardia duodenalis viability after metronidazole treatment by flow cytometry. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 8, p. 1078-80, Dec 2014.

BARENFANGER, J.; DRAKE, C.; KACICH, G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. **J Clin Microbiol,** v. 37, n. 5, p. 1415-8, May 1999.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chem Biol,** v. 8, n. 1, p. 105-15, Jan 18 2013.

BECTON, D. A. C. BBLTM PromptTM Inoculation System For use with the Disc Diffusion Susceptibility Test. 2010. Disponível em: < http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8808061(201006).pdf >.

BIOMERIÉUX. ETEST APPLICATION GUIDE. 2012. Disponível em: < (https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/supplementary_inserts_-_16273_-_b_-_en_-_eag_-_etest_application_guide-3.pdf) >.

BIOSCIENCES, B. Spectrum viewer. 2019. Disponível em: < https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/product-selection-tools/spectrum-viewer. >. Acesso em: 21/09/2019.

BOI, P. et al. Evaluation of Escherichia coli viability by flow cytometry: A method for determining bacterial responses to antibiotic exposure. **Cytometry B Clin Cytom,** v. 88, n. 3, p. 149-53, May-Jun 2015.

BOWNDS, S. E. et al. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. **J Clin Microbiol,** v. 34, n. 6, p. 1386-90, Jun 1996.

BRITANNICA, E. Platinum. 2018. Disponível em: < https://www.britannica.com/science/platinum >. Acesso em: 31/08/2018.

BRITANNICA, E. Semiconductor. 2018. Disponível em: < https://www.britannica.com/science/semiconductor >. Acesso em: 31/02/2018.

BROEREN, M. A. et al. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. **Clin Microbiol Infect,** v. 19, n. 3, p. 286-91, Mar 2013.

BURNHAM, C. A. et al. Rapid ertapenem susceptibility testing and Klebsiella pneumoniae carbapenemase phenotype detection in Klebsiella pneumoniae isolates by use of automated microscopy of immobilized live bacterial cells. **J Clin Microbiol,** v. 52, n. 3, p. 982-6, Mar 2014.

BURNS, J. L. et al. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol,** v. 38, n. 5, p. 1818-22, May 2000.

BURT HOUTZ; JOE TROTTER; SASAKI, D. Tips on Cell Preparation for Flow Cytometric Analysis and Sorting, BD FACService TECHNOTES. 2004.

CHANDRASEKARAN, S. et al. Direct-from-Blood-Culture Disk Diffusion To Determine Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria: Preliminary Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. **J Clin Microbiol,** v. 56, n. 3, Mar 2018.

CHAPIN, K. C.; MUSGNUG, M. C. Direct susceptibility testing of positive blood cultures by using Sensititre broth microdilution plates. **J Clin Microbiol,** v. 41, n. 10, p. 4751-4, Oct 2003.

CHOI, J. et al. Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 1148, Apr 25 2017.

CHOI, J. et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. **Lab Chip,** v. 13, n. 2, p. 280-7, Jan 21 2013.

CHOI, J. et al. A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis. **Sci Transl Med,** v. 6, n. 267, p. 267ra174, Dec 17 2014.

CLAUSELL, A. et al. Influence of polymyxins on the structural dynamics of Escherichia coli lipid membranes. **Talanta,** v. 60, n. 2-3, p. 225-34, Jun 13 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019., 2019.

COHEN, C. Y.; SAHAR, E. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. **J Clin Microbiol,** v. 27, n. 6, p. 1250-6, Jun 1989.

COQUE, T. M. et al. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 2, p. 500-10, Feb 2002.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. Potential Impact of Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing on the Clinical Management of Gram-Negative Bacteremia Using the FASTinov((R)) Kit. **Front Microbiol,** v. 8, p. 2455, 2017.

COYLE, M. B. et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. **J Clin Microbiol,** v. 20, n. 3, p. 473-7, Sep 1984.

DAIKOS, G. L. et al. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 58, n. 4, p. 2322-8, 2014.

DE CUETO, M. et al. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 8, p. 3734-8, Aug 2004.

DERIS, Z. Z. et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. **J Antibiot (Tokyo),** v. 67, n. 2, p. 147-51, Feb 2014.

DOERN, G. V. et al. Evaluation of a direct blood culture disk diffusion antimicrobial susceptibility test. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 20, n. 5, p. 696-8, Nov 1981.

DOERN, G. V. et al. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. **J Clin Microbiol,** v. 32, n. 7, p. 1757-62, Jul 1994.

EL-MAHALLAWY, H. A. et al. Bacteremia due to ESKAPE pathogens: An emerging problem in cancer patients. **J Egypt Natl Canc Inst,** v. 28, n. 3, p. 157-62, Sep 2016.

ELLIS, B. et al. **flowCore: Basic structures for flow cytometry data. R package version 1.50.0.**: Bioconductor version: Release (3.9) 2019.

EUCAST, C. E. D. T. D. S. A. A. EUCAST Expert Rules Version 3.1. Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Tables. 2016.

_____. Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. 2019.

EUCAST, C. E. D. T. D. S. A. A.; BRCAST, C. B. D. T. D. S. A. A. Controle de Qualidade de Rotina e Controle de Qualidade Interno para Determinação da CIM e Disco-Difusão Conforme Recomendação do BrCAST - EUCAST. 2018.

_____. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2019.

FARIA-RAMOS, I. et al. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect,** v. 19, n. 1, p. E8-E15, Jan 2013.

FAY, D.; OLDFATHER, J. E. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. **J Clin Microbiol,** v. 9, n. 3, p. 347-50, Mar 1979.

FDA, U. S. D. O. H. A. H. S. F. A. D. A. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. 2009.

FOUNOU, R. C.; FOUNOU, L. L.; ESSACK, S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One,** v. 12, n. 12, p. e0189621, 2017.

FREDBORG, M. et al. Real-time optical antimicrobial susceptibility testing. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 7, p. 2047-53, Jul 2013.

FREDRICKS, B. A. et al. Rapid pyrazinamide susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by flow cytometry. **J Microbiol Methods,** v. 67, n. 2, p. 266-72, Nov 2006.

GAIBANI, P. et al. In vivo evolution of resistant subpopulations of KPC-producing Klebsiella pneumoniae during ceftazidime/avibactam treatment. **J Antimicrob Chemother,** v. 73, n. 6, p. 1525-1529, Jun 1 2018.

GALANI, I. et al. Genomic characterization of a KPC-23-producing Klebsiella pneumoniae ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. **Clin Microbiol Infect,** v. 25, n. 6, p. 763 e5-763 e8, Jun 2019.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 73, n. 4, p. 354-60, Aug 2012.

GANT, V. A. et al. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. **J Med Microbiol,** v. 39, n. 2, p. 147-54, Aug 1993.

GASINK, L. B. et al. Risk factors and clinical impact of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae. **Infect Control Hosp Epidemiol,** v. 30, n. 12, p. 1180-5, Dec 2009.

GAUTHIER, C.; ST-PIERRE, Y.; VILLEMUR, R. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. **J Med Microbiol,** v. 51, n. 3, p. 192-200, Mar 2002.

GIVAN, A. L. **Flow cytometry : first principles**. 2ª. New York: Wiley-Liss, 2001. ISBN 0-471-38224-8.

GRIMALDI, N. M. C. Condutimetria. 2018. Disponível em: < http://www.c2o.pro.br/hackaguas/apes03.html >. Acesso em: 31/08/2018.

HAIDAR, G. et al. Mutations in blaKPC-3 That Confer Ceftazidime-Avibactam Resistance Encode Novel KPC-3 Variants That Function as Extended-Spectrum beta-Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 61, n. 5, May 2017.

HOUGHTON, J. L. et al. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? **Chembiochem,** v. 11, n. 7, p. 880-902, May 3 2010.

HOYOS-MALLECOT, Y. et al. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. **J Microbiol Methods,** v. 105, p. 98-101, Oct 2014.

HUANG, A. H. et al. Direct antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli in blood cultures by an electrochemical method. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 10, p. 2882-6, Oct 1998.

IDELEVICH, E. A. et al. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. **Clin Microbiol Infect,** v. 24, n. 7, p. 738-743, Jul 2018.

INGLIS, T. J. J.; EKELUND, O. Rapid antimicrobial susceptibility tests for sepsis; the road ahead. **J Med Microbiol,** v. 68, n. 7, p. 973-977, Jul 2019.

JEPRAS, R. I. et al. Rapid assessment of antibiotic effects on Escherichia coli by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 41, n. 9, p. 2001-5, Sep 1997.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clin Infect Dis,** v. 49, n. 11, p. 1749-55, Dec 1 2009.

JORGENSEN, S. C. J.; RYBAK, M. J. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Pharmacotherapy,** v. 38, n. 4, p. 444-461, Apr 2018.

JUNG, J. S. et al. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 33, n. 6, p. 949-55, Jun 2014.

KIEHN, T. E.; CAPITOLO, C.; ARMSTRONG, D. Comparison of direct and standard microtiter broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. **J Clin Microbiol,** v. 16, n. 1, p. 96-8, Jul 1982.

KIRK, S. M. et al. Flow cytometric testing of susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 6, p. 1568-73, Jun 1998.

LESLEY, E. S. **A method for identifying bacteria in a sample**. WO2011138765A1 2011.

LI, M. et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a qualitative method in Acinetobacter baumannii complex. **J Microbiol Methods**, Sep 4 2018.

LIVERMORE, D. M. et al. In vitro selection of ceftazidime-avibactam resistance in Enterobacteriaceae with KPC-3 carbapenemase. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 59, n. 9, p. 5324-30, Sep 2015.

MACHEN, A.; DRAKE, T.; WANG, Y. F. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. **PLoS One,** v. 9, n. 2, p. e87870, 2014.

MARCH-ROSSELLO, G. A. Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. **Enferm Infecc Microbiol Clin,** v. 35, n. 3, p. 182-188, Mar 2017.

MARTINEZ, O. V. et al. The effect of some beta-lactam antibiotics on Escherichia coli studied by flow cytometry. **Cytometry,** v. 3, n. 2, p. 129-33, Sep 1982.

MOELLERING, R. C., JR.; ELIOPOULOS, G. M.; SENTOCHNIK, D. E. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. **J Antimicrob Chemother,** v. 24 Suppl A, p. 1-7, Sep 1989.

MOHAN, R. et al. A multiplexed microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing. **Biosens Bioelectron,** v. 49, p. 118-25, Nov 15 2013.

MULLER, S.; NEBE-VON-CARON, G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. **FEMS Microbiol Rev,** v. 34, n. 4, p. 554-87, Jul 2010.

MULRONEY, K. T. et al. Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 1903, May 15 2017.

_____. Author Correction: Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Sci Rep,** v. 8, n. 1, p. 6697, Apr 24 2018.

NCBI, N. C. F. B. I. Platinum. 2018. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23939 >. Acesso em: 31/08/2018.

NCBI, N. C. F. B. I. PubChem - Thiazole Orange. 2019. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov//#query=Thiazole-orange) >.

NOBLE, P. A. Hypothetical model for monitoring microbial growth by using capacitance measurements--a minireview. **J Microbiol Methods,** v. 37, n. 1, p. 45-9, Jul 1999.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis,** v. 22, n. 6, p. 1038-43, Jun 2016.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis,** v. 18, n. 9, p. 1503-7, Sep 2012.

O'DRISCOLL, N. H. et al. Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. **Arch Microbiol,** v. 200, n. 5, p. 793-802, Jul 2018.

PANCHOLI, P. et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. **J Clin Microbiol,** v. 56, n. 4, Apr 2018.

PANTEL, A.; MONIER, J.; LAVIGNE, J. P. Performance of the Accelerate Pheno system for identification and antimicrobial susceptibility testing of a panel of multidrug-resistant Gram-negative bacilli directly from positive blood cultures. **J Antimicrob Chemother,** v. 73, n. 6, p. 1546-1552, Jun 1 2018.

PEREZ, K. K. et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. **Arch Pathol Lab Med,** v. 137, n. 9, p. 1247-54, Sep 2013.

PINA-VAZ, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. Safe susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. **J Med Microbiol,** v. 54, n. Pt 1, p. 77-81, Jan 2005.

PINA-VAZ, C. I. A. et al. **Fluorescent method of detecting microorganisms resistant to a therapeutic agent**. 9,290,790 B2 2012.

PINA-VAZ, C. I. A. et al. **Kit and method of detecting the resistant microorganisms to a therapeutic agent**. WO2012164547 A1 2012.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 12, p. 4281-3, Dec 2013.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Rev,** v. 30, n. 2, p. 557-596, Apr 2017.

QUILES, M. G. et al. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. **BMC Infect Dis,** v. 15, p. 283, Jul 23 2015.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. **Molecules,** v. 22, n. 12, Dec 19 2017.

RAMIREZ, M. S. et al. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the Paradigm. **Microbiol Spectr,** v. 2, n. 5, p. 1-15, 2014.

RAMÍREZ, N. et al. Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for a fast microbiological diagnosis. **Biotecnología Aplicada,** v. 26, p. 72-78, 2009.

RAUGEL, P. J. Ranges of Products Manufactured by the Industry and Environment Division of bioMerieux. **Rapid Food Analysis and Hygiene Monitoring**, 1999. Disponível em: < https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-58362-9_9.pdf >. Acesso em: 31/08/2018.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Res Int,** v. 2016, p. 2475067, 2016.

SECO, B. M. S. et al. Improved blood culture workflow for faster identification of KPC-producing Enterobacterales. **Braz J Microbiol,** v. 50, n. 1, p. 127-132, Jan 2019.

SHIRLEY, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs,** v. 78, n. 6, p. 675-692, Apr 2018.

SHRESTHA, N. K. et al. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus by flow cytometry after brief antibiotic exposure. **J Clin Microbiol,** v. 49, n. 6, p. 2116-20, Jun 2011.

SHRESTHA, N. K. et al. Immuno-flow cytometry for the rapid identification of Staphylococcus aureus and the detection of methicillin resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 8, p. 1879-82, Aug 2012.

SILVA, A. P. et al. Rapid Flow Cytometry Test for Identification of Different Carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 6, p. 3824-6, Jun 2016.

SOEJIMA, T.; MINAMI, J.; IWATSUKI, K. The exclusive use of flow cytometry to evaluate the antibiotic-susceptibility. **Biochim Biophys Acta,** v. 1820, n. 12, p. 1980-6, Dec 2012.

STEWART, G. N. The Charges Produced by the Growth of Bacteria in the Molecular Concentration and Electrical Conductivity of Culture Media. **J Exp Med,** v. 4, n. 2, p. 235-43, Mar 1 1899.

TABER, H. W. et al. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. **Microbiol Rev,** v. 51, n. 4, p. 439-57, Dec 1987.

TANG, Y. et al. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. **Anal Chem,** v. 85, n. 5, p. 2787-94, Mar 5 2013.

TRAN, T. B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? **Int J Antimicrob Agents,** v. 48, n. 6, p. 592-597, Dec 2016.

TRENHOLME, G. M. et al. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. **J Clin Microbiol,** v. 27, n. 6, p. 1342-5, Jun 1989.

TUMBARELLO, M.; LOSITO, A. R.; GIAMARELLOU, H. Optimizing therapy in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Curr Opin Infect Dis,** v. 31, n. 6, p. 566-577, Dec 2018.

TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 7, p. 2133-43, Jul 2015.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol Rev,** v. 56, n. 3, p. 395-411, Sep 1992.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev,** v. 16, n. 3, p. 430-50, Jul 2003.

VALE-SILVA, L. A. et al. Comparison of the Etest and a rapid flow cytometry-based method with the reference CLSI broth microdilution protocol M27-A3 for the echinocandin susceptibility testing of Candida spp. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 6, p. 941-6, Jun 2012.

VAN BELKUM, A.; DUNNE, W. M., JR. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 7, p. 2018-24, Jul 2013.

VAN, P. et al. **ggcyto: Next-generation open-source visualization software for cytometry.** Bioinformatics 2018.

VANHOOF, R.; SONCK, P.; HANNECART-POKORNI, E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia. **J Antimicrob Chemother,** v. 35, n. 1, p. 167-71, Jan 1995.

WAITES, K. B. et al. Direct susceptibility testing with positive BacT/Alert blood cultures by using MicroScan overnight and rapid panels. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 7, p. 2052-6, Jul 1998.

WALBERG, M.; GAUSTAD, P.; STEEN, H. B. Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. **J Antimicrob Chemother,** v. 37, n. 6, p. 1063-75, Jun 1996.

WANG, Z. et al. A flow cytometry-based quantitative drug sensitivity assay for all Plasmodium falciparum gametocyte stages. **PLoS One,** v. 9, n. 4, p. e93825, 2014.

WEGNER, D. L.; MATHIS, C. R.; NEBLETT, T. R. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapidly growing blood pathogens. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 9, n. 5, p. 861-2, May 1976.

WEME, E. T. Rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by direct inoculation and reading of disc diffusion tests after 3-4 hours. **APMIS,** v. 126, n. 11, p. 870-876, Nov 2018.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** : Springer-Verlag New York 2016.

_____. **stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations** 2019.

WIMMER, J. L. et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. **J Clin Microbiol,** v. 50, n. 7, p. 2452-4, Jul 2012.

WOLOJ, M. et al. Plasmid-encoded amikacin resistance in multiresistant strains of Klebsiella pneumoniae isolated from neonates with meningitis. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 29, n. 2, p. 315-9, Feb 1986.

ZAHAVY, E. et al. Rapid Antibiotic Susceptibility Determination for Yersinia pestis Using Flow Cytometry Spectral Intensity Ratio (SIR) Fluorescence Analysis. **J Fluoresc**, Aug 16 2018.

ZHANG, L. et al. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 44, n. 12, p. 3317-21, Dec 2000.

APÊNDICE

Algoritmo em linguagem R para preparação dos dados em arquivos com extensão “.FCS” e análise automatizada da determinação da concentração inibitória mínima por citometria de fluxo. Foram utilizadas as bibliotecas flowCore (Bioconductor), ggcyto, stringr e ggplot2. As frases evidenciadas em verde e com o símbolo “#” indicam os comentários do algoritmo para facilitar o entendimento do usuário. Frases em vermelho indicam o local para informar o diretório dos arquivos e id da amostra.

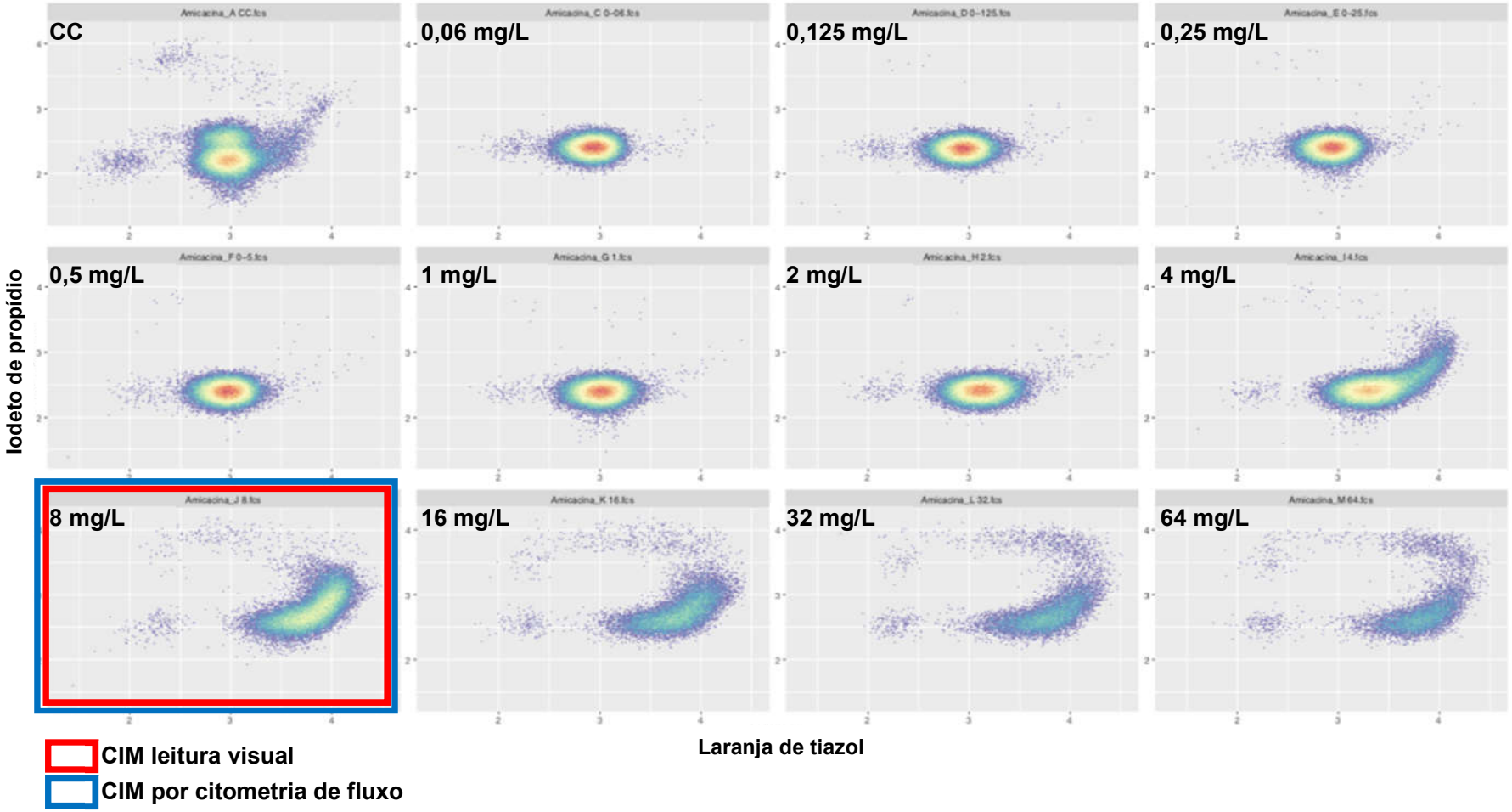
```
################## Início de análise ####################
###### Algoritmo para determinação de CIM por CF  ######
# Escrito por: Darlan A. C. Rocha                      #
# email:darlanbiomedico@gmail.com                      #
# Lembre-se de informar o diretório e id da amostra    #
########################################################
#limpar o ambiente RStudio
# Limpar gráficos do ambiente RStudio
if(!is.null(dev.list())) dev.off()
# Limpar console do ambiente RStudio
cat("\014")
# Limpar workspace do ambiente RStudio
rm(list=ls())


#carregar bibliotecas utilizadas para a análise R
require(flowCore) #biblioteca para abrir e utilizar arquivos .FCS
require(ggcyto) #fazer gráficos de flowset
require(stringr) #trabalhar com strings
require(ggplot2) # biblioteca para gráficos


###################
#número sequencial e ID da hemocultura (arquivos organizados em pastas com
todos os arquivos na mesma pasta e nomeada com a id da amostra)
experimento='identificação da amostra'
###################

#Indicar o diretório
path=paste("~/diretorio/",experimento,"/Antibiotico",sep="")
setwd(path)


#realizar a leitura de todos arquivos fcs em um único fluxo
fs=read.flowSet()
```

```
#fazer gate em beads e contá-las
beadsgate=rectangleGate(filterId="nondebris",'FITC-H'=c(25000,75000), 'SSC-
A'=c(12500,50000))
my.filter=filter(fs,beadsgate)
fs4=Subset(fs,my.filter)
c=autoplot(fs4, "FITC-A", "SSC-A",bins = 200)+ylim(0,50000)
d=autoplot(fs4, "FITC-H", "PerCP-Cy5-5-H",bins = 200)

beads= fsApply(fs4,nrow)

#define gates sem debris
nondebris=rectangleGate(filterId="nondebris",'Time'=c(200,750), 'SSC-
A'=c(0.1,262143))

#define filtros
my.filter=filter(fs,nondebris)

#aplica o filtro do gate
fs2=Subset(fs,my.filter)

#define o metodo de transformação (log10)
tf=transformList(from=colnames(fs2),tfun=log10)

#executa a transformação
fs3=tf %on% fs2

# Plot tamanho x complexidade - contagem beads e exclusão de doublets
a= autoplot(fs2,"Time","SSC-A", bins=200)
b=autoplot(fs3, "FSC-A", "SSC-A",bins = 200)

#faz gate somente em singlets e conta bacterias
singlets=rectangleGate(filterId="nondebris",'FSC-A'=c(0.1,5), 'SSC-A'=c(0.1,2.7))
my.filter=filter(fs3,singlets)
fs5=Subset(fs3,my.filter)
e=autoplot(fs5, "FSC-A", "SSC-A",bins = 200) + ylim(2,3) + xlim(2,5)
bacterias= fsApply(fs5,nrow)
bacterias=round(bacterias/550,2)

#plots de fluorescencia provenientes de fs5
f=autoplot(fs5,"FITC-H","PerCP-Cy5-5-H",bins = 200)

#histograma
g=densityplot(~.,fs5,channels=c("FITC-H","PerCP-Cy5-5-H"),xlim=c(1.5,5))

#fazer gate em duplos positivos
duplopos=rectangleGate(filterId="nondebris","FITC-H"=c(3,5), "PerCP-Cy5-5-
H"=c(3,5))

my.filter=filter(fs5,duplopos)
fs6=Subset(fs5,my.filter)
```

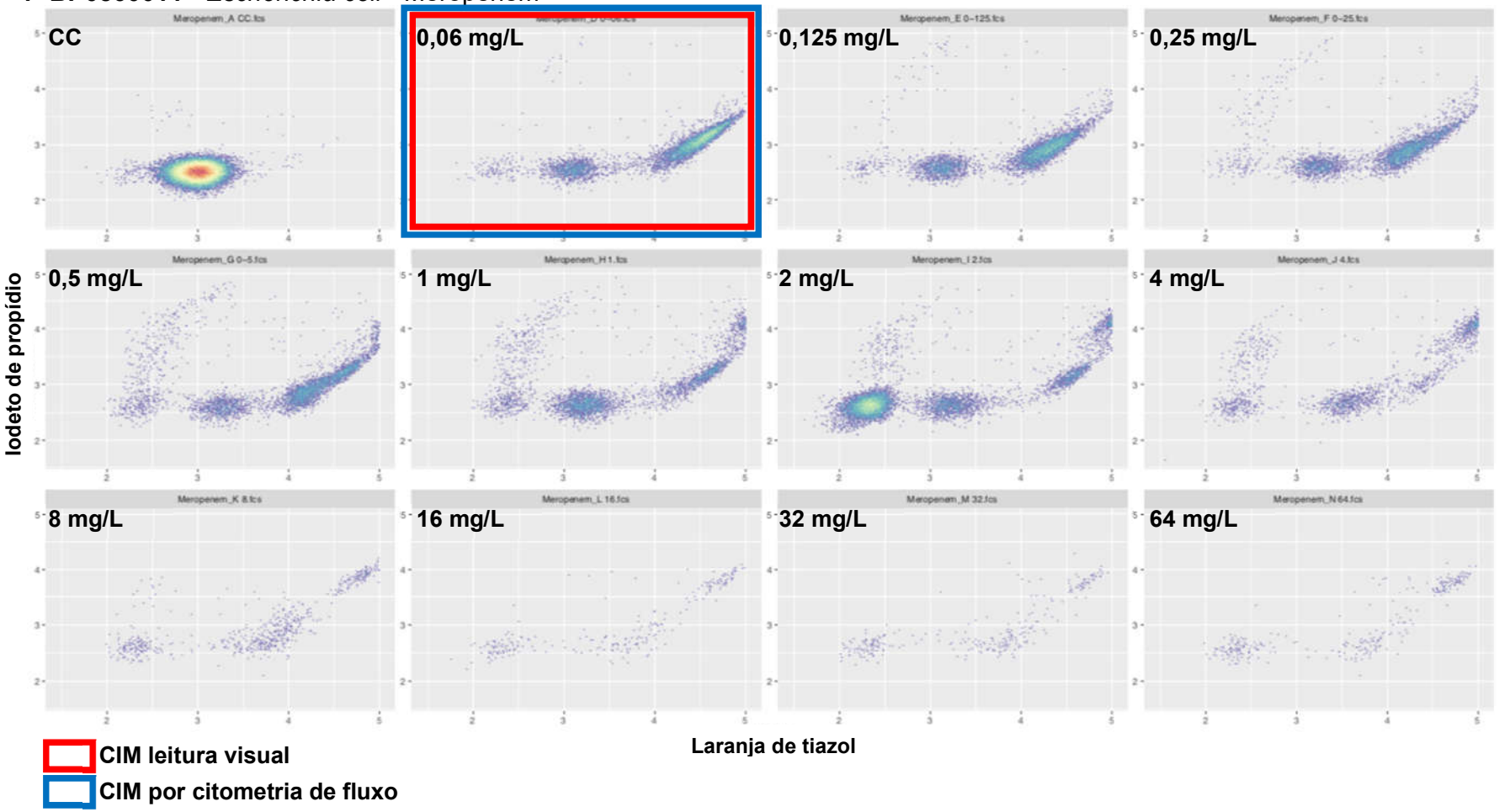
```
mortas= fsApply(fs6,nrow)
mortas=round(mortas/550,2)

#plots de fluorescencia provenientes de fs6
h=autoplot(fs6, "FITC-H", "PerCP-Cy5-5-H",bins = 200)


#cria dataframe para análise
data = as.data.frame(cbind(beads,bacterias,mortas))
colnames(data)=c("beads","bacterias","mortas")
x=str_sub(rownames(data),start = 23,end=-5)
y=str_sub(rownames(data),end=-5)
data <- cbind(Concentracoes = x,Ordem=y, data)
rownames(data) <- NULL

bacM.ul=floor((mortas/beads)*((997*10)/112))
data <- cbind(data,bacM.ul)
bacV.ul=(floor((bacterias/beads)*((997*10)/112)))-bacM.ul
data <- cbind(data,bacV.ul)
relacao=round((mortas/bacterias)*100,2)
data <- cbind(data,relacao)
rownames(data) <- NULL

data1=data[,-c(3,4,5,8)]

#Grafico de populacoes em barras empilhadas
library(reshape2) # reorganizar os dados para fazer grafico empilhado
molten = melt(data1, variable.name = "condicao", value.name = "valores")

i=ggplot(data=molten, aes(x=Ordem, y=valores, fill=condicao)) +
  geom_bar(stat="identity")+
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1))
```

```
# Cria arquivo .PDF para análise e registro do dado e gráficos
library(gridExtra)
pdf(file="Resultado.PDF",width=20,height=10)
a
b
c
d
e
f
g
h
i
tbl=data
grid.arrange(plt, tbl,
             nrow=2,
             as.table=TRUE,
             heights=c(3,1))
grid.table(data)

dev.off()
############## Fim de analise ################
```

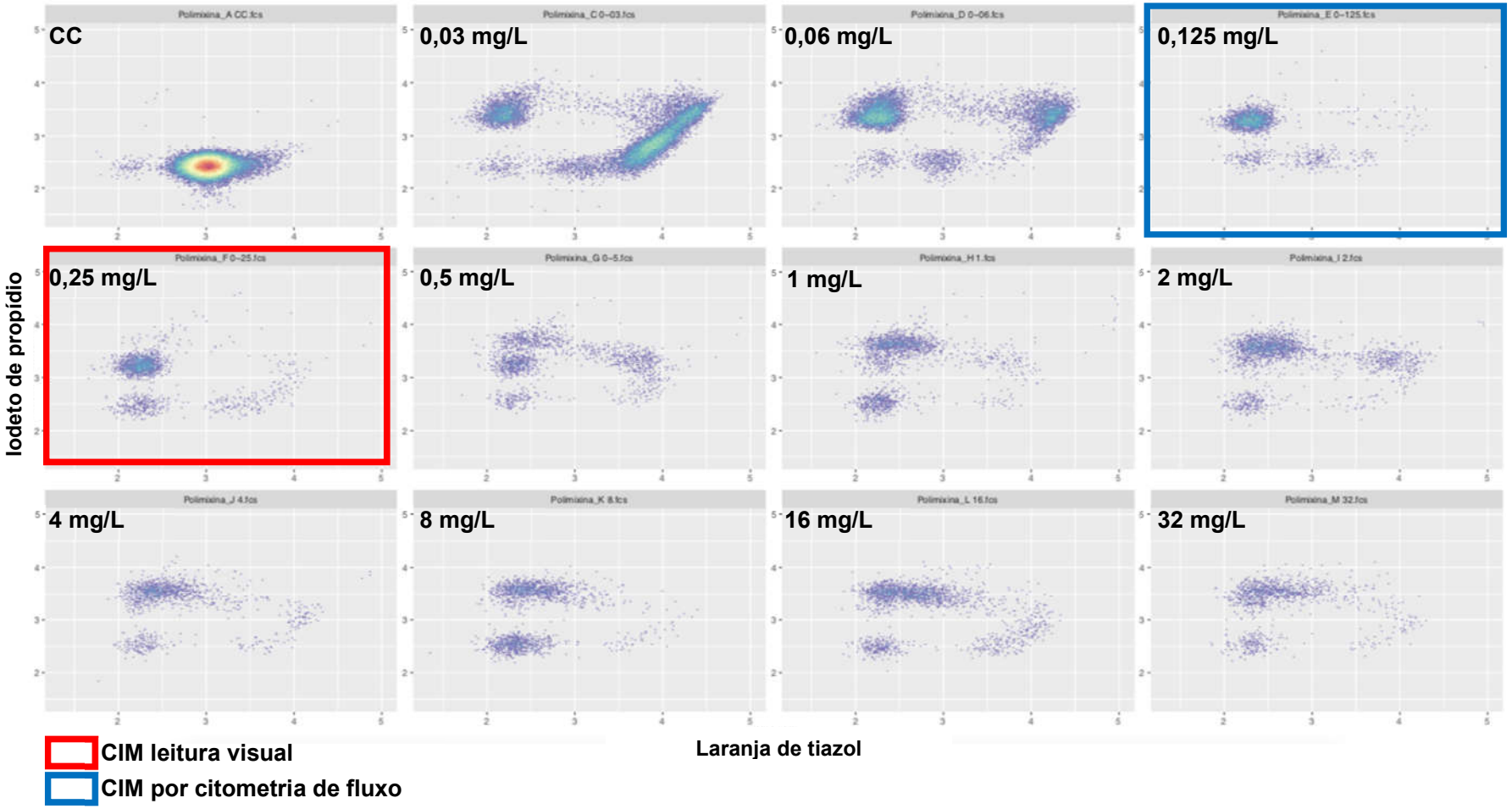
Resultados da determinação da CIM por MC e por CF.
1- BP0860011 - *Escherichia coli* - Amicacina



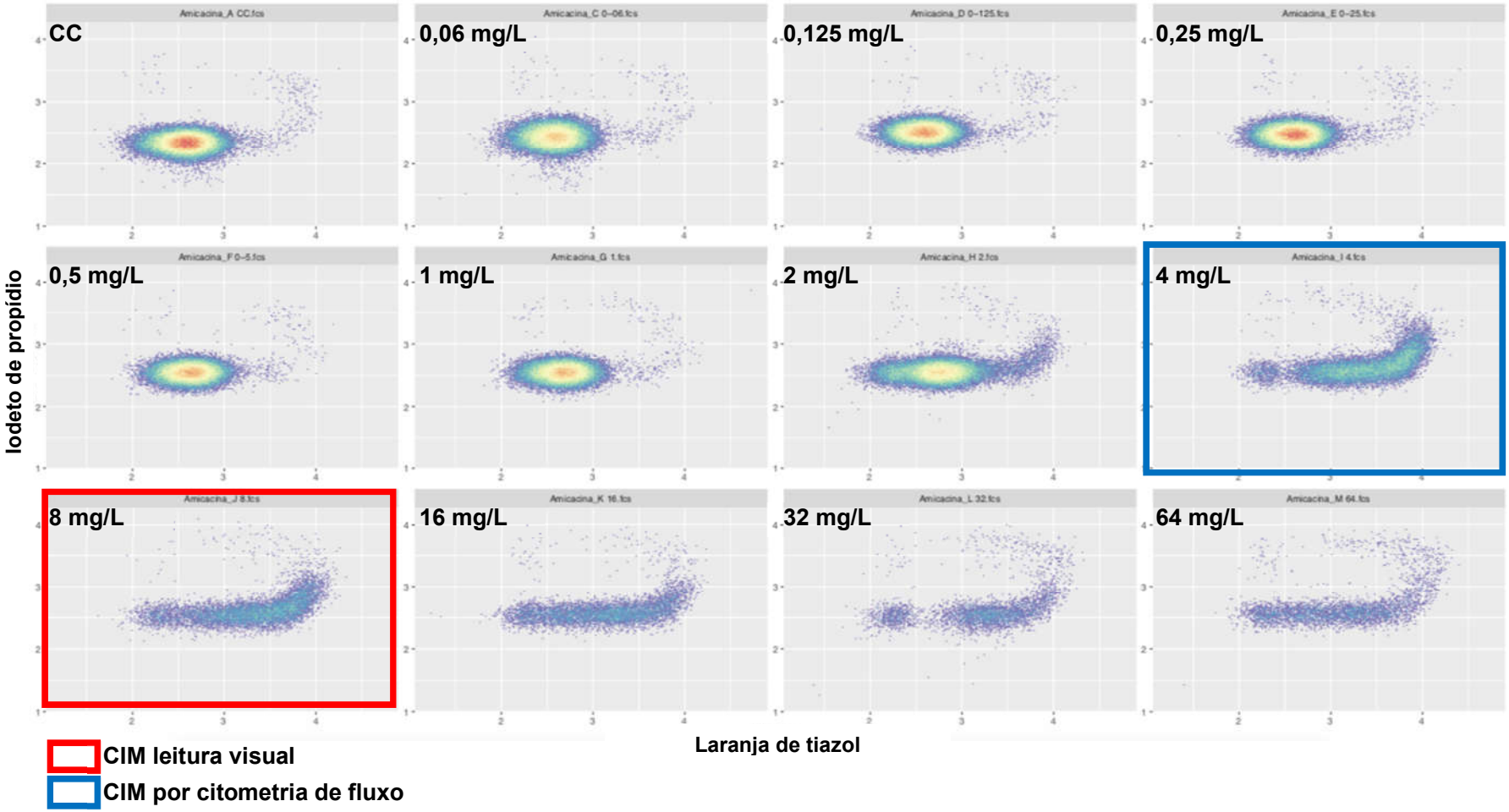
1- BP0860011 - *Escherichia coli* - Meropenem



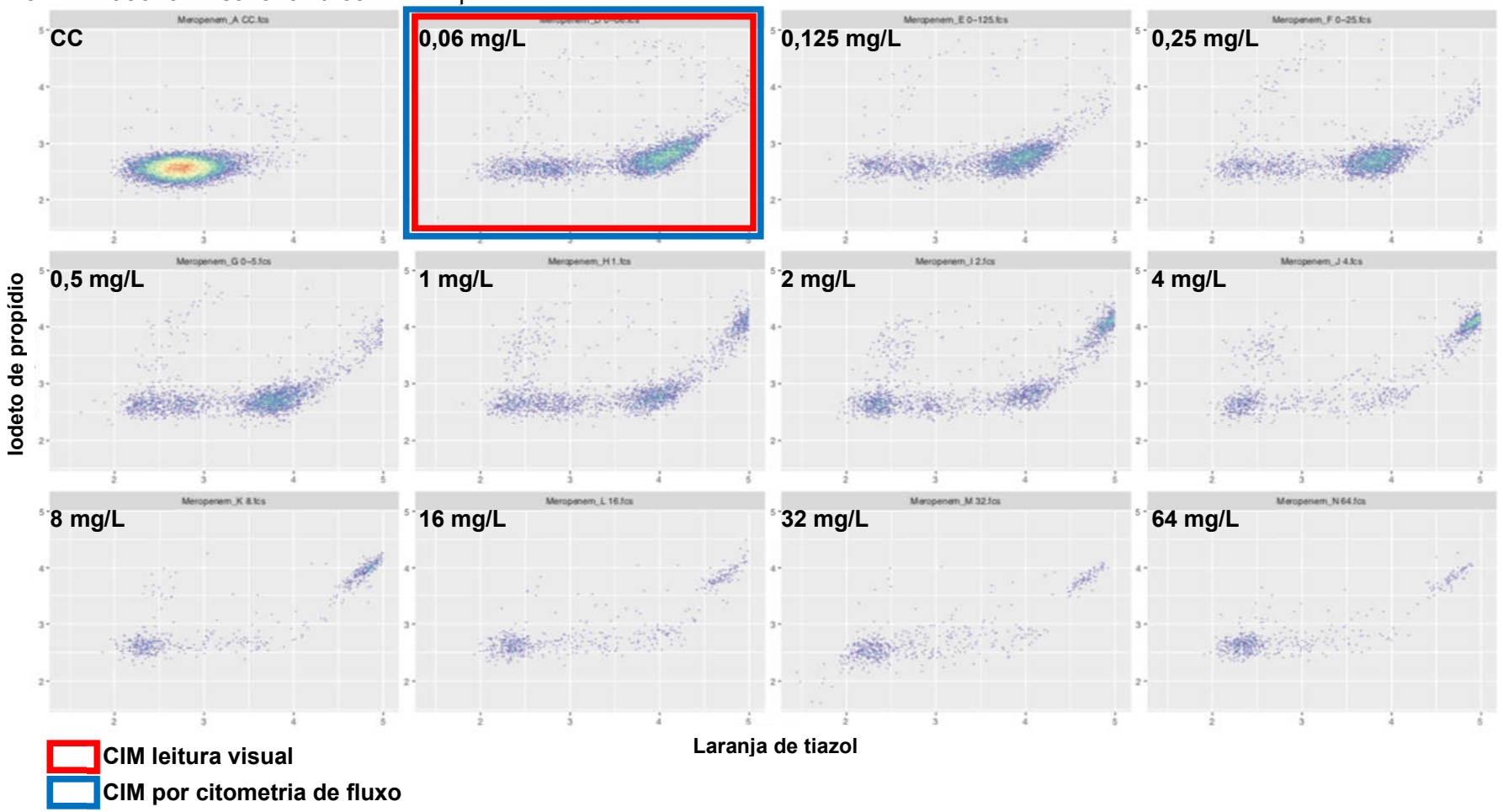
1- BP0860011 - *Escherichia coli* - Polimixina



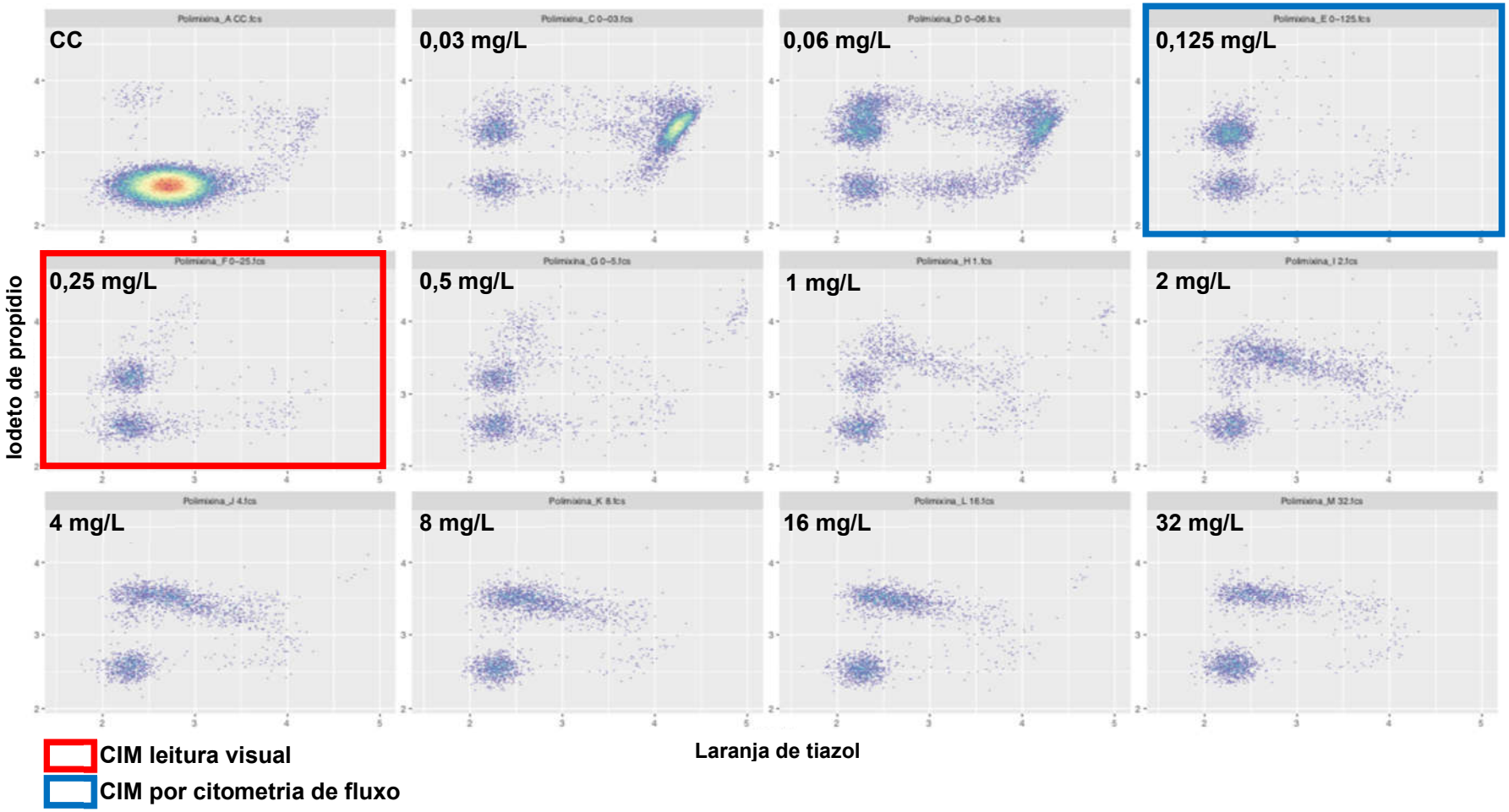
3 – L2193623 - *Escherichia coli* - Amicacina



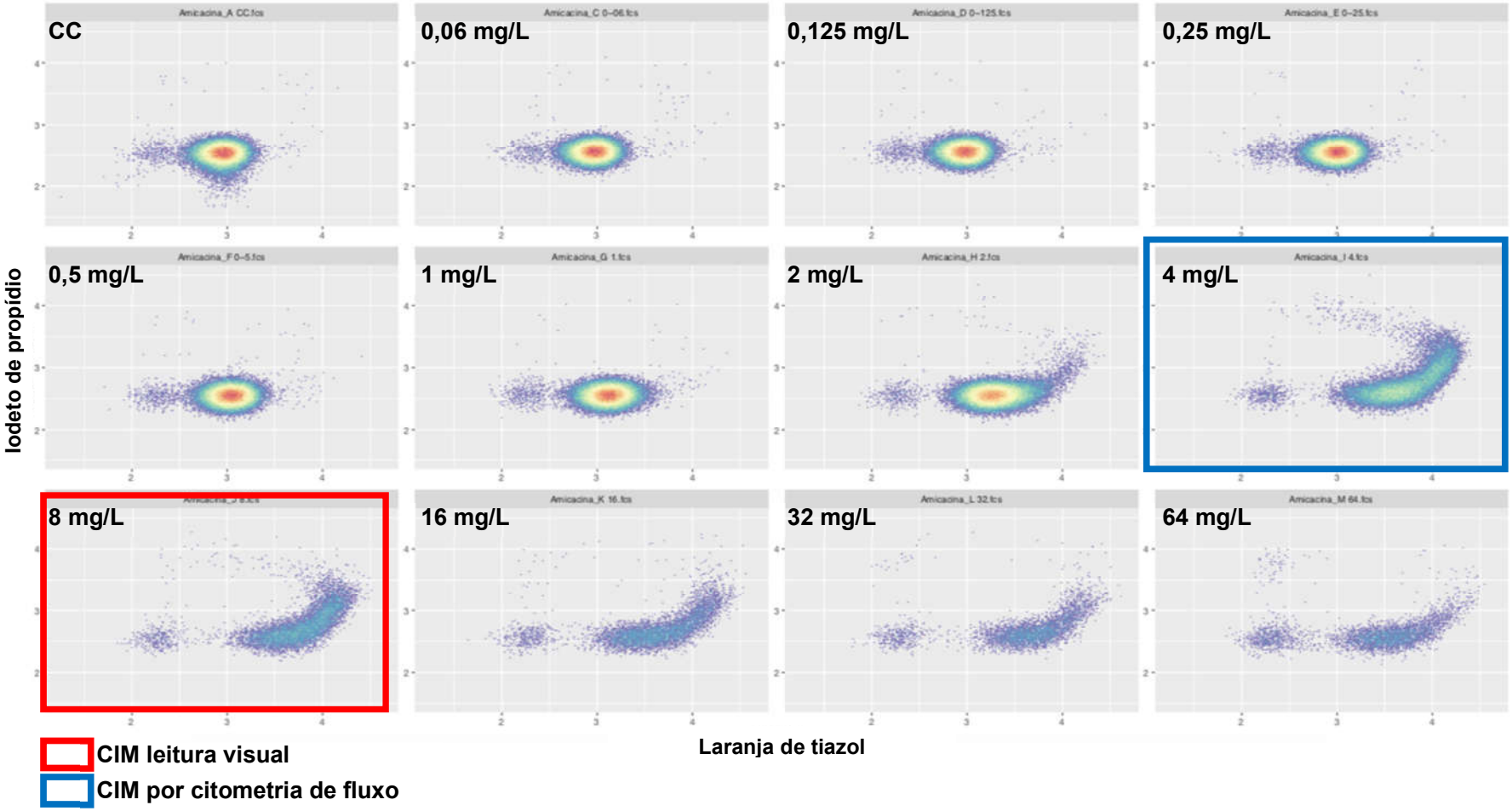
3 – L2193623 - *Escherichia coli* - Meropenem



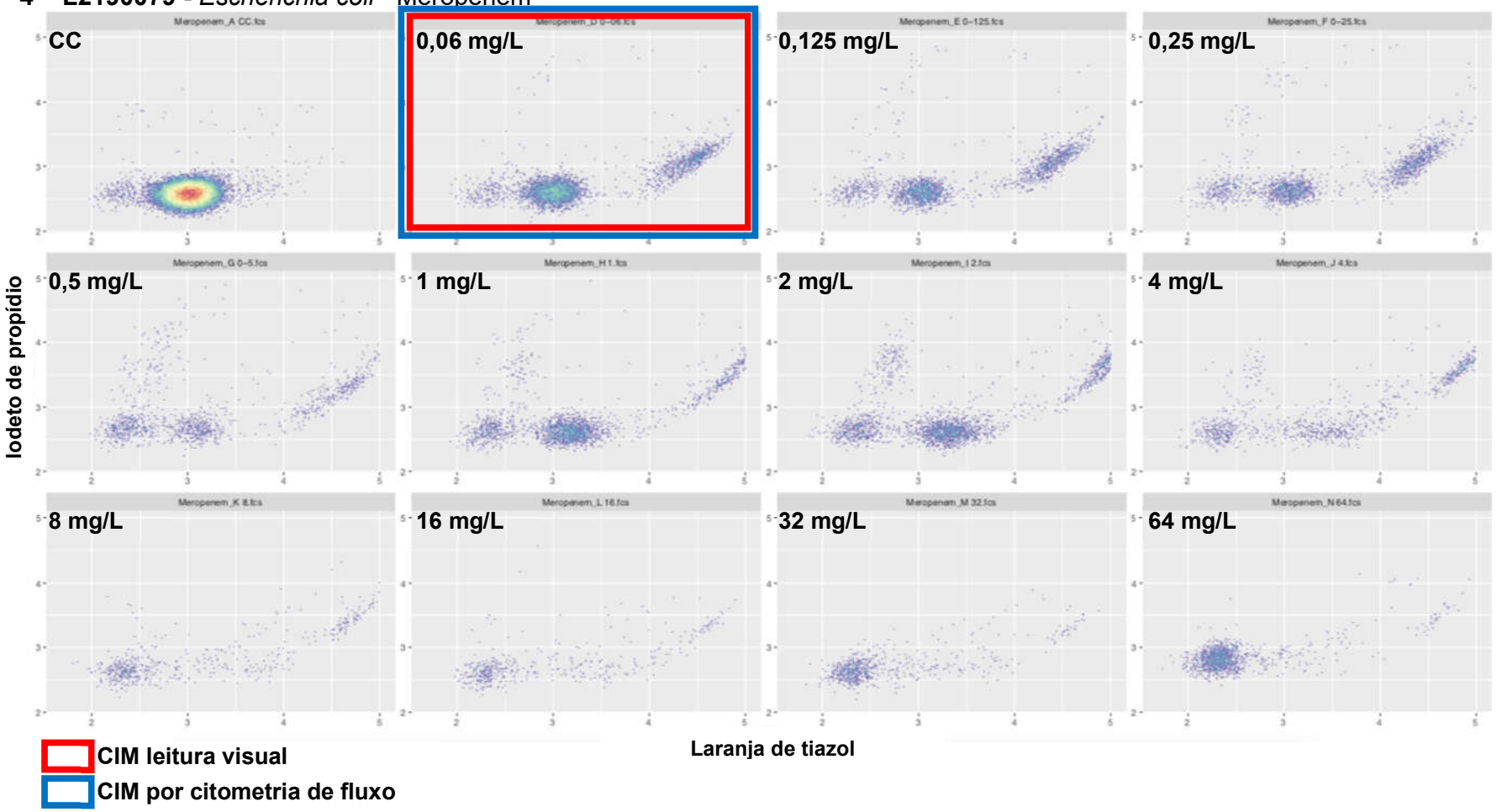
3 – L2193623 - *Escherichia coli* - Polimixina



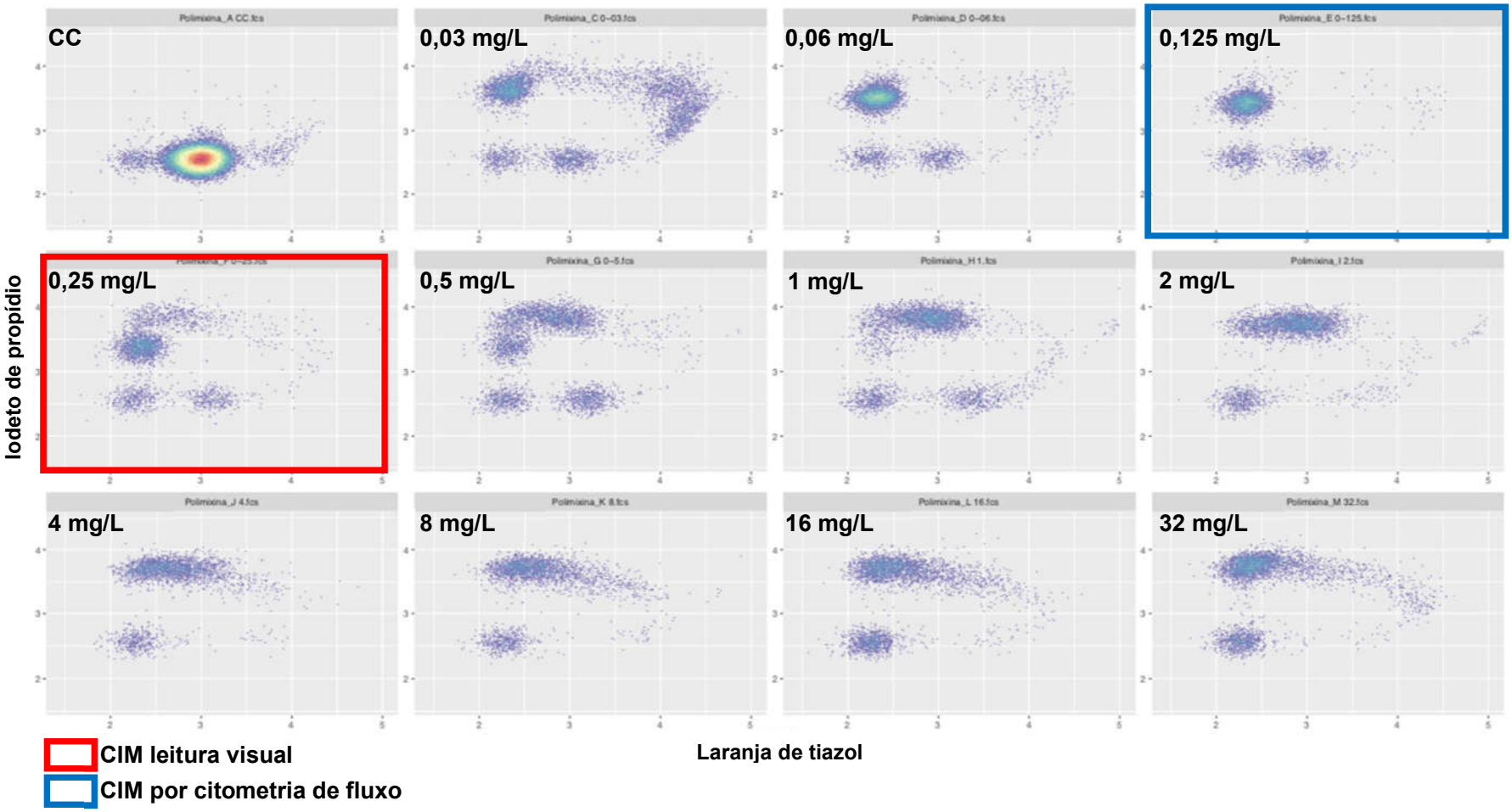
4 – L2190079 - *Escherichia coli* - Amicacina



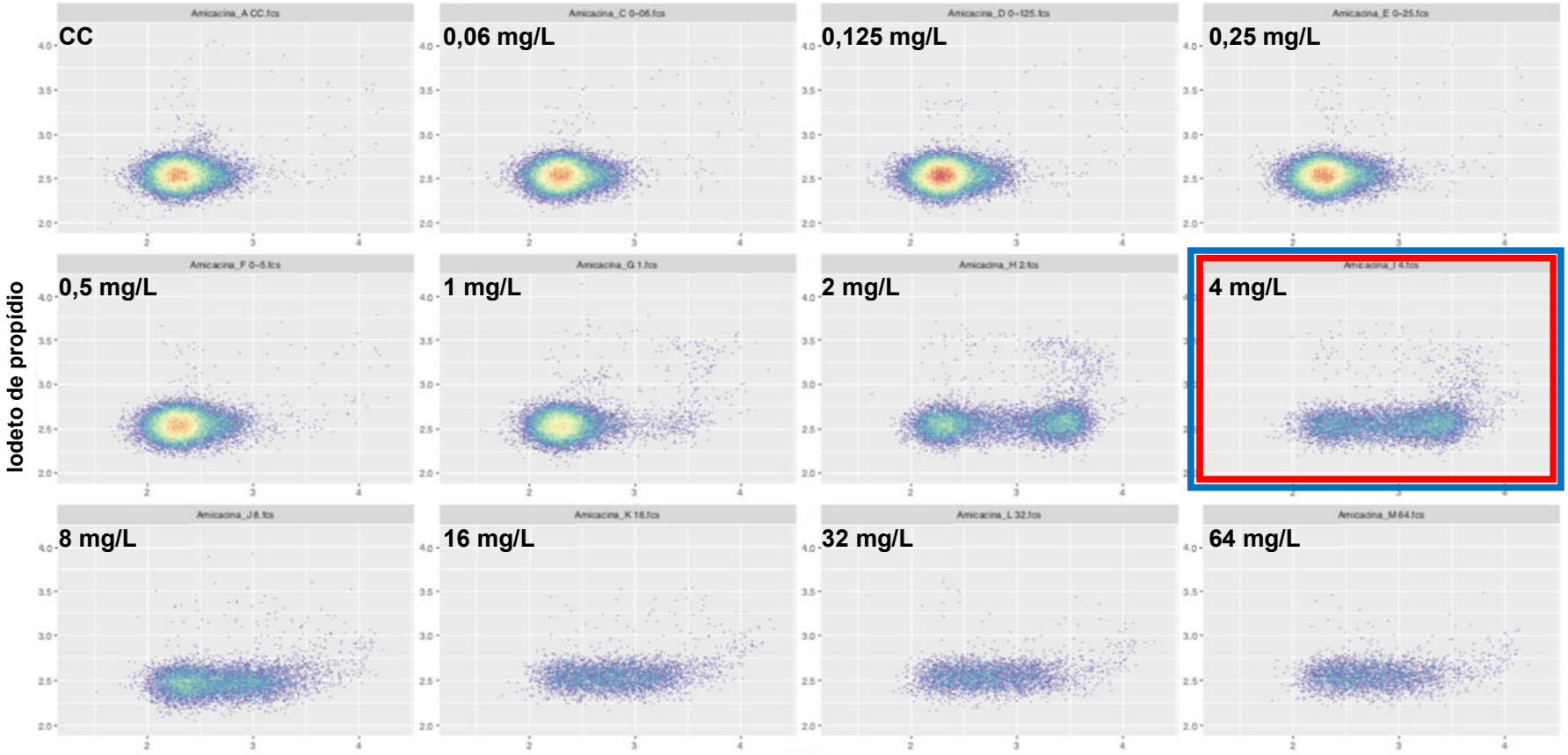
4 – L2190079 - *Escherichia coli* - Meropenem



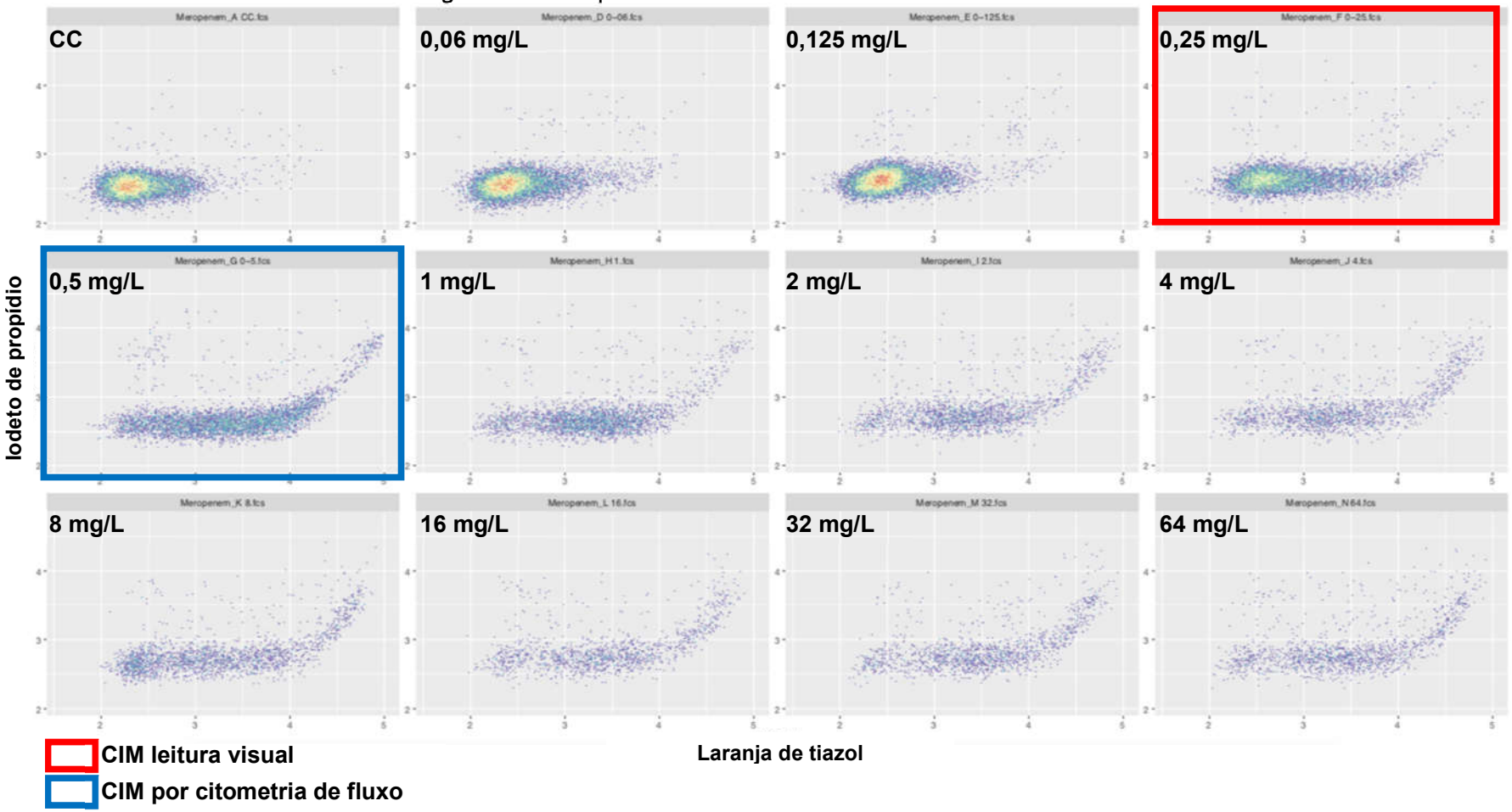
4 – L2190079 - *Escherichia coli* - Polimixina



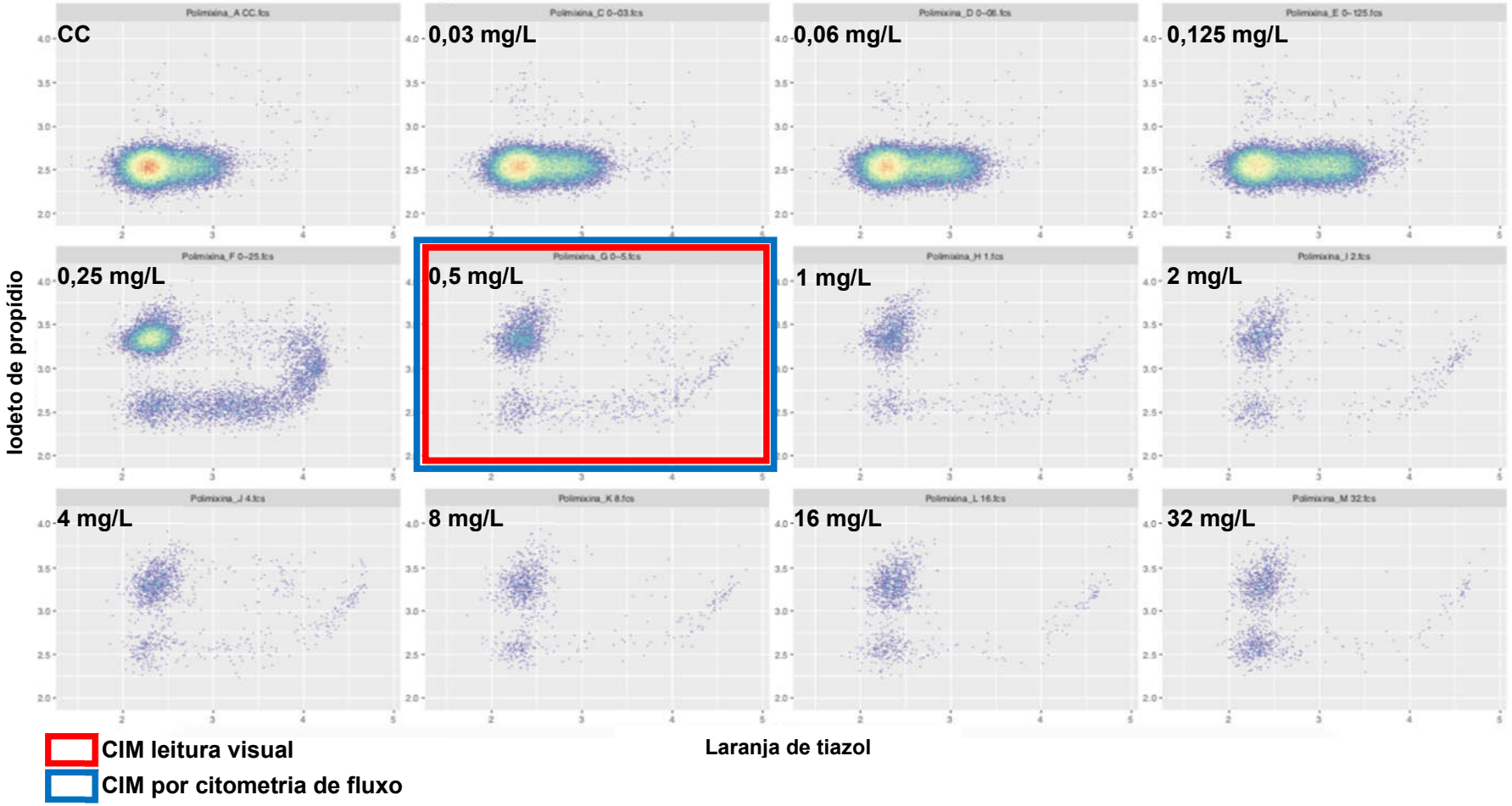
6 – BP0860386 - *Pseudomonas aeruginosa* - Amicacina



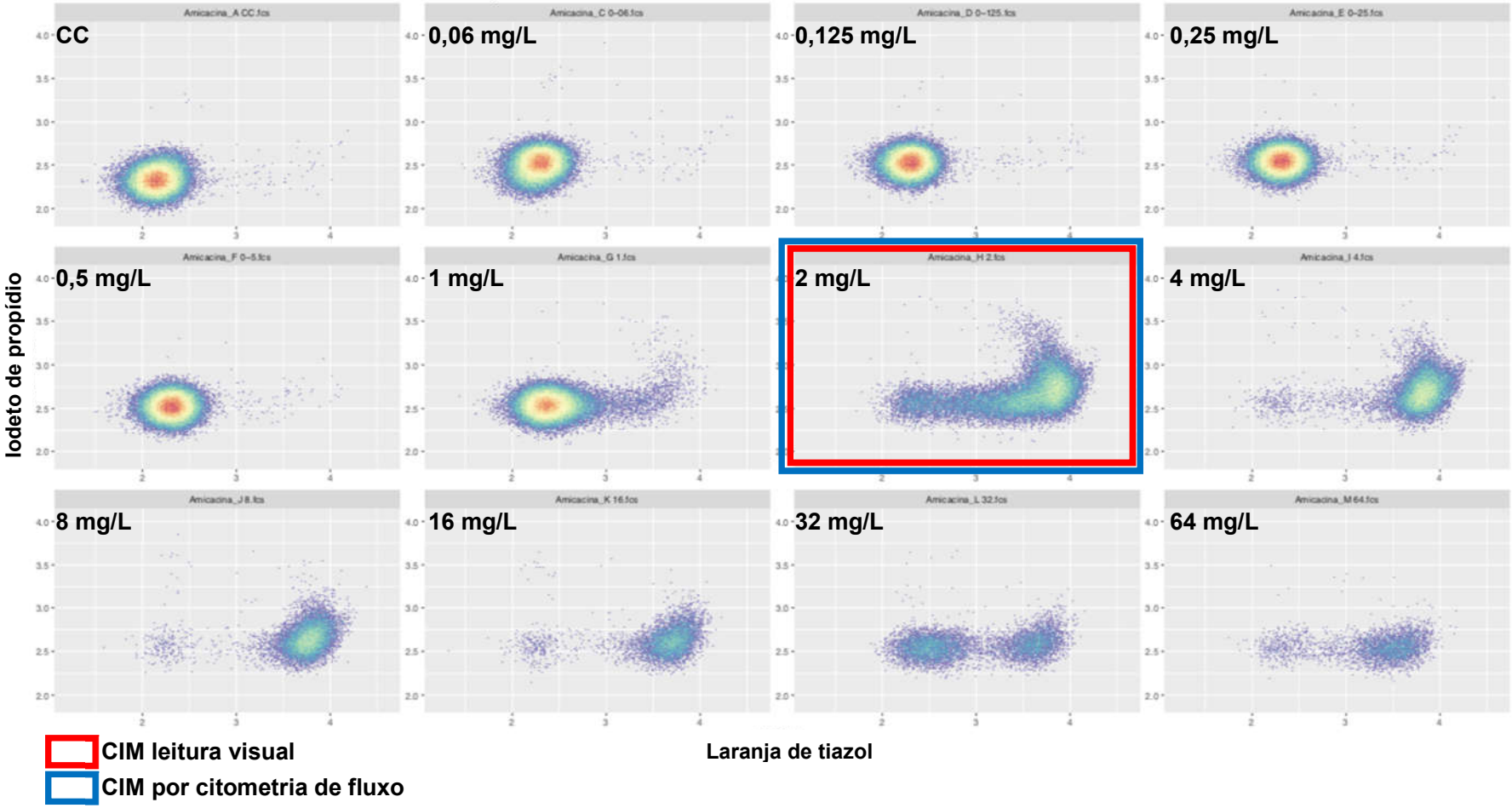
6 – BP0860386 - *Pseudomonas aeruginosa* - Meropenem



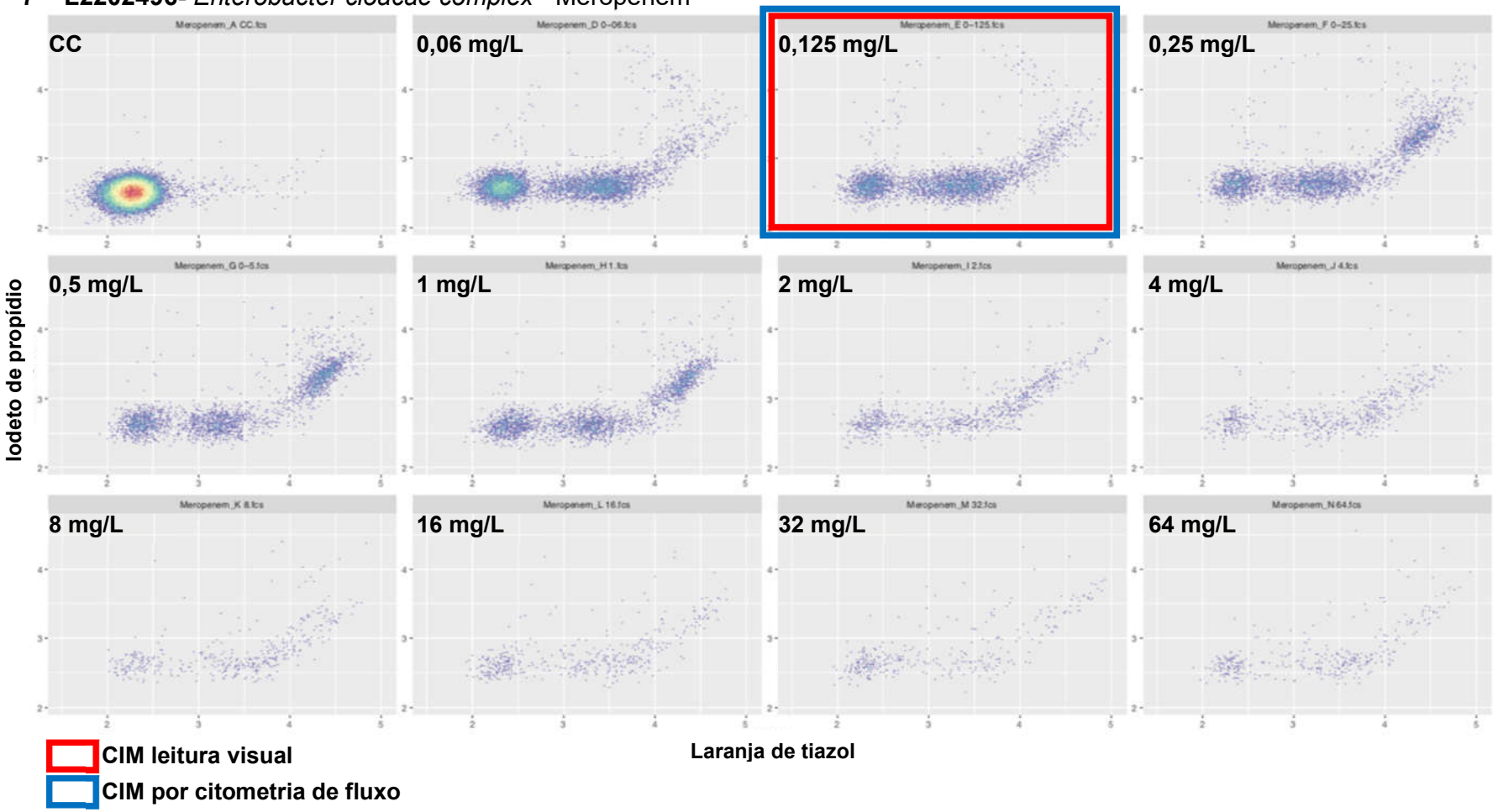
6 – BP0860386 - *Pseudomonas aeruginosa* - Polimixina



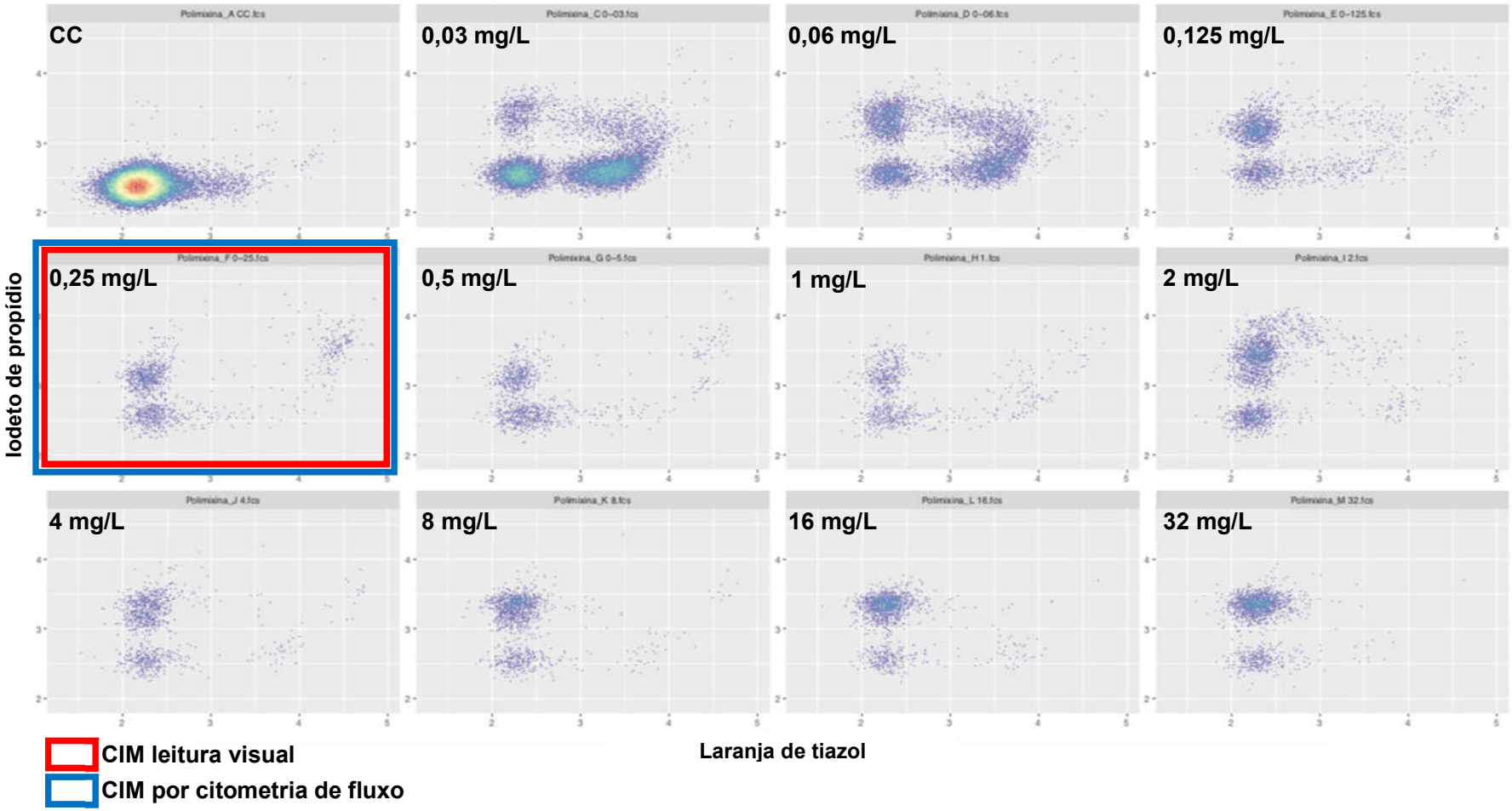
7 – L2202496- *Enterobacter cloacae complex* - Amicacina



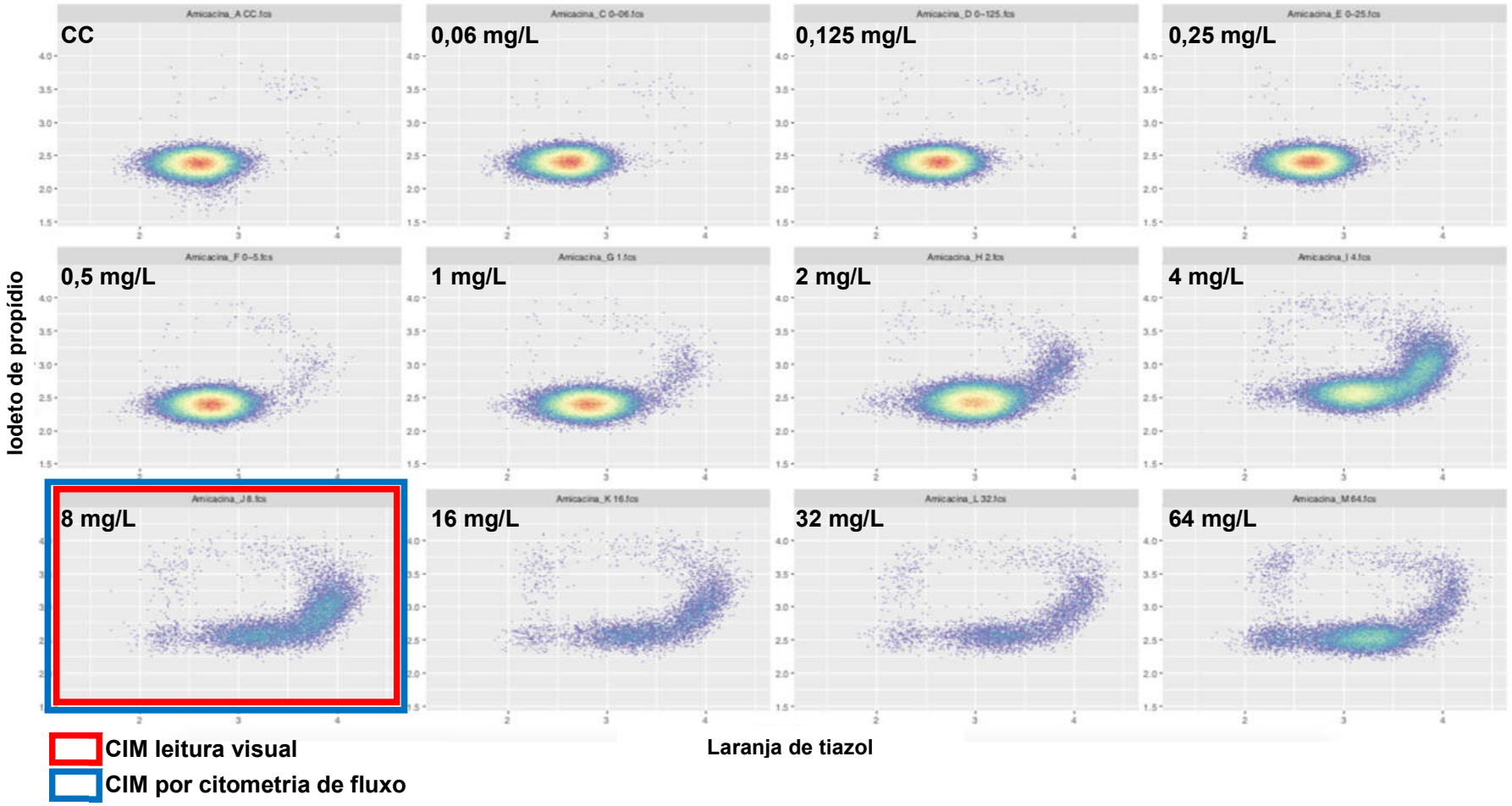
7 – L2202496- *Enterobacter cloacae complex* - Meropenem



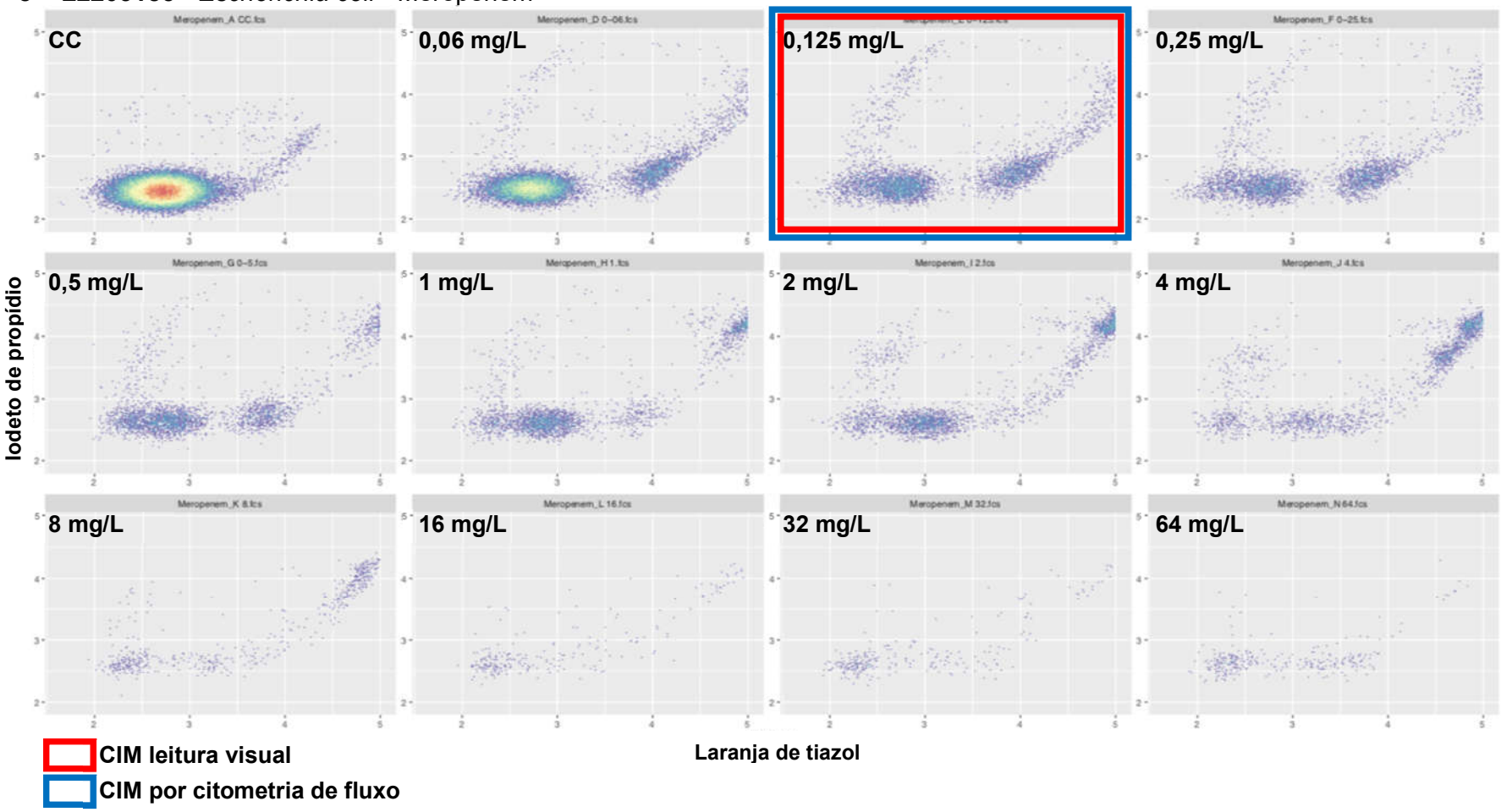
7 – L2202496- *Enterobacter cloacae complex* - Polimixina



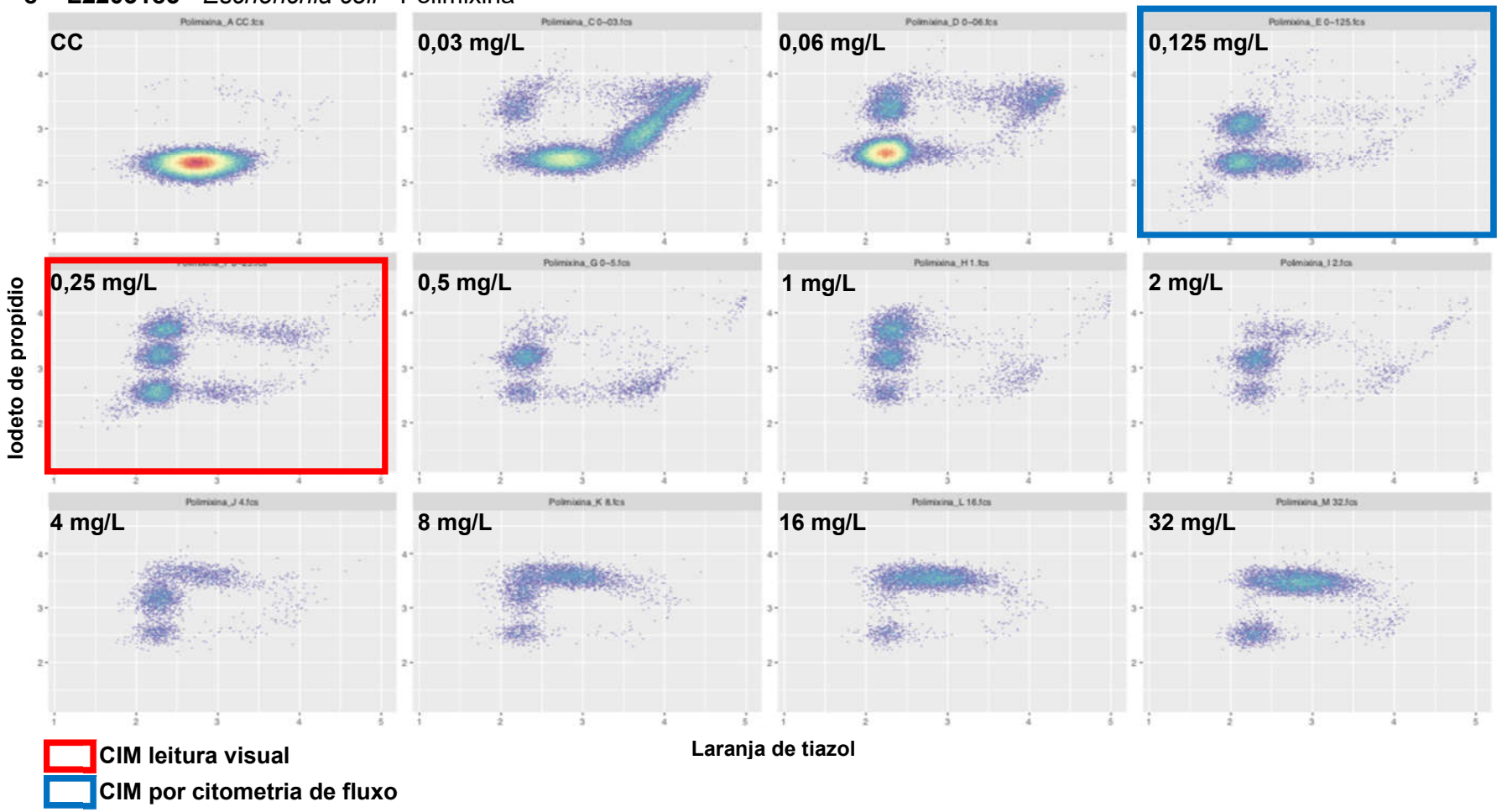
8 – L2203185 - *Escherichia coli* - Amicacina



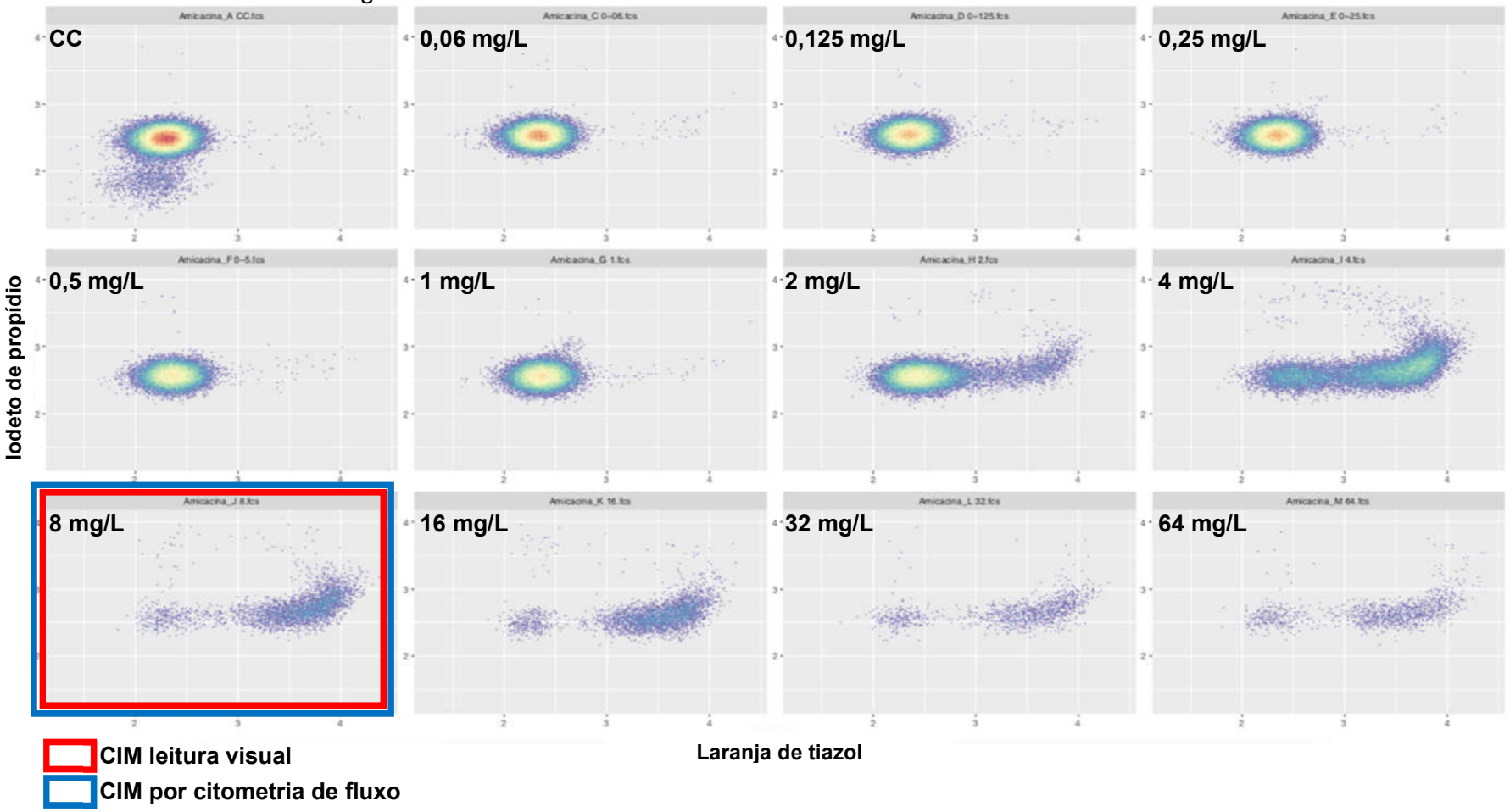
8 – L2203185 - *Escherichia coli* - Meropenem



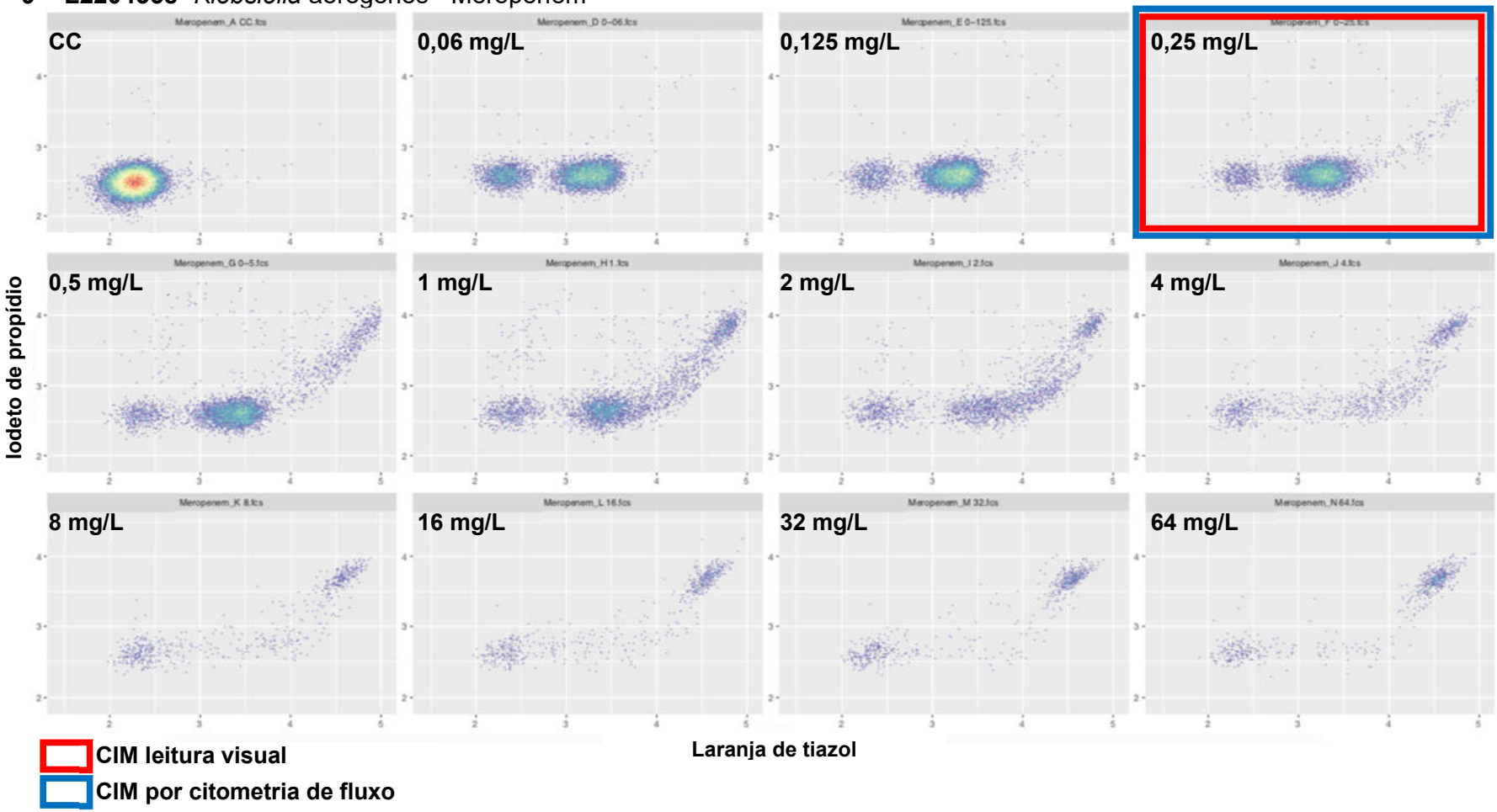
8 – L2203185 - *Escherichia coli* - Polimixina



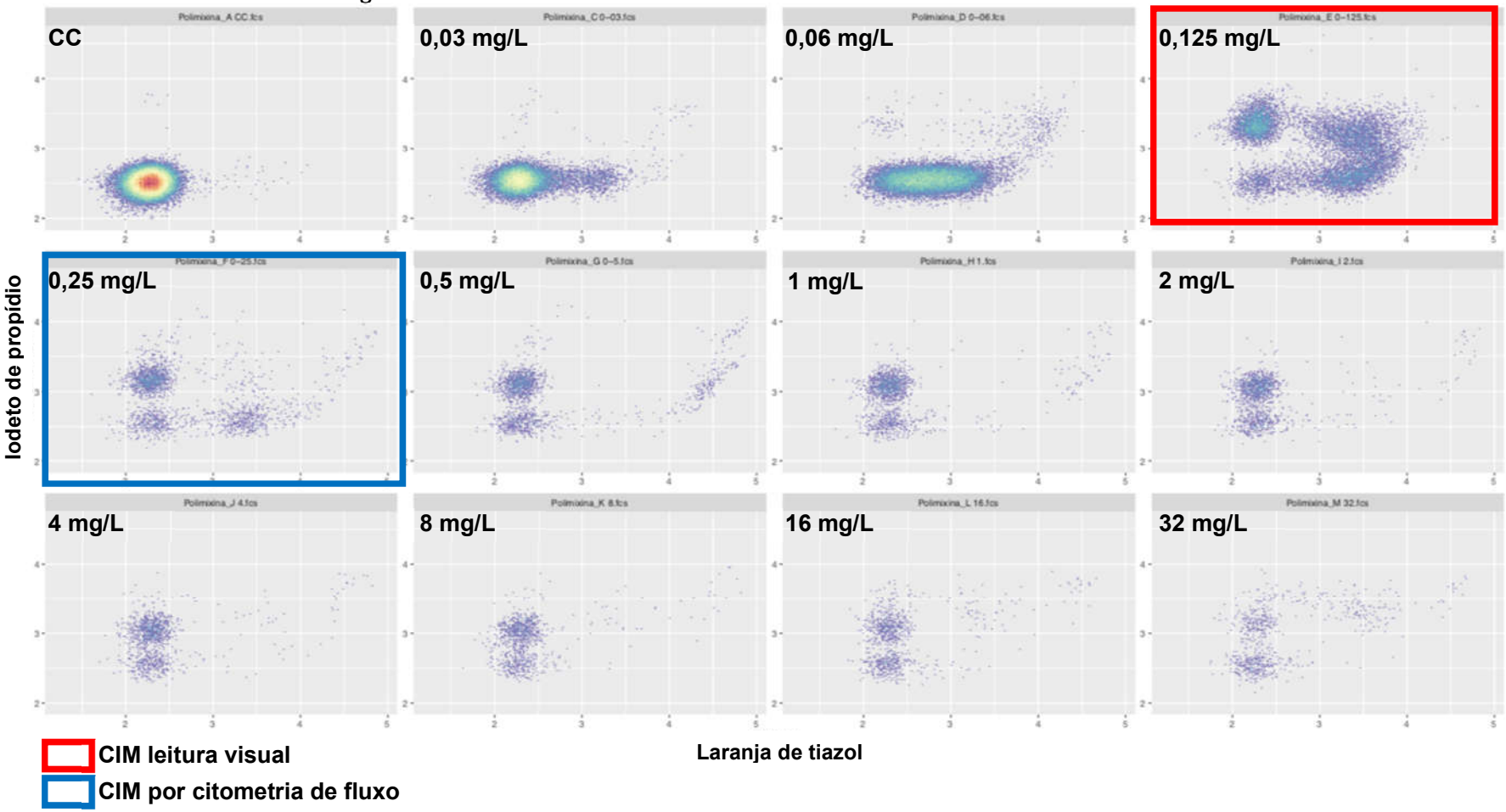
9 – L2204558- *Klebsiella* aerogenes - Amicacina



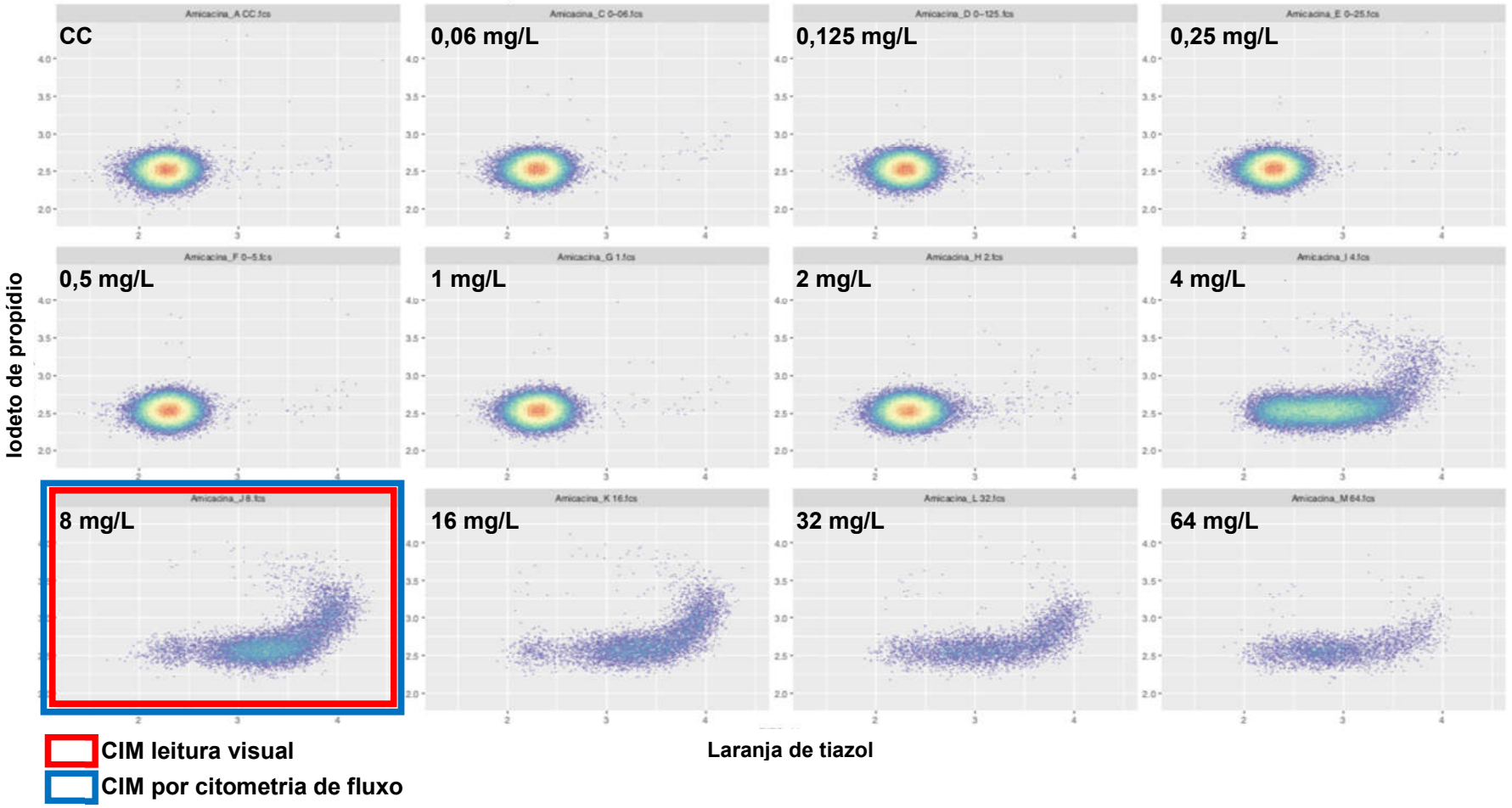
9 – L2204558- *Klebsiella* aerogenes - Meropenem



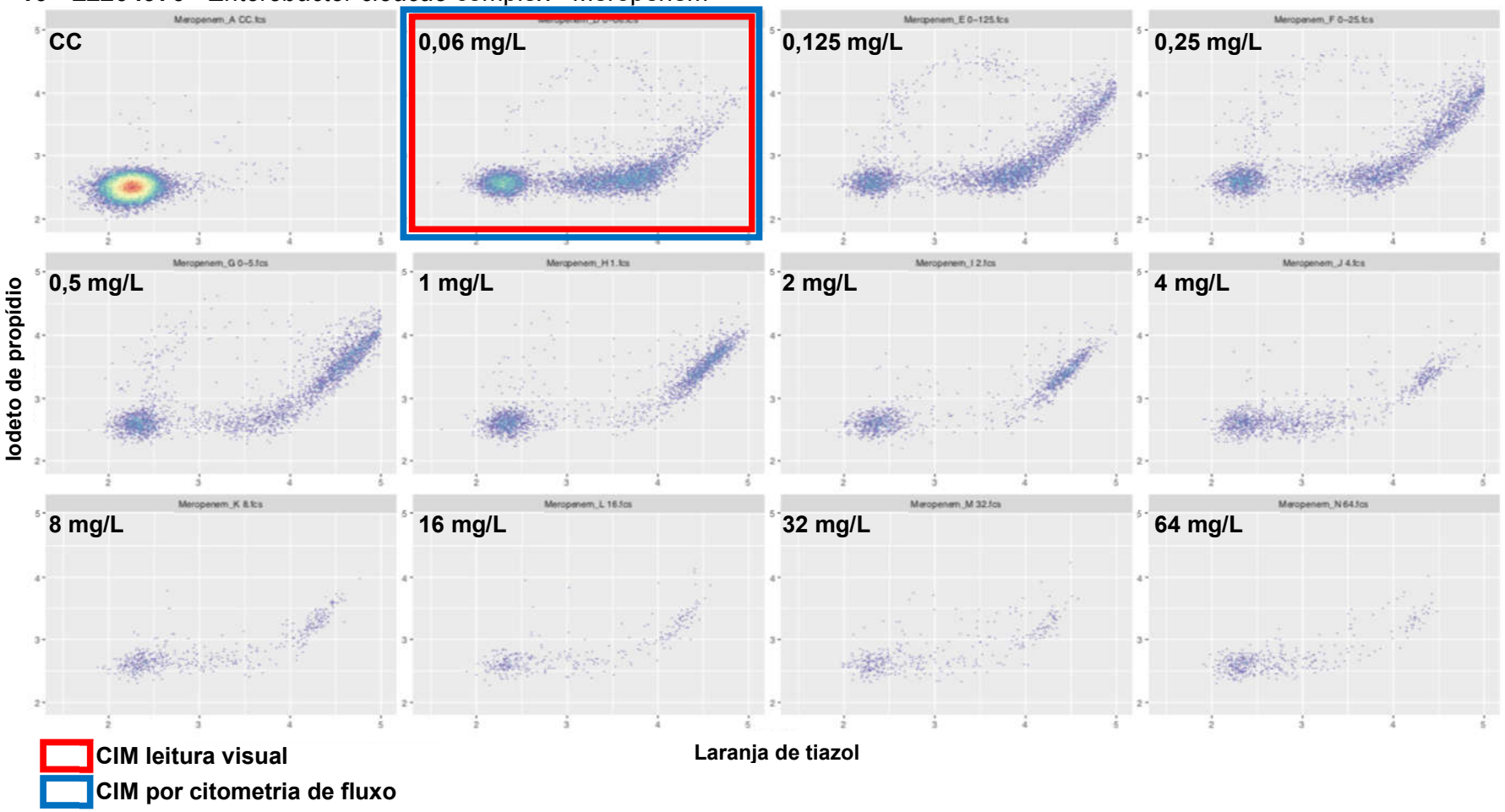
9 – L2204558- *Klebsiella* aerogenes - Polimixina



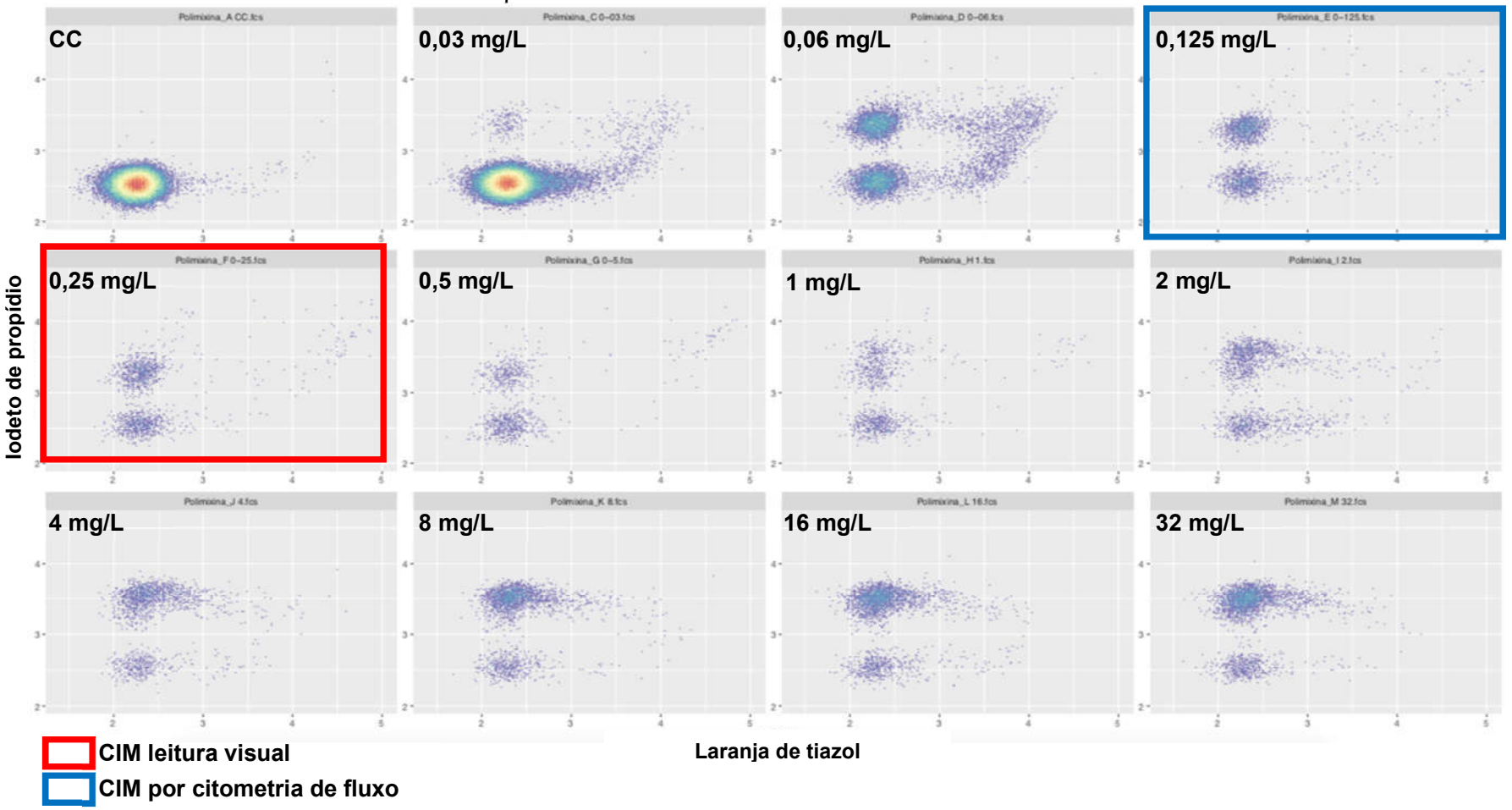
10 - L2204970 - *Enterobacter cloacae* complex - Amicacina



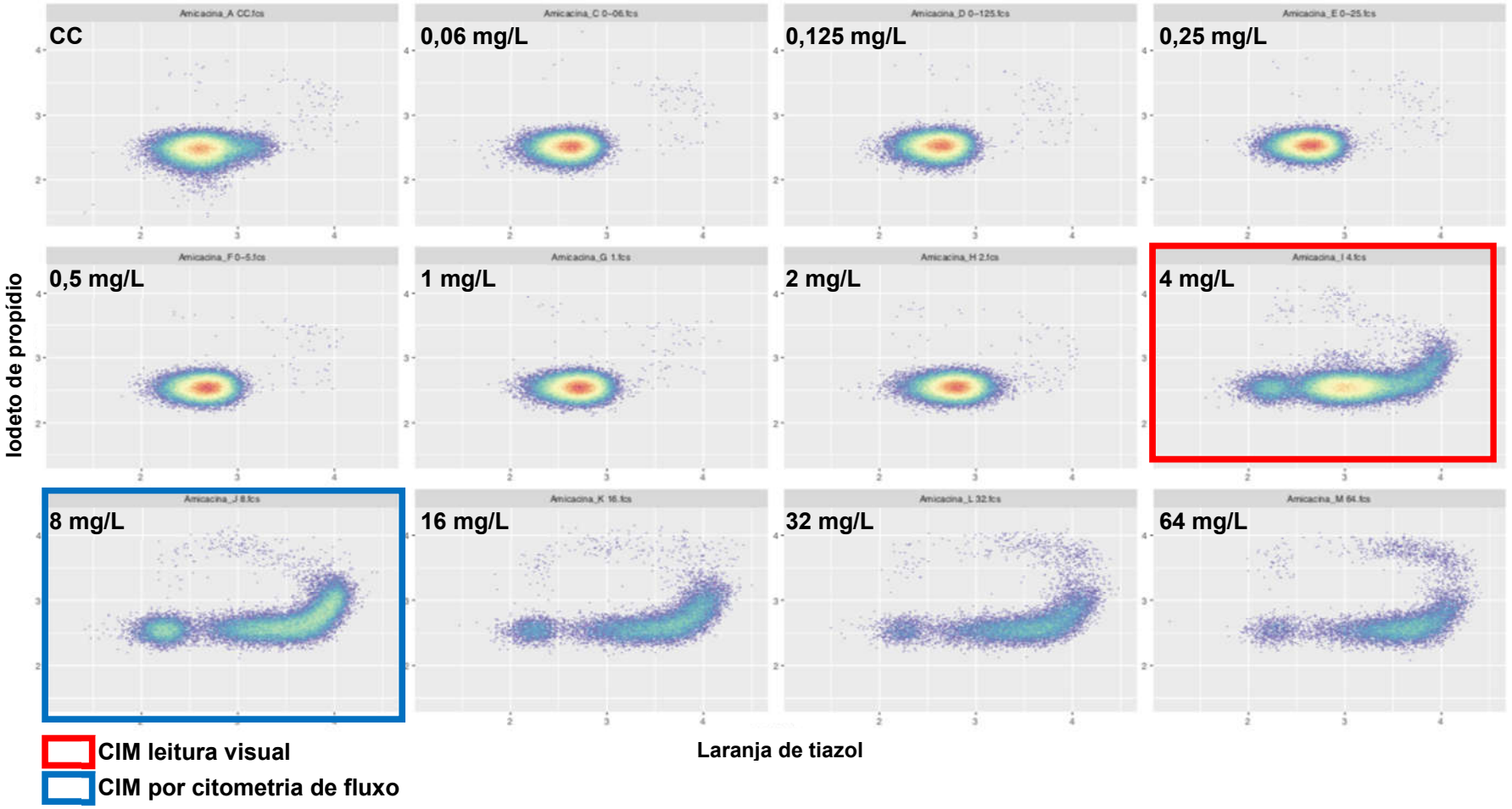
10 - L2204970 - *Enterobacter cloacae* complex - Meropenem



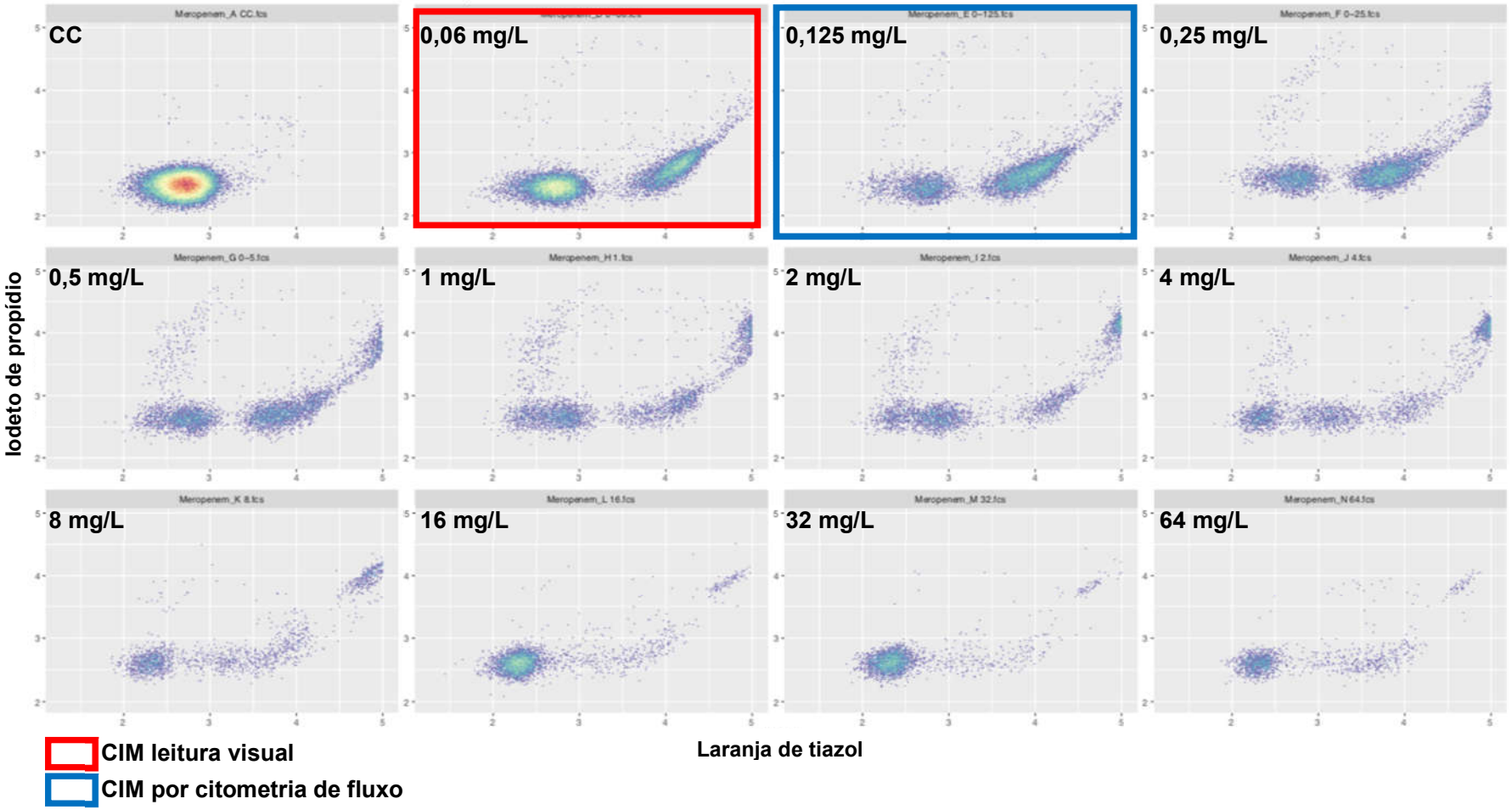
10 - L2204970 - *Enterobacter cloacae* complex - Polimixina



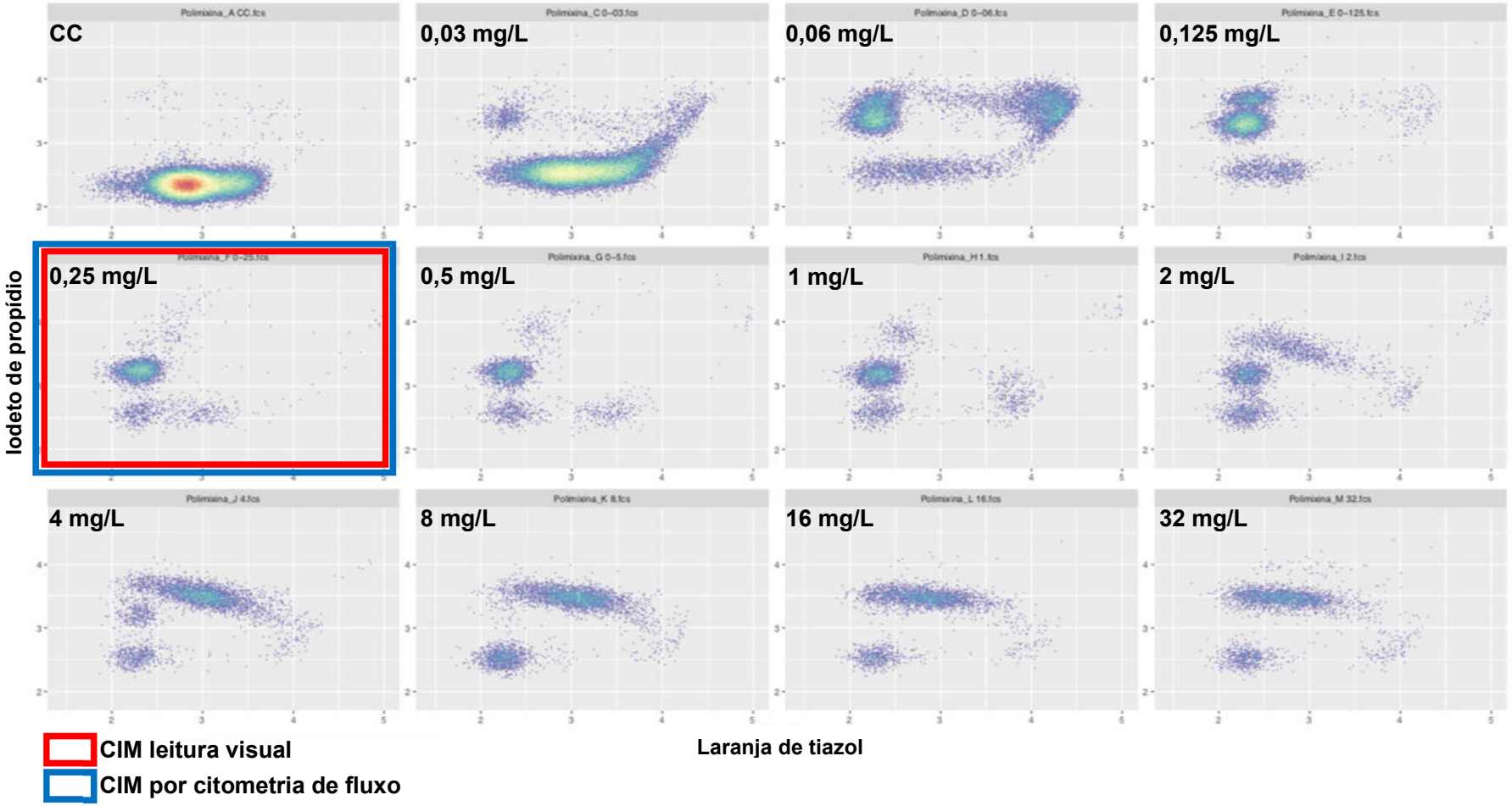
11 - L2203966 - *Escherichia* coli - Amicacina



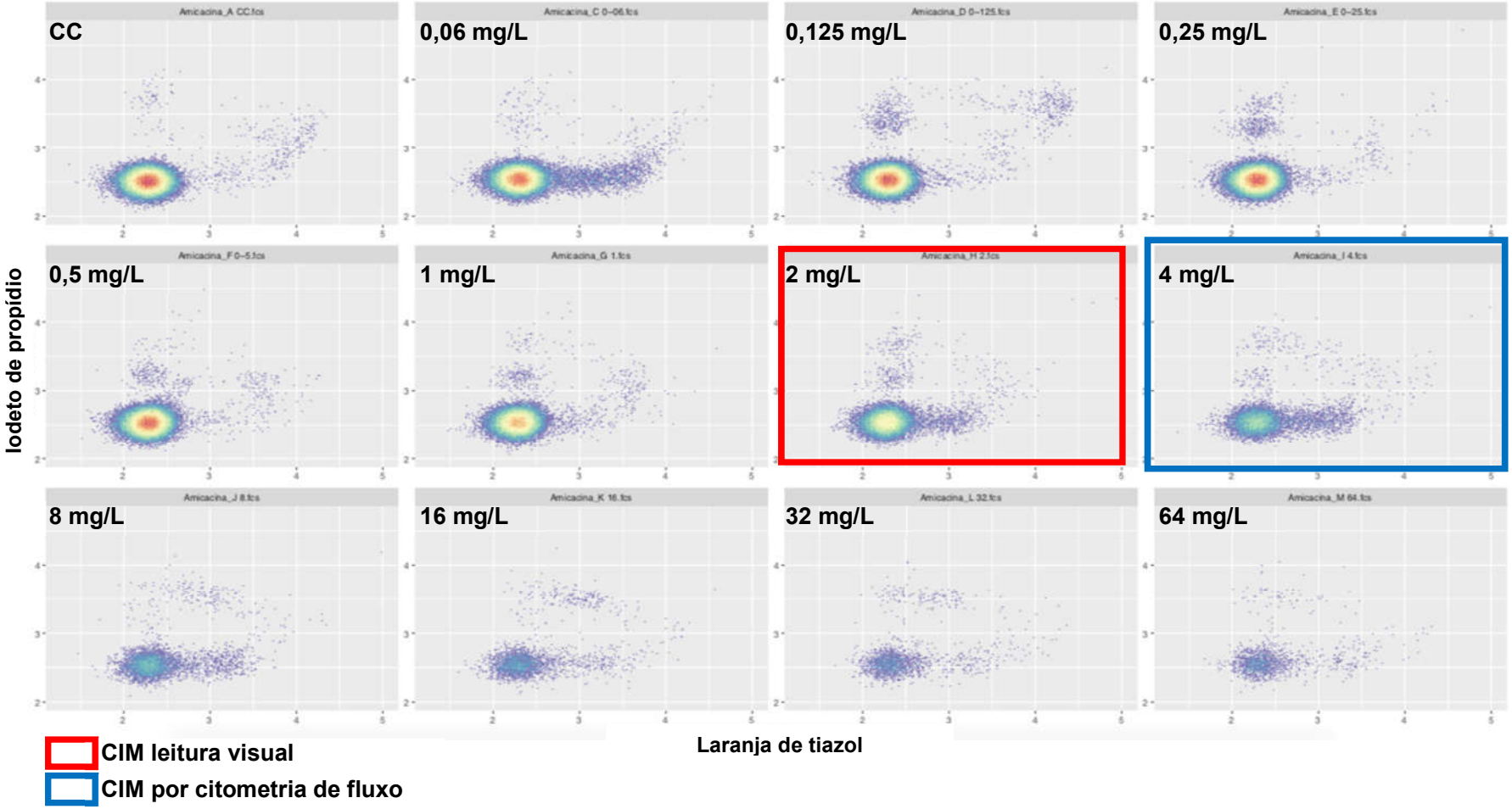
11 - L2203966 - *Escherichia* coli - Meropenem



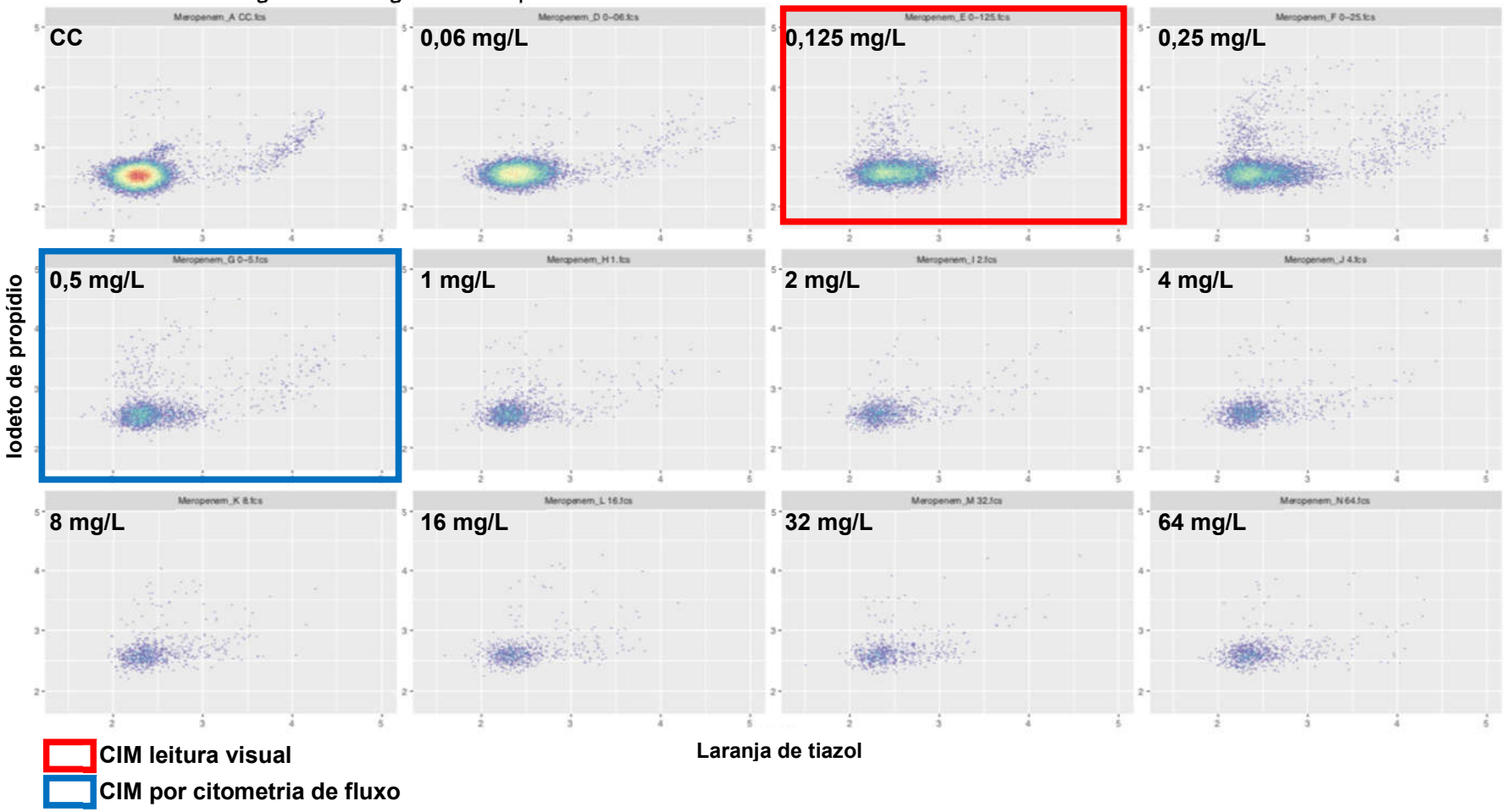
11 - L2203966 - *Escherichia* coli - Polimixina



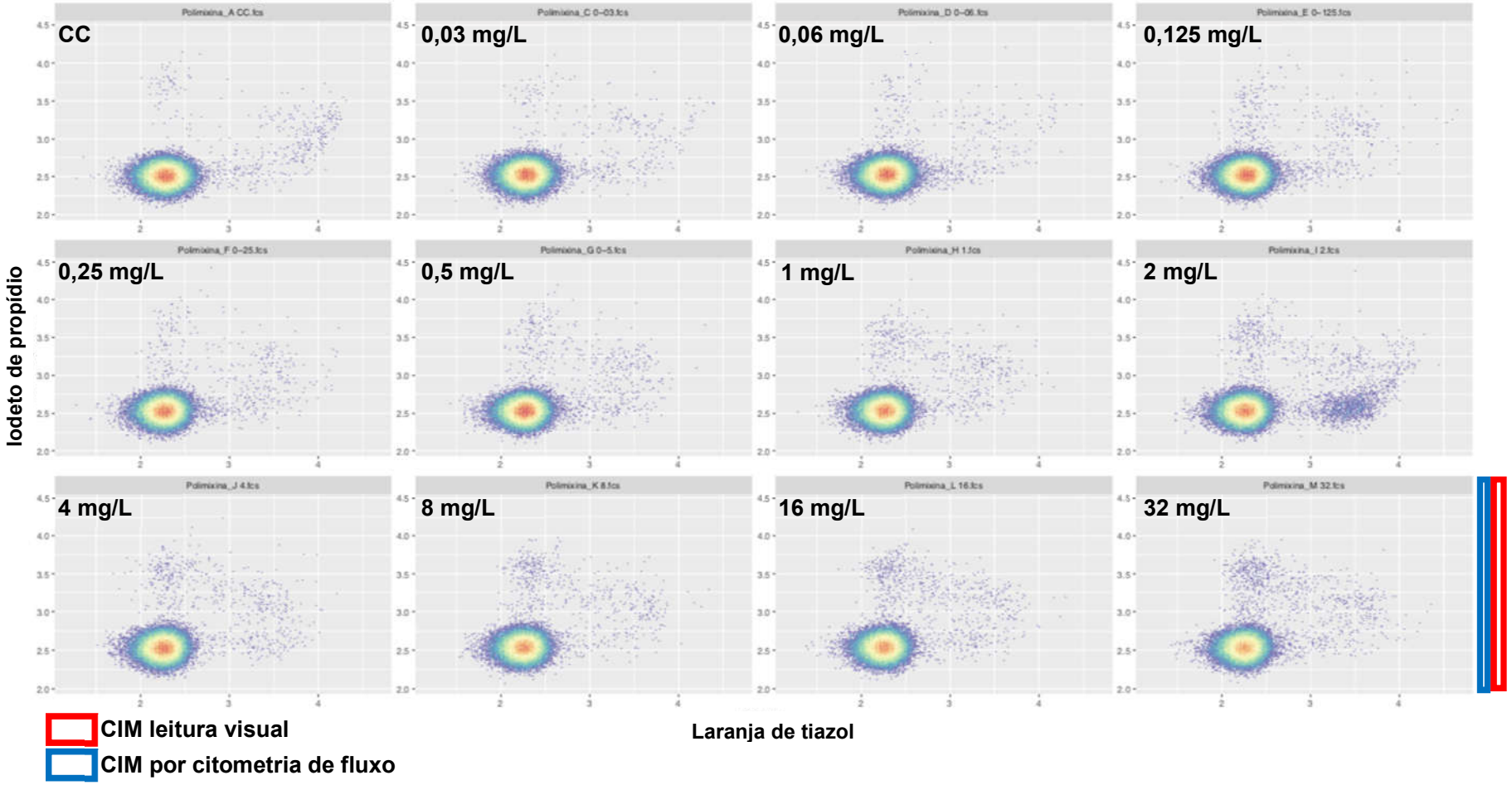
12 – L2211345 - *Morganella morgani* - Amicacina



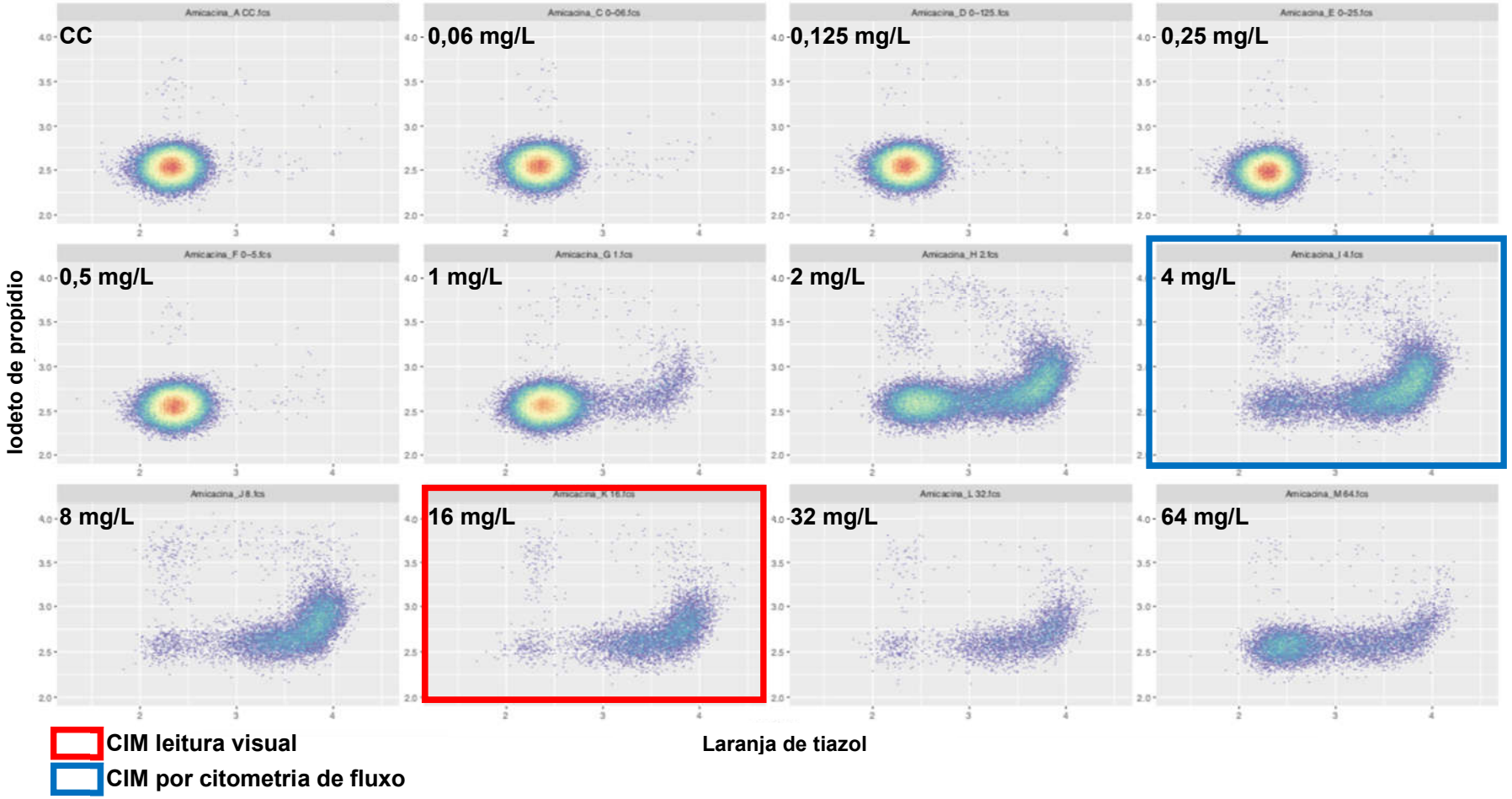
12 – L2211345 - *Morganella morgani* - Meropenem



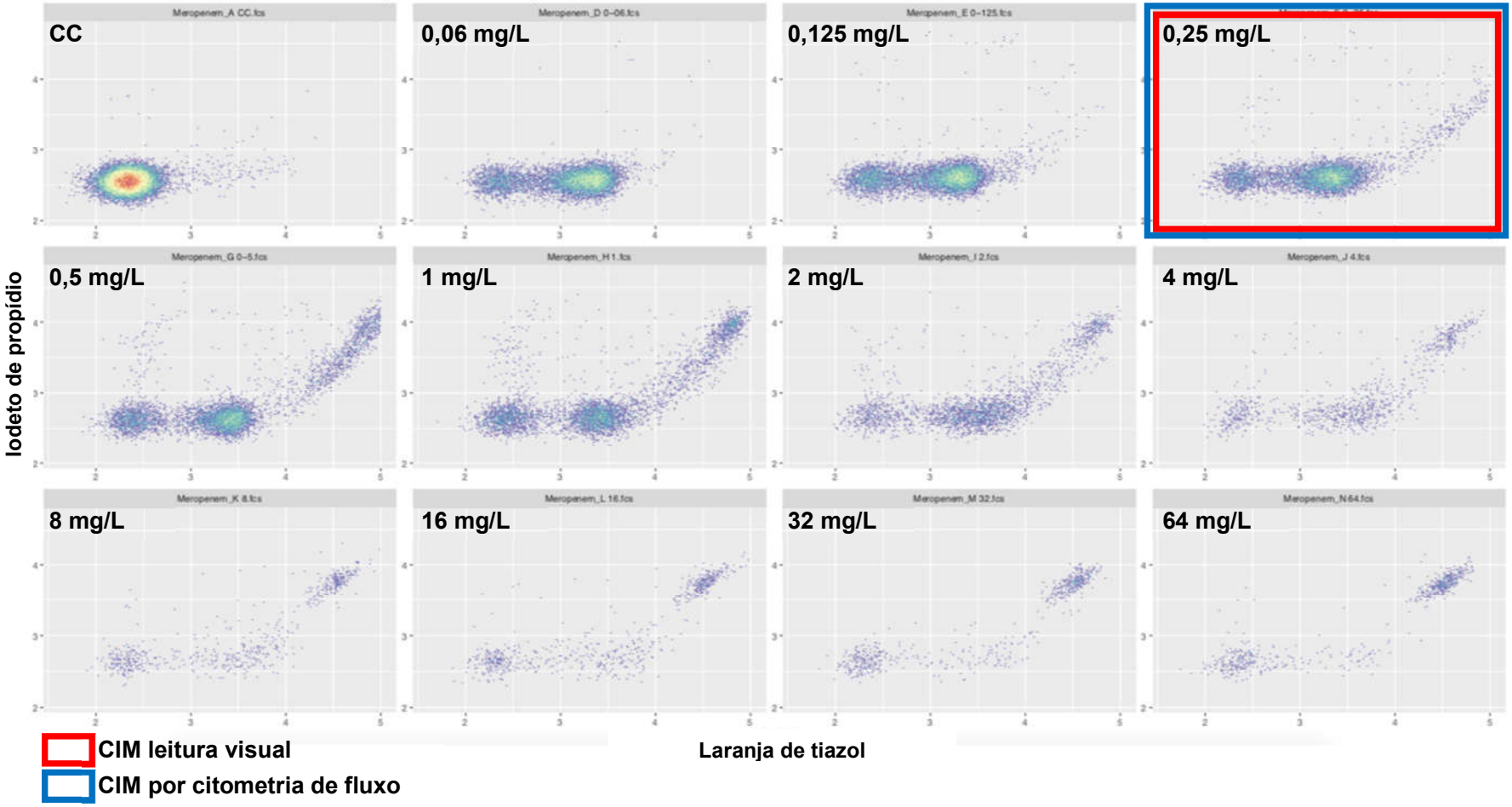
12 – L2211345 - *Morganella morgani* - Polimixina



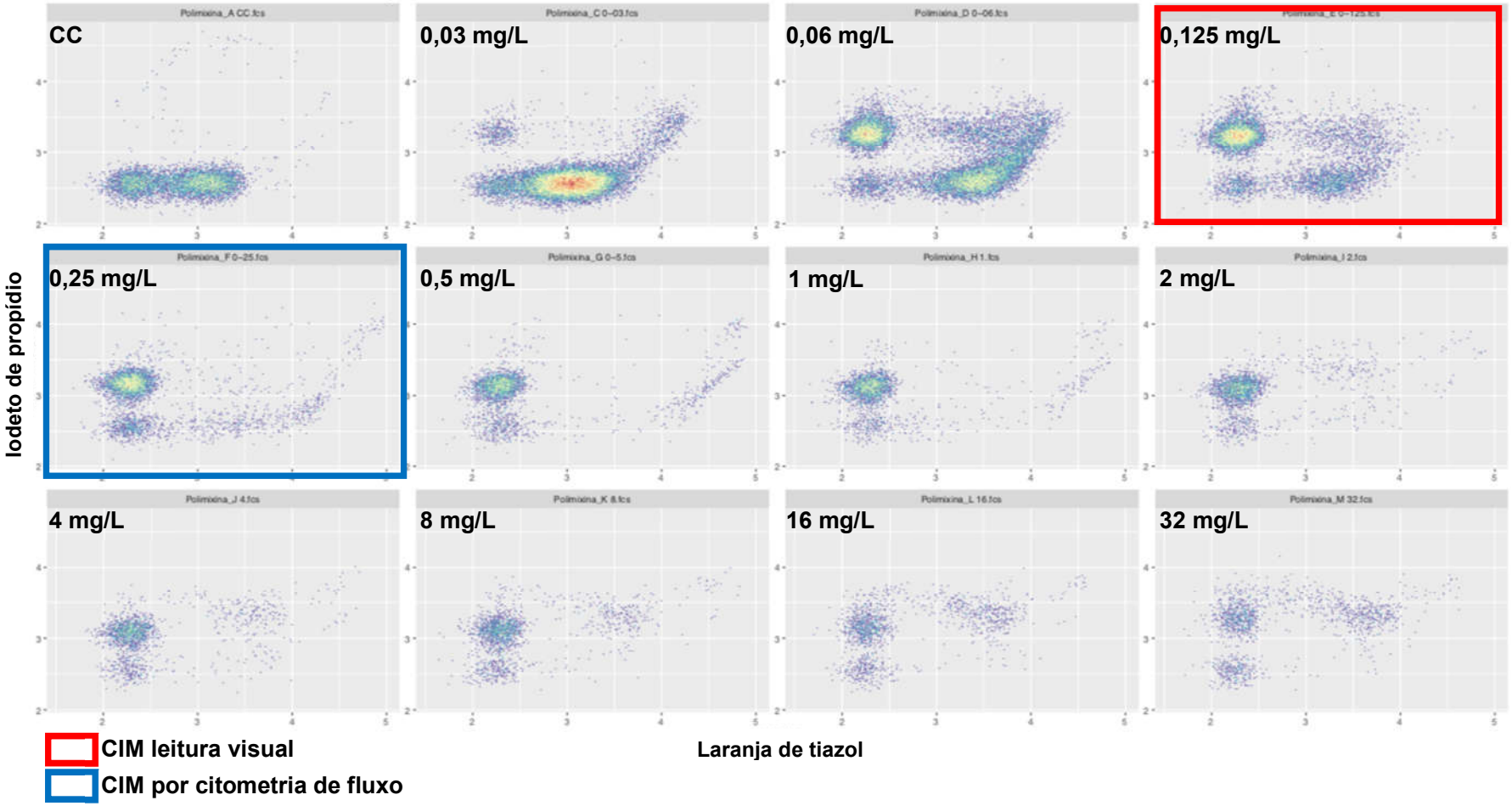
13 – L2204558 - *Klebsiella aerogenes* - Amicacina



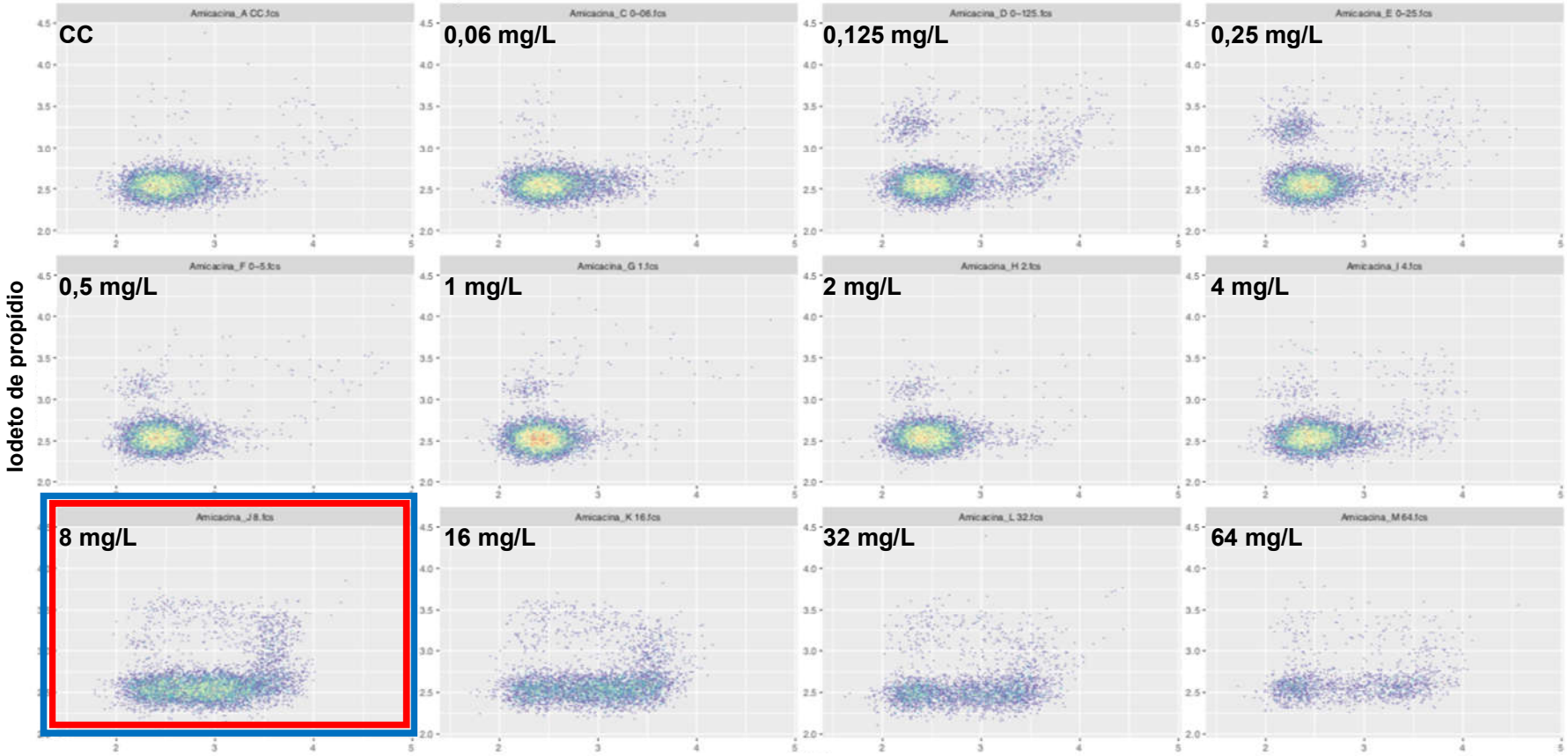
13 – L2204558 - *Klebsiella aerogenes* - Meropenem



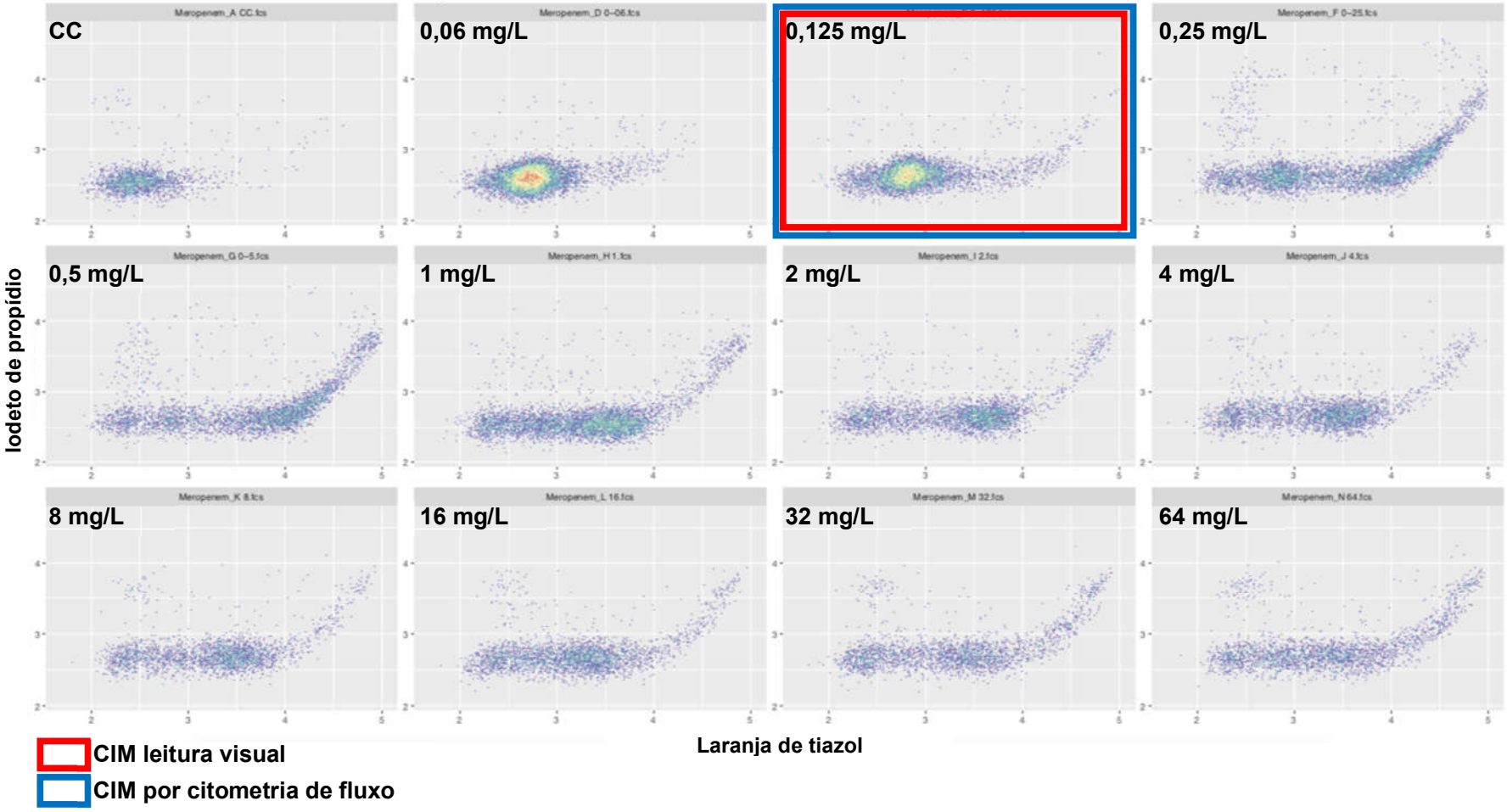
13 – L2204558 - *Klebsiella aerogenes* - Polimixina



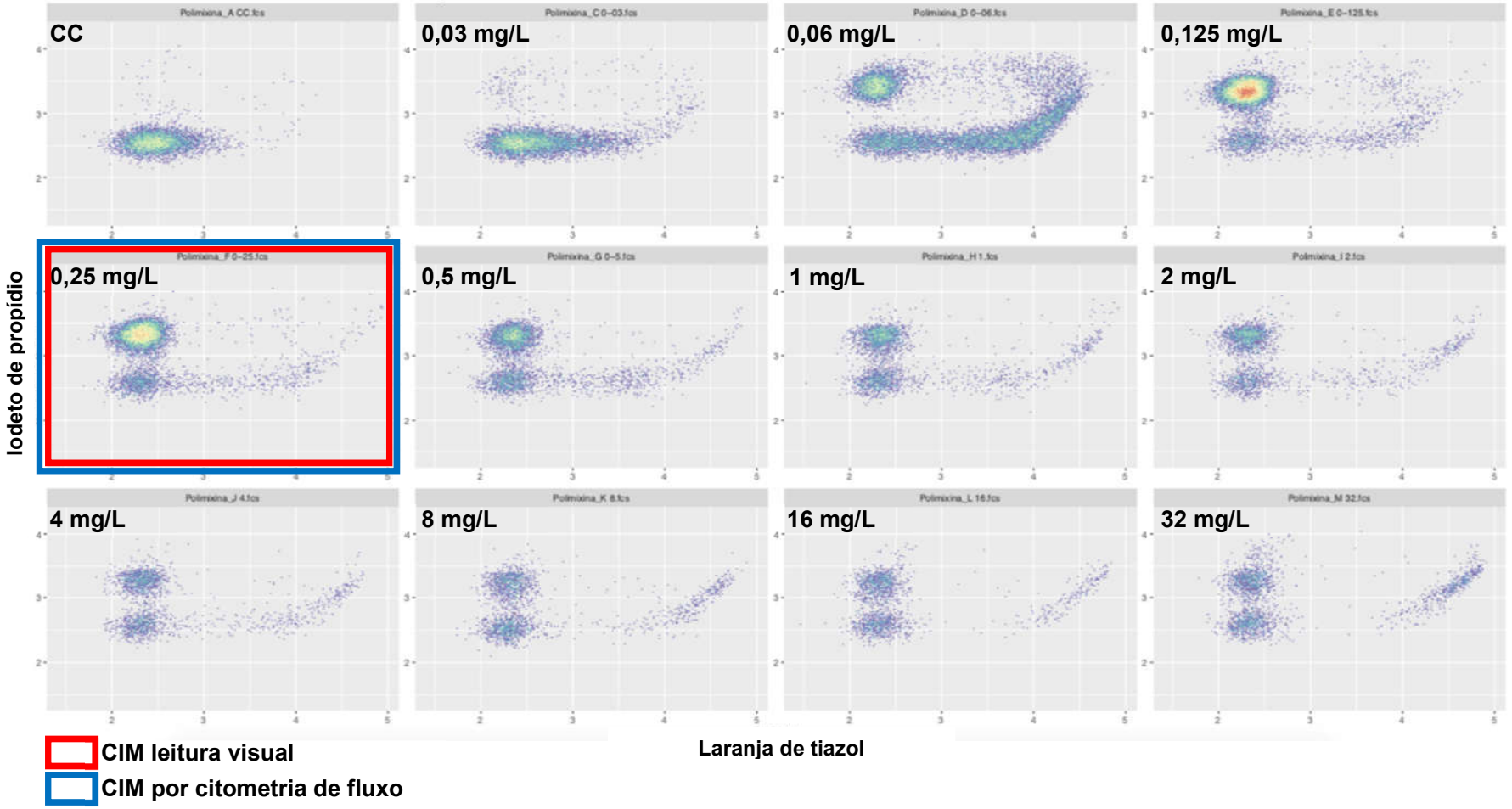
14 – L2210228 - *Pseudomonas* aeruginosa - Amicacina



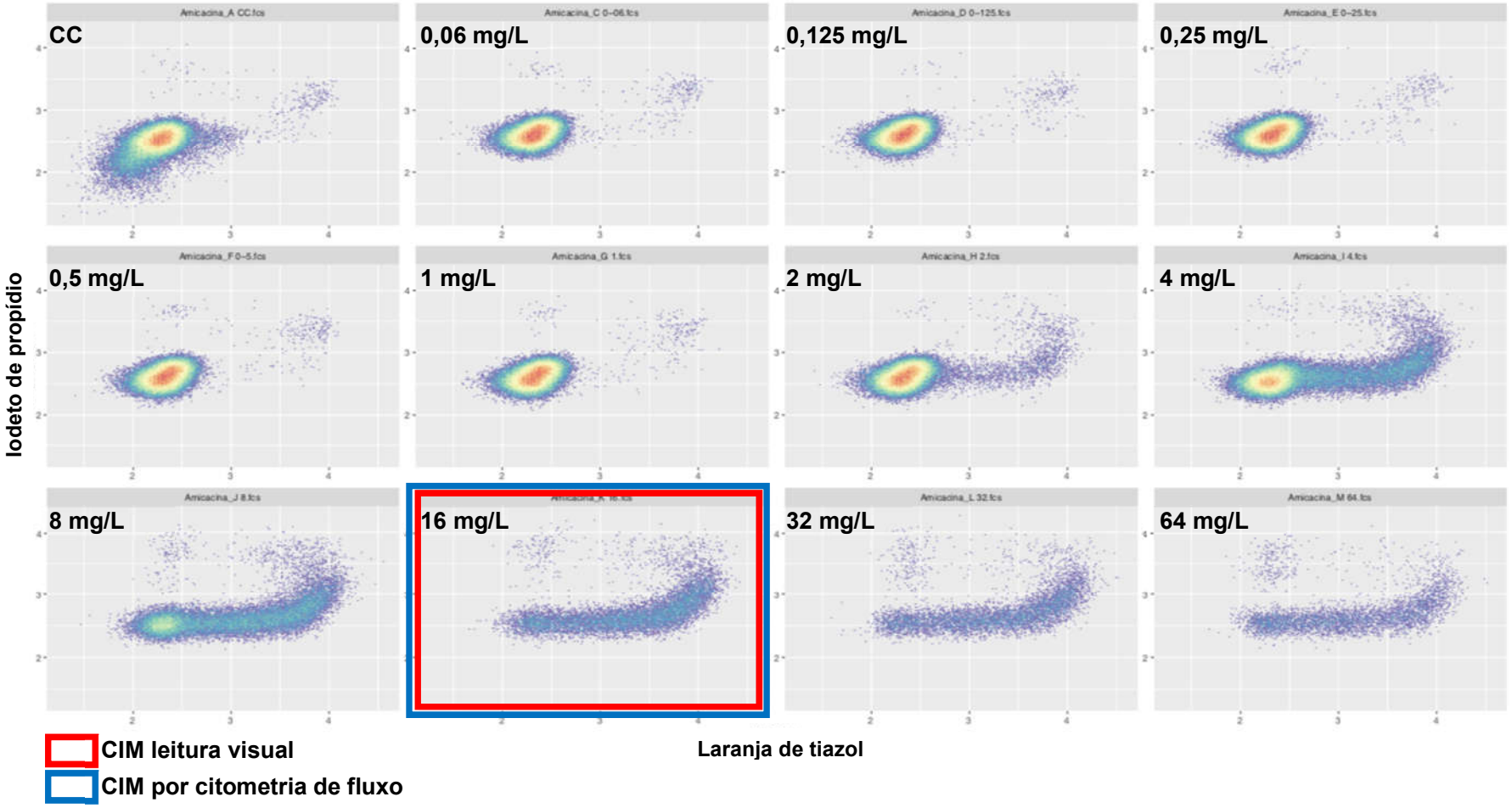
14 – L2210228 - *Pseudomonas* aeruginosa - Meropenem



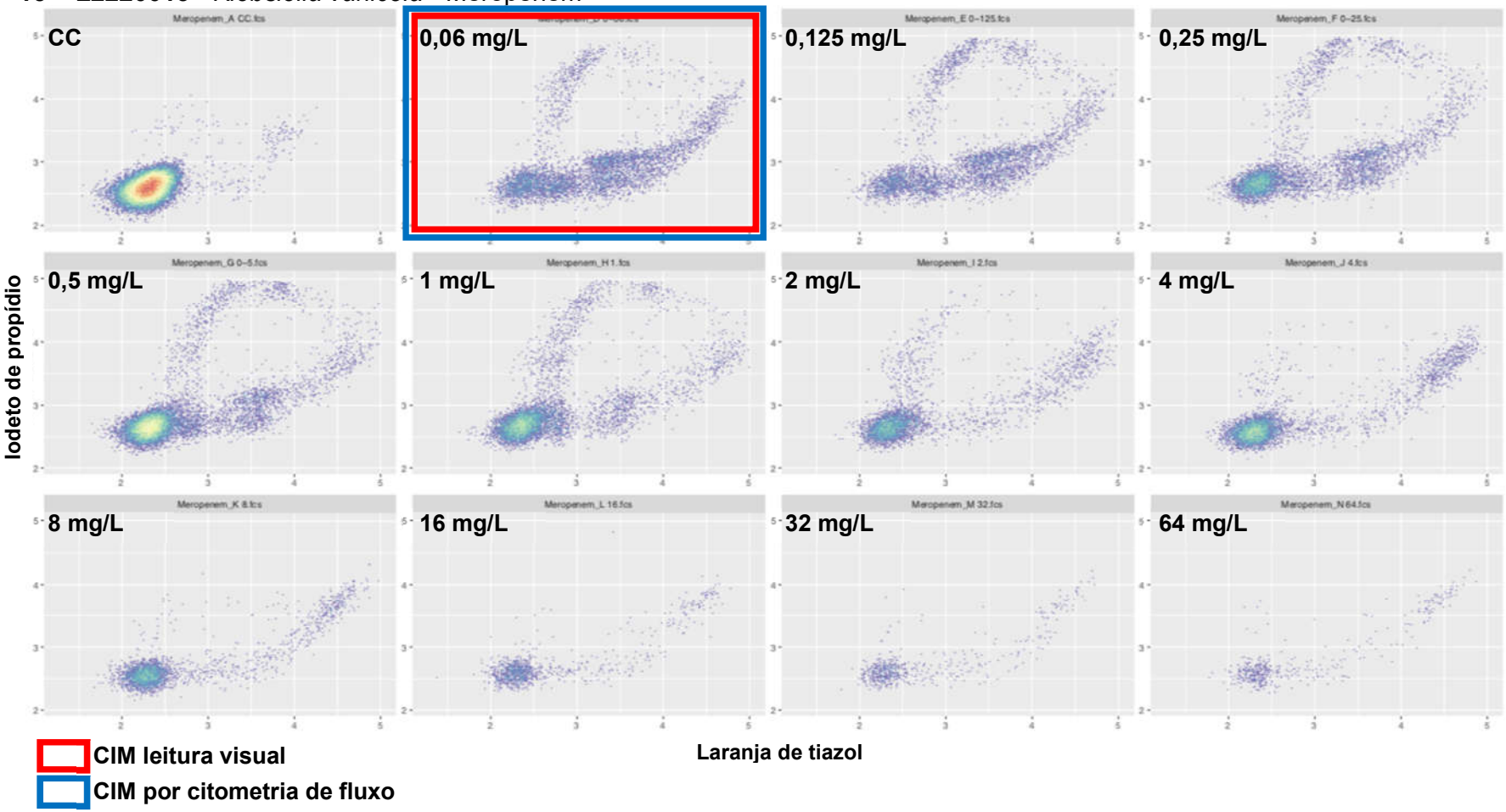
14 – L2210228 - *Pseudomonas* aeruginosa - Polimixina



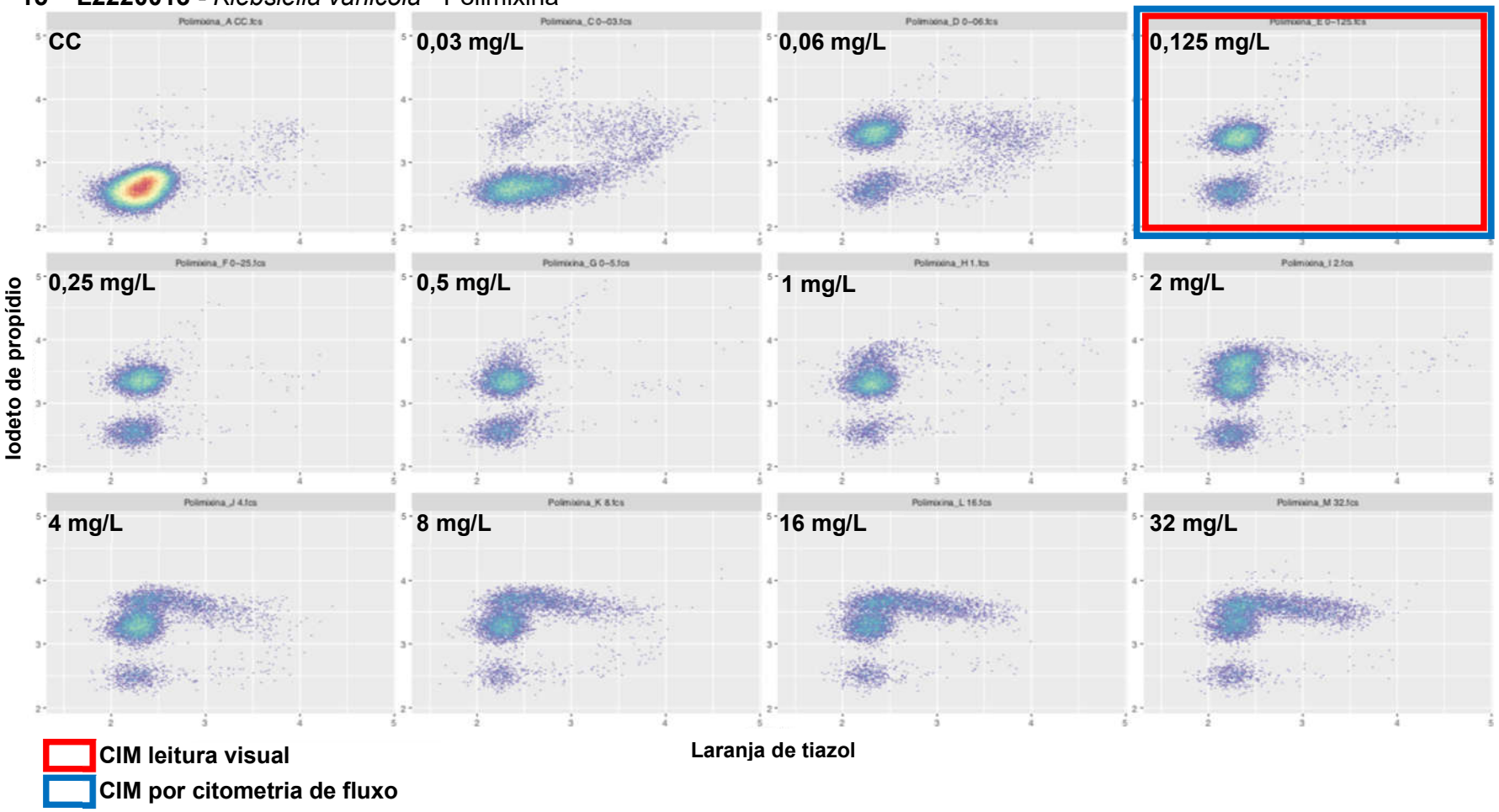
15 – L2220013 - *Klebsiella variicola* - Amicacina



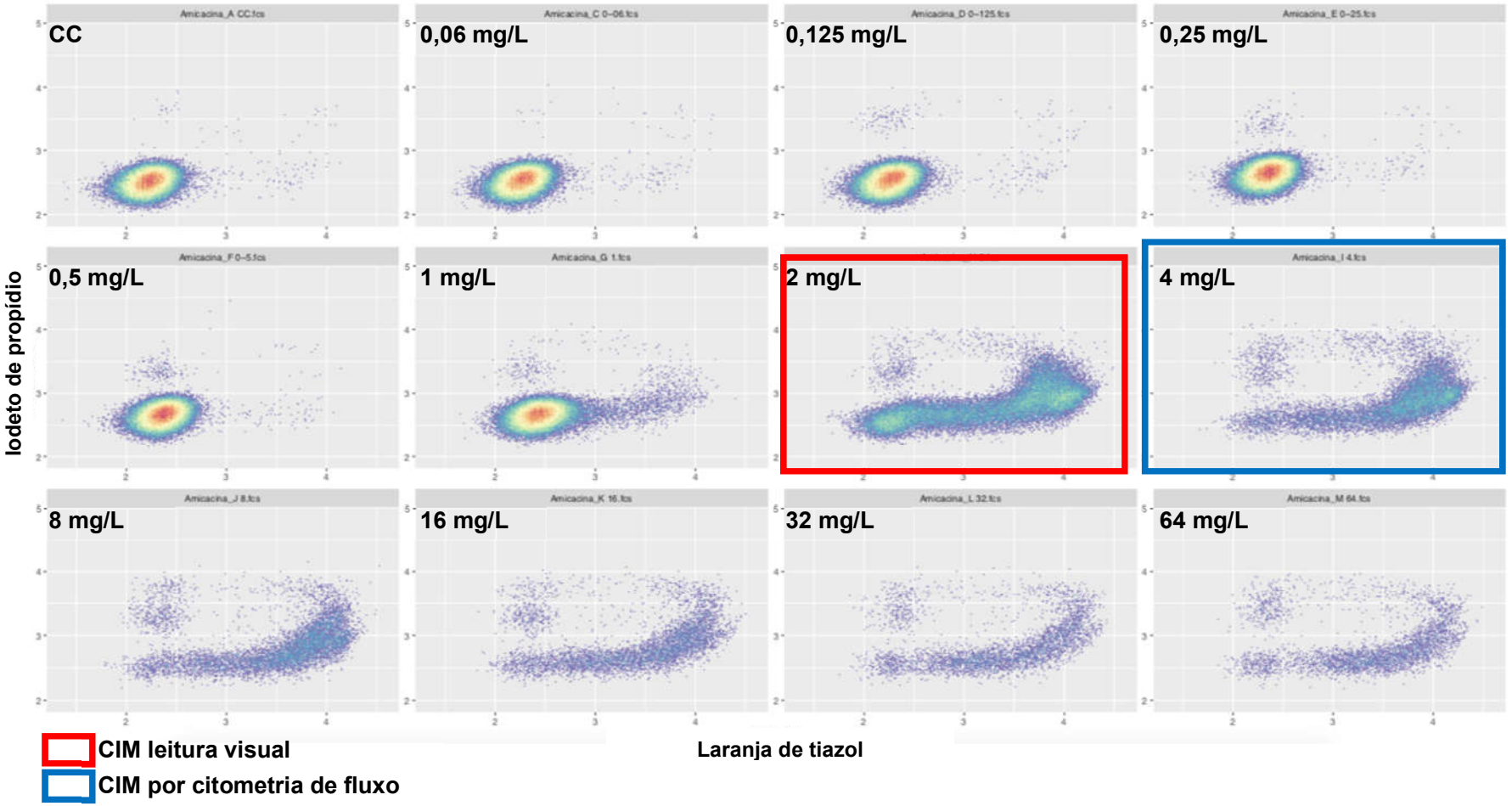
15 – L2220013 - *Klebsiella variicola* - Meropenem



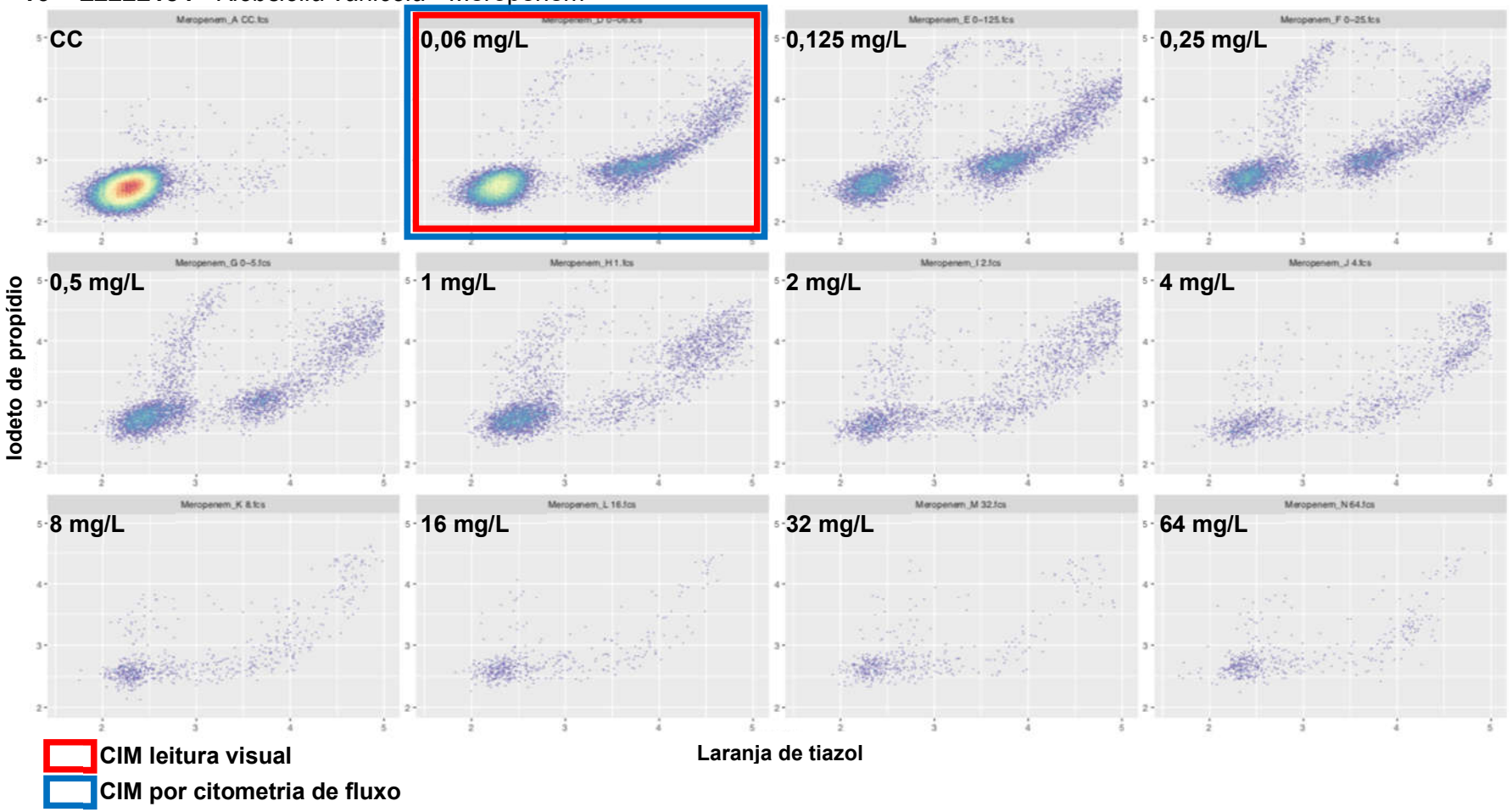
15 – L2220013 - *Klebsiella variicola* - Polimixina



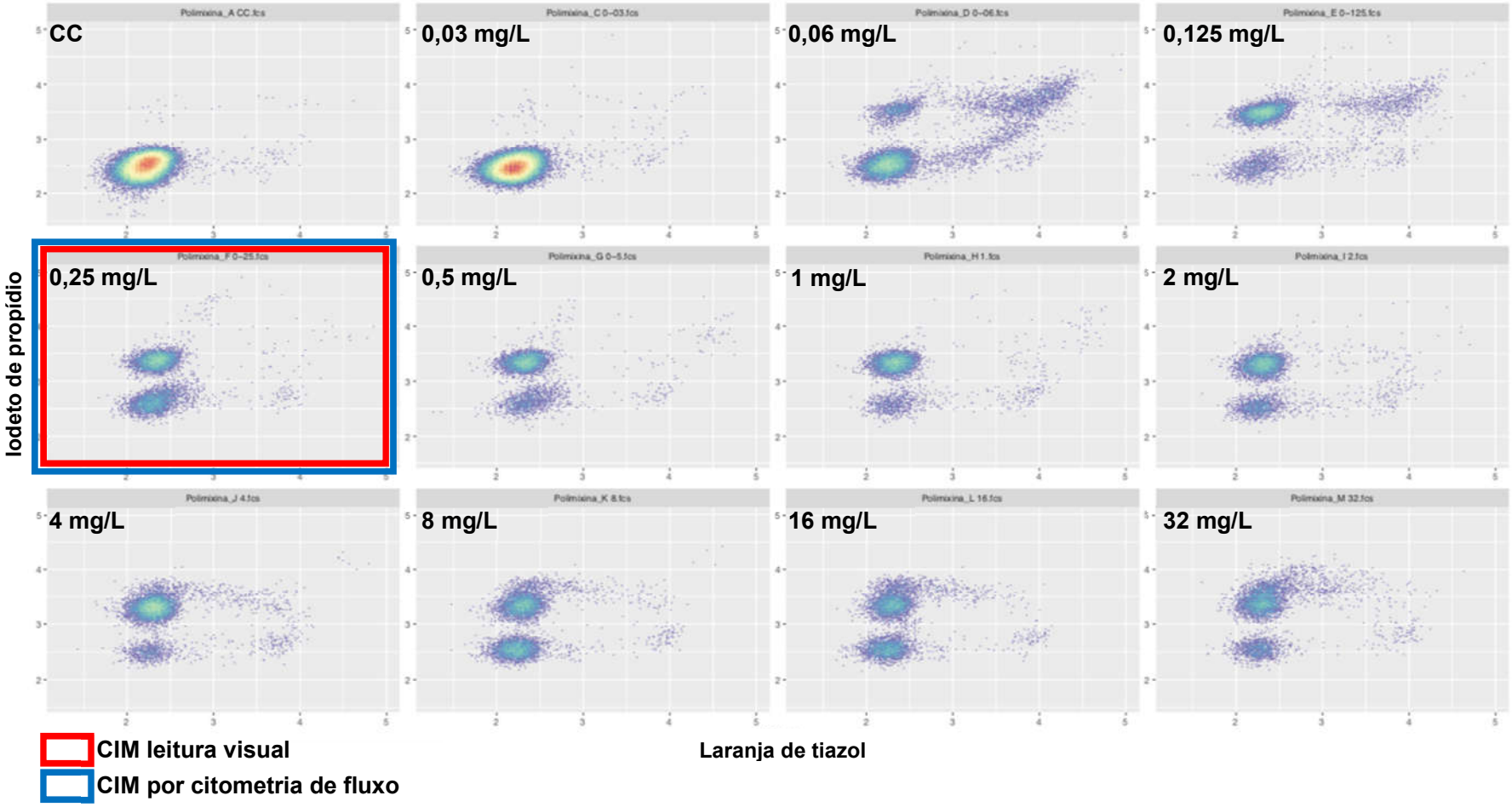
16 – L2222184 - *Klebsiella variicola* - Amicacina



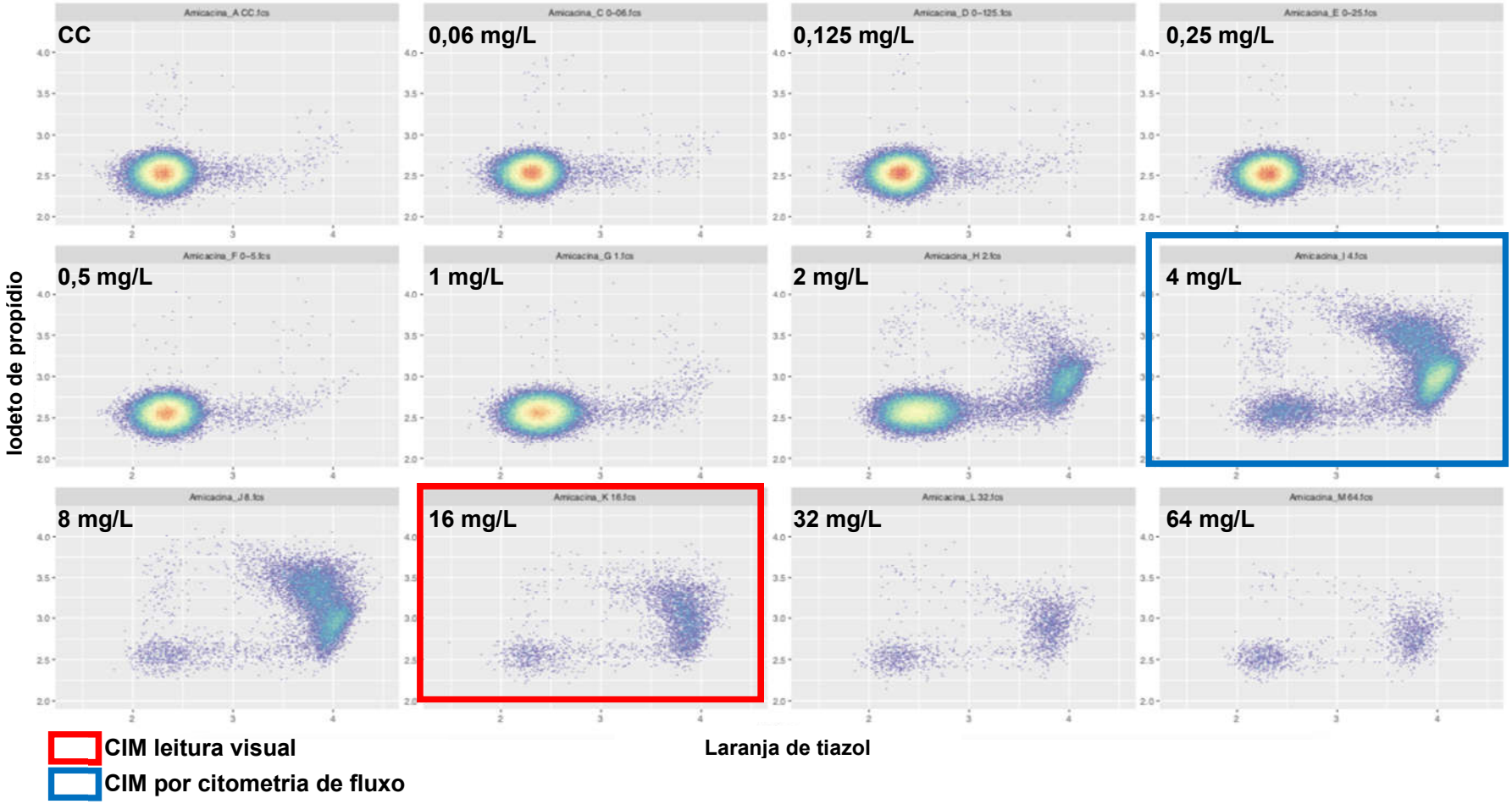
16 – L2222184 - *Klebsiella variicola* - Meropenem



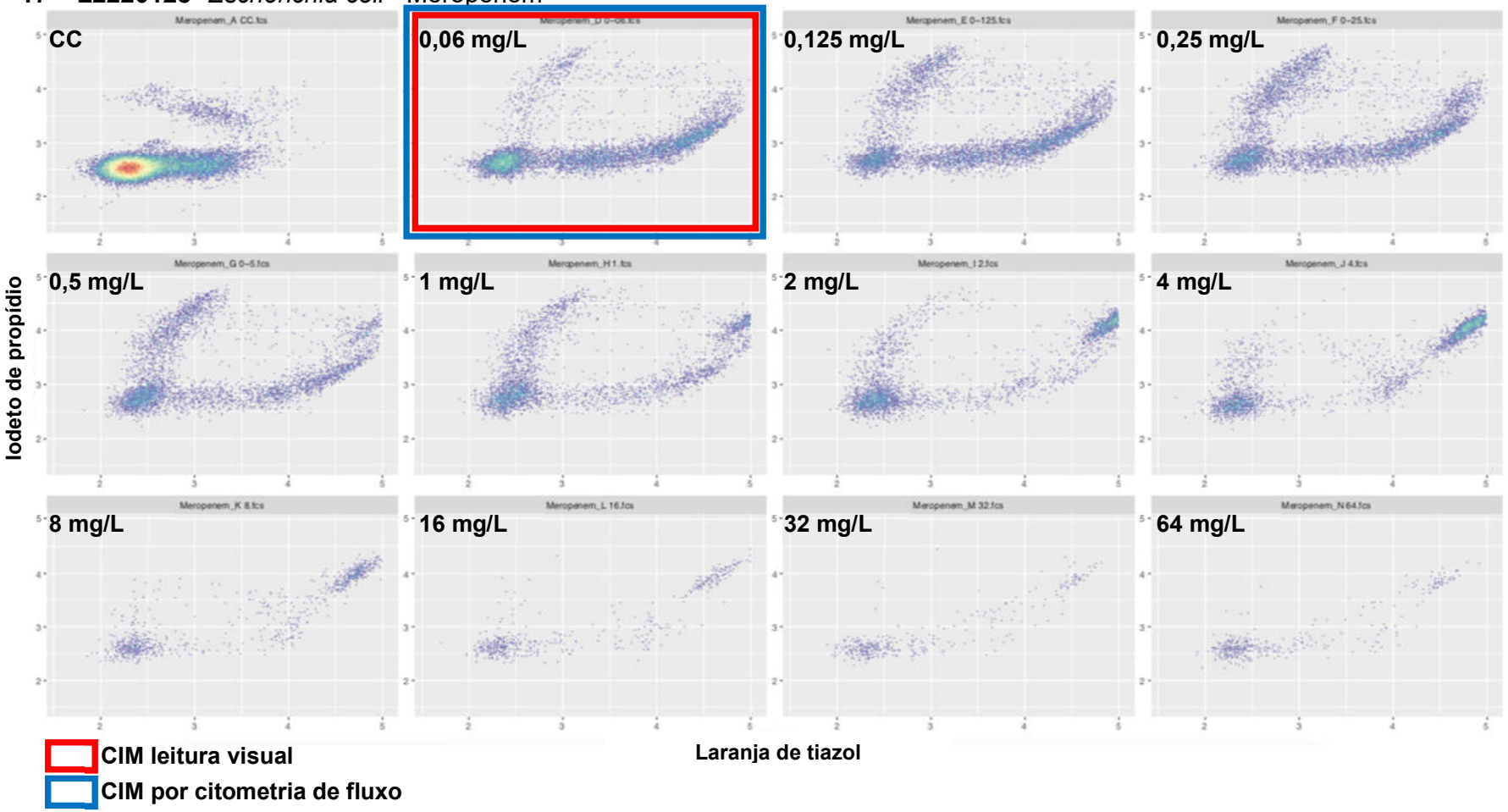
16 – L2222184 - *Klebsiella variicola* - Polimixina



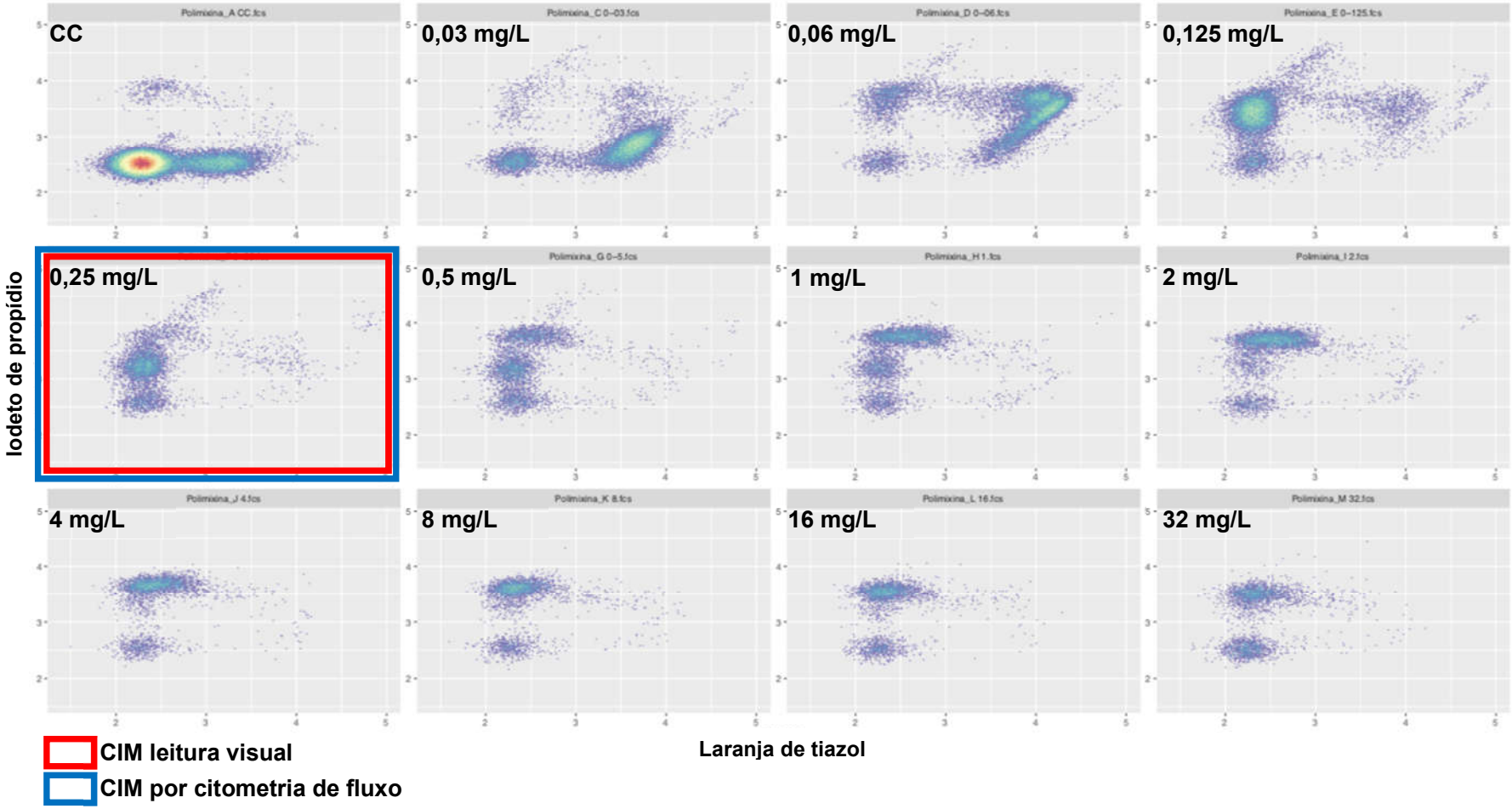
17 – L2220128- *Escherichia coli* - Amicacina



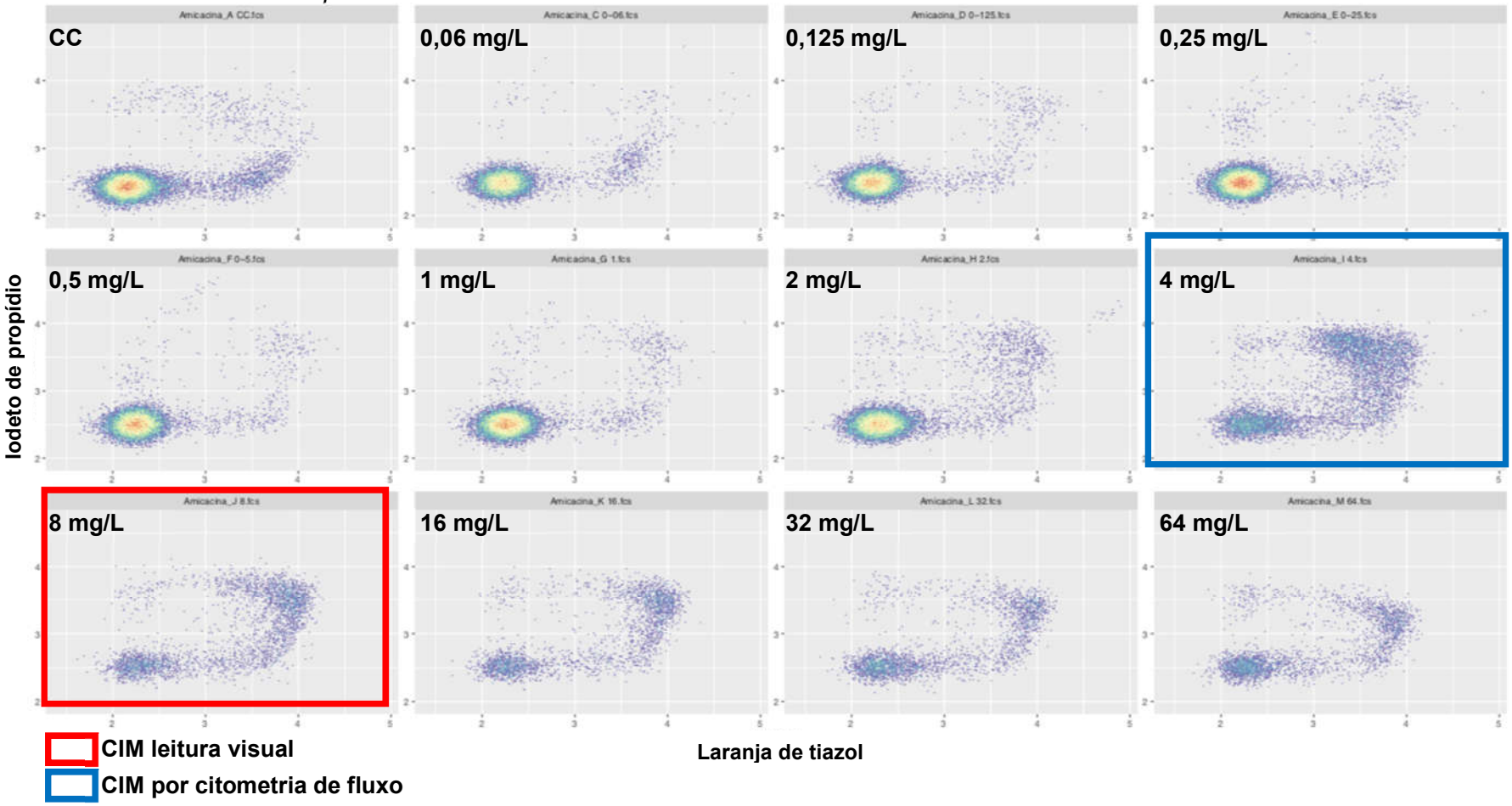
17 – L2220128- *Escherichia coli* - Meropenem



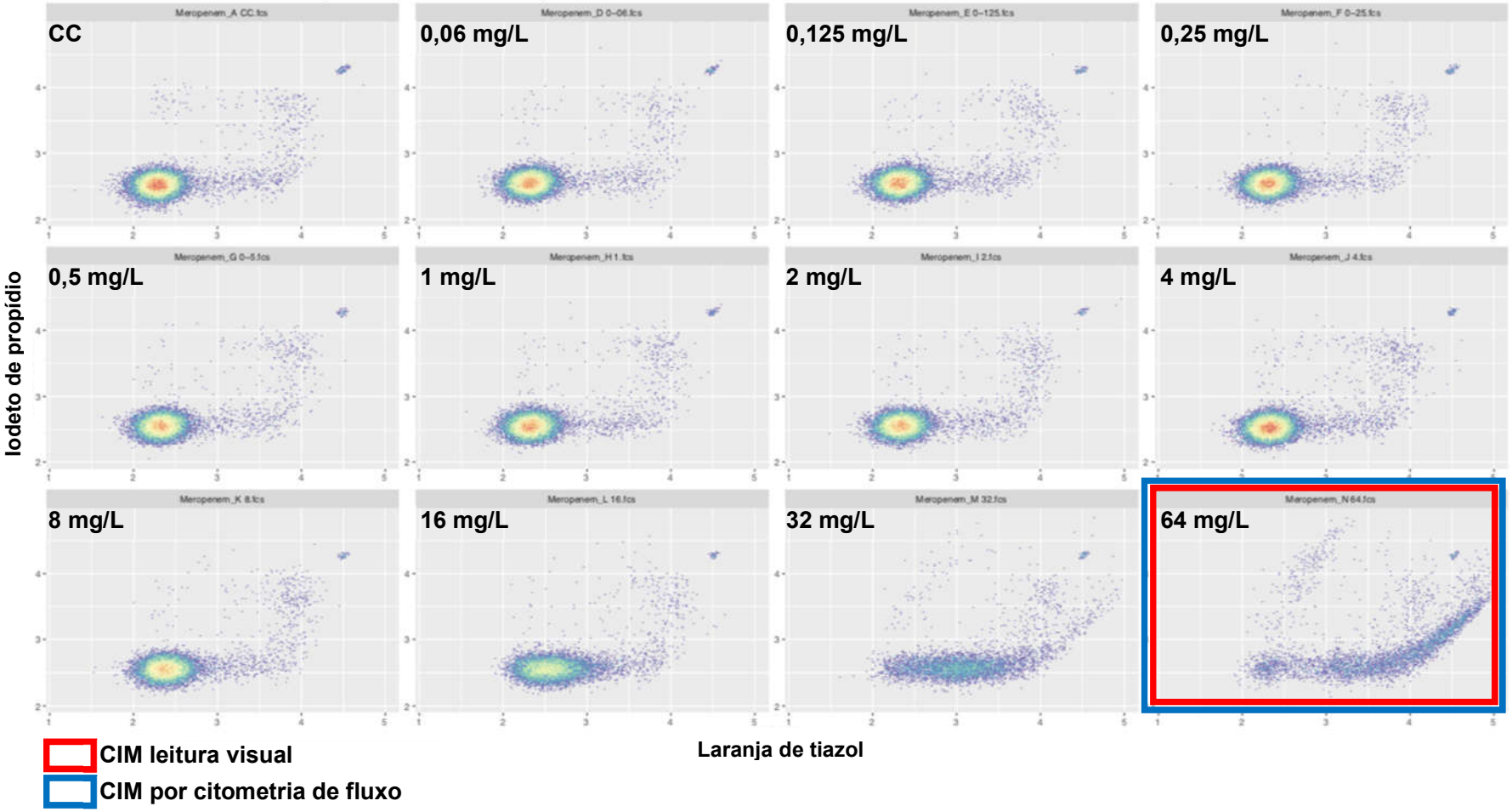
17 – L2220128- *Escherichia coli* - Polimixina



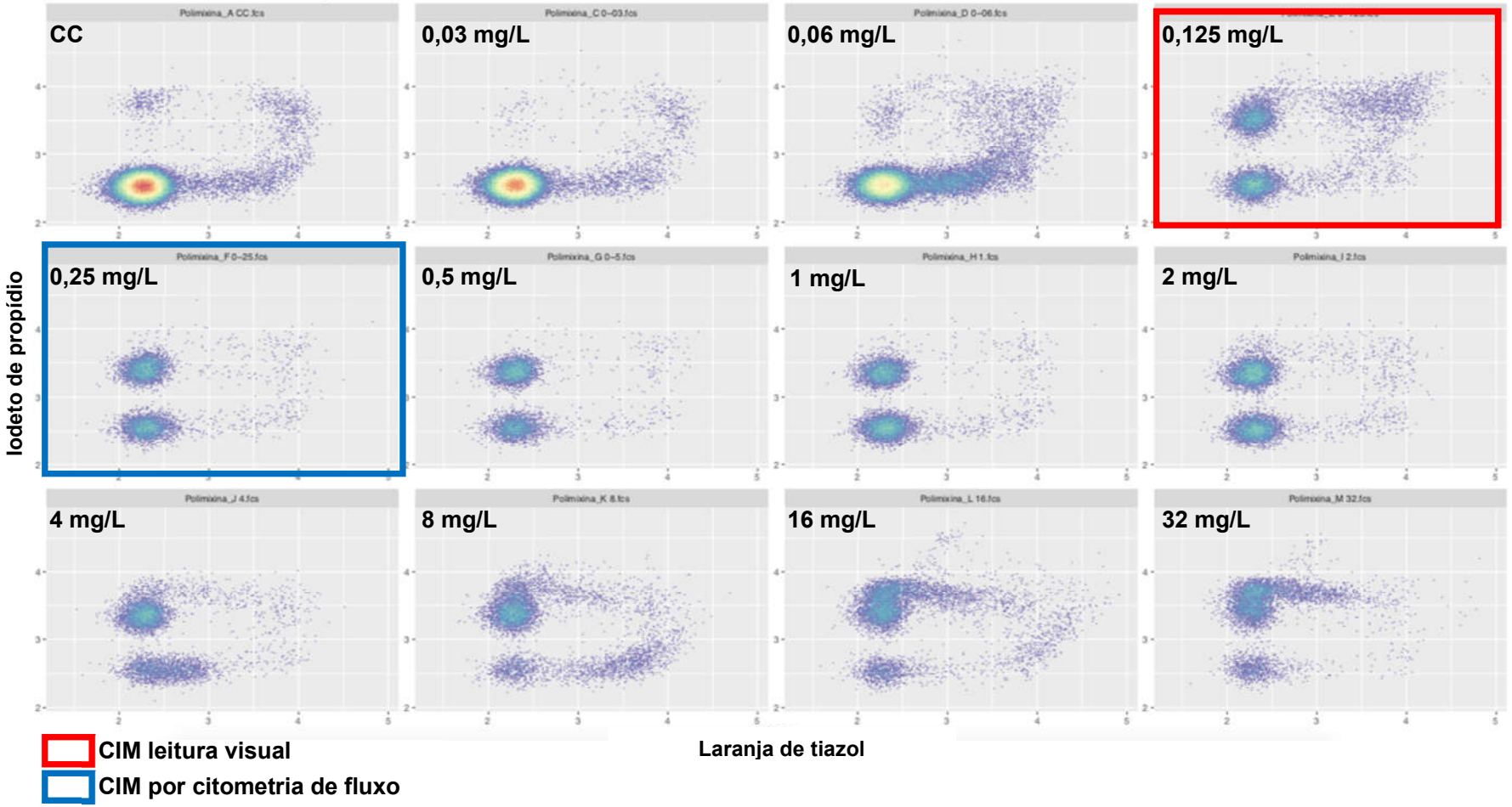
18 – L2220460- *Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



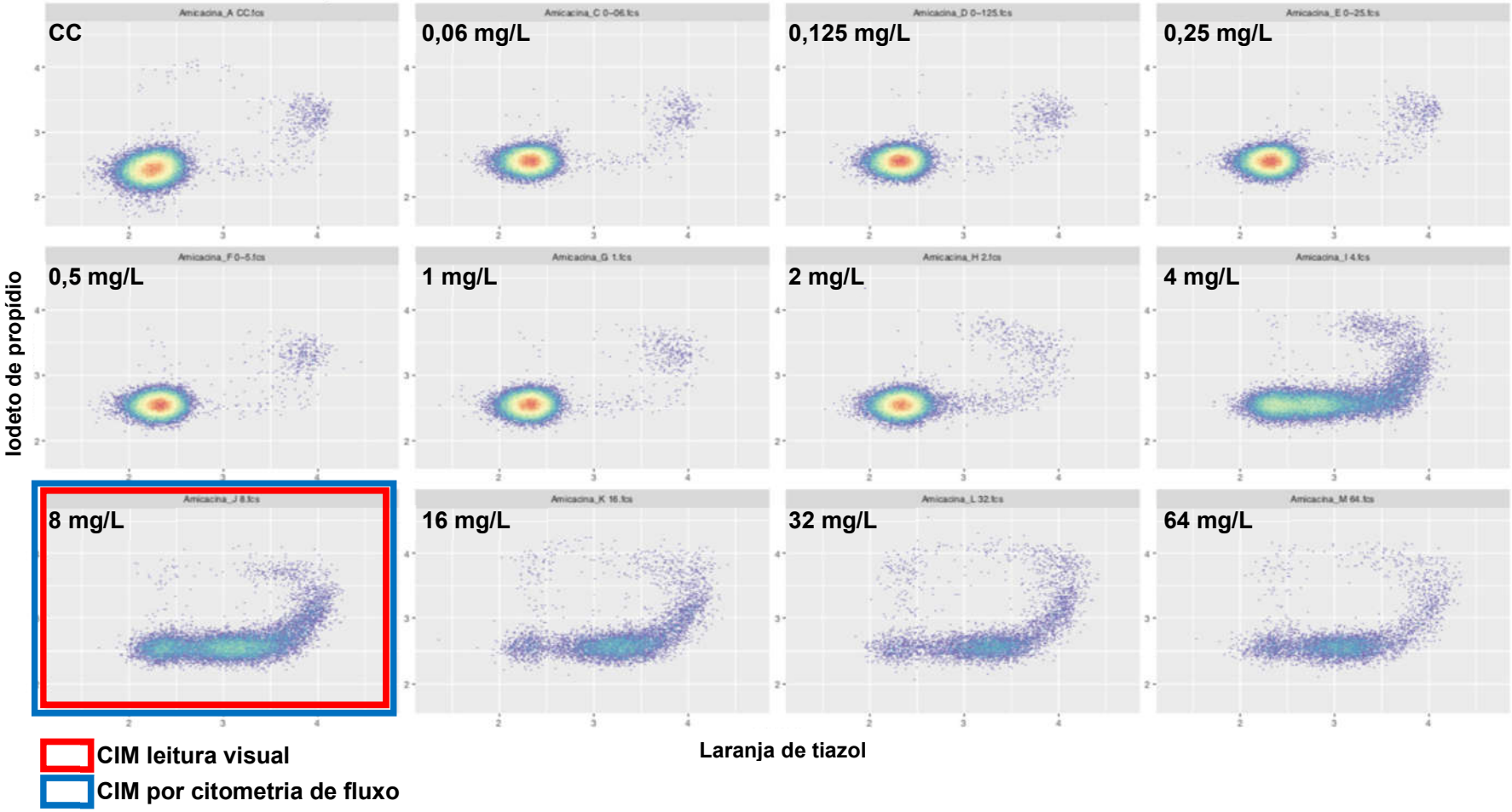
18 – L2220460- *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



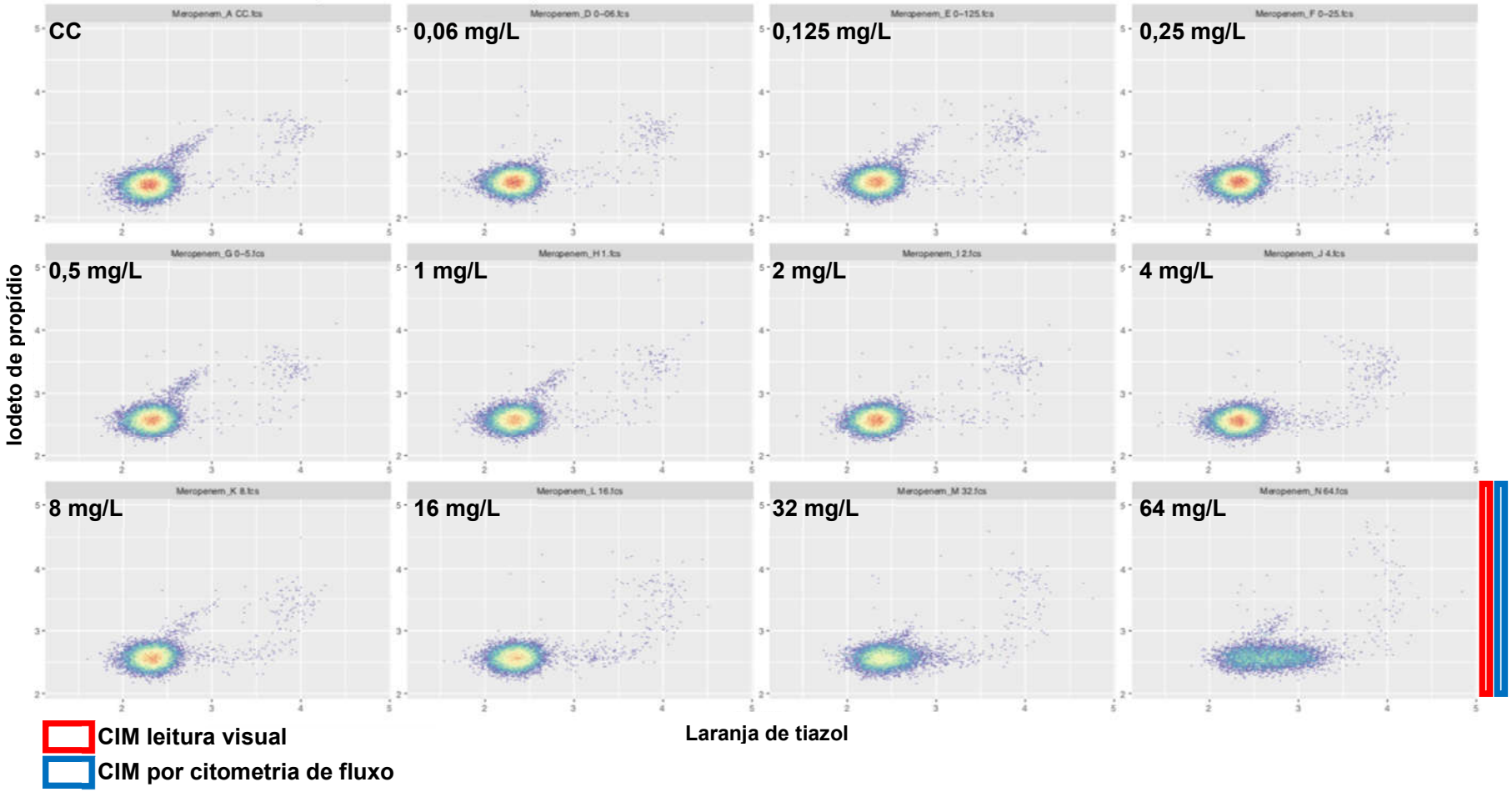
18 – L2220460- *Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



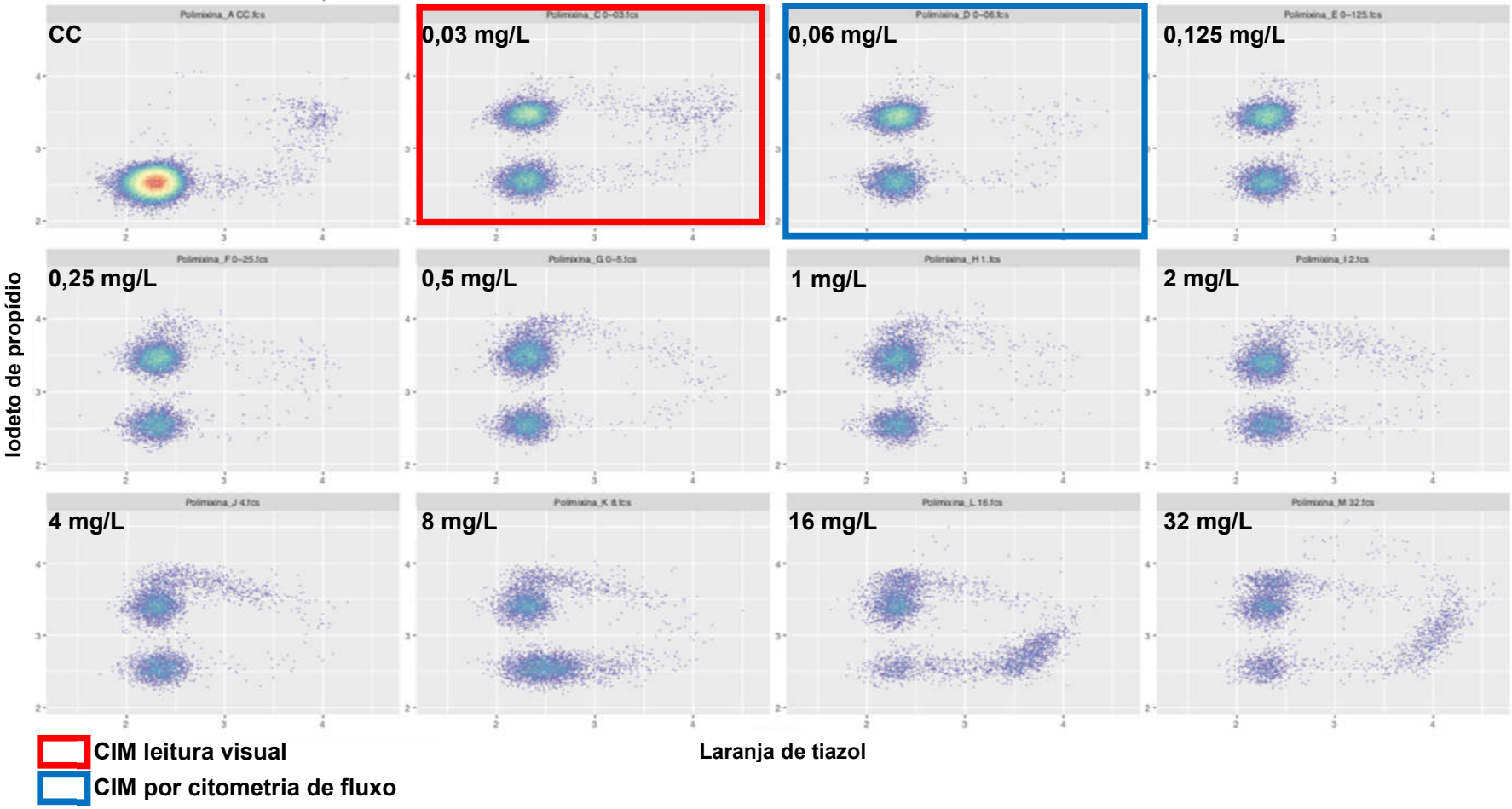
19 – L2224197 -*Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



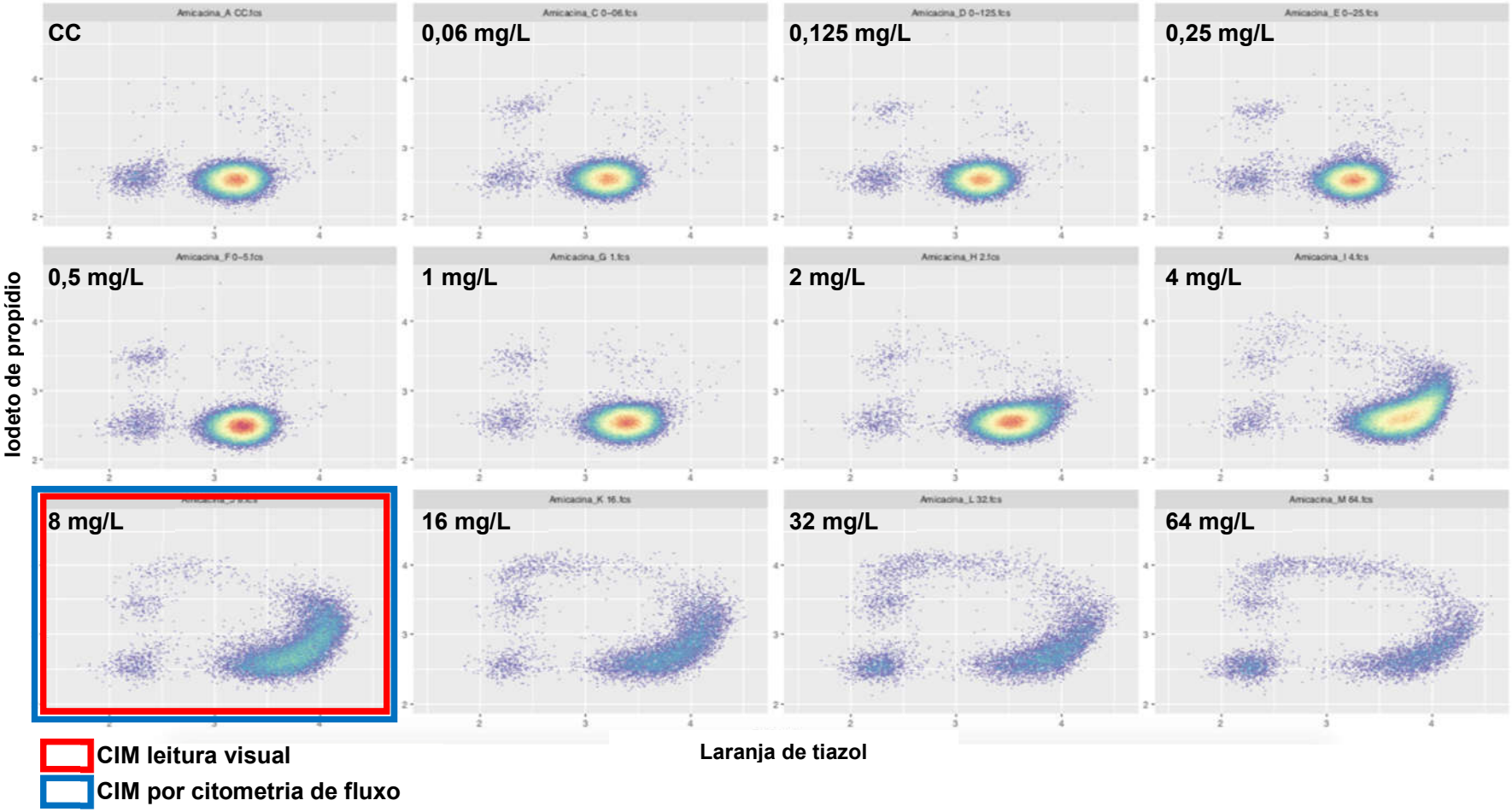
19 – L2224197 -*Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



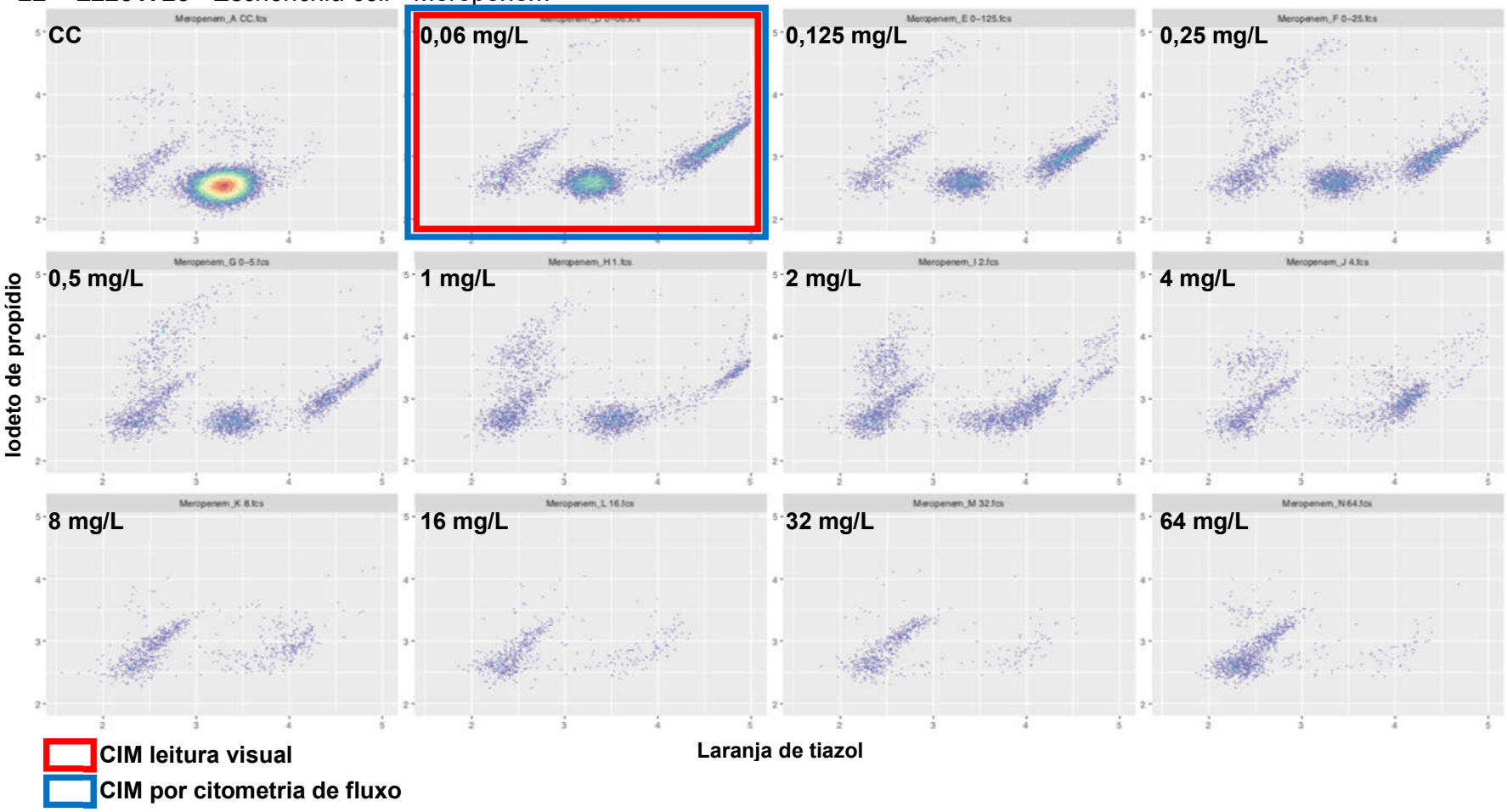
19 – L2224197 -*Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



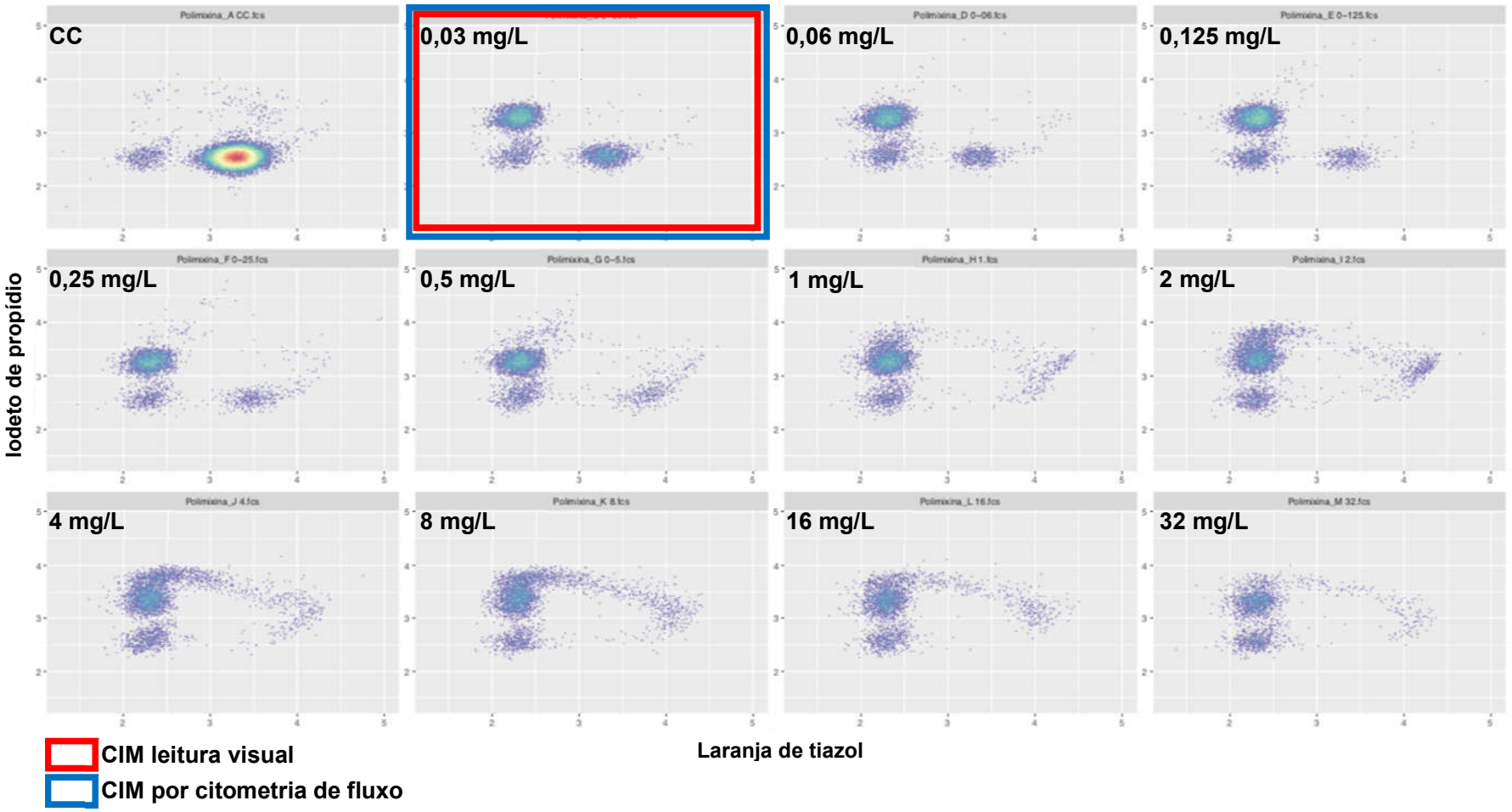
22 – L2251725 - *Escherichia coli* - Amicacina



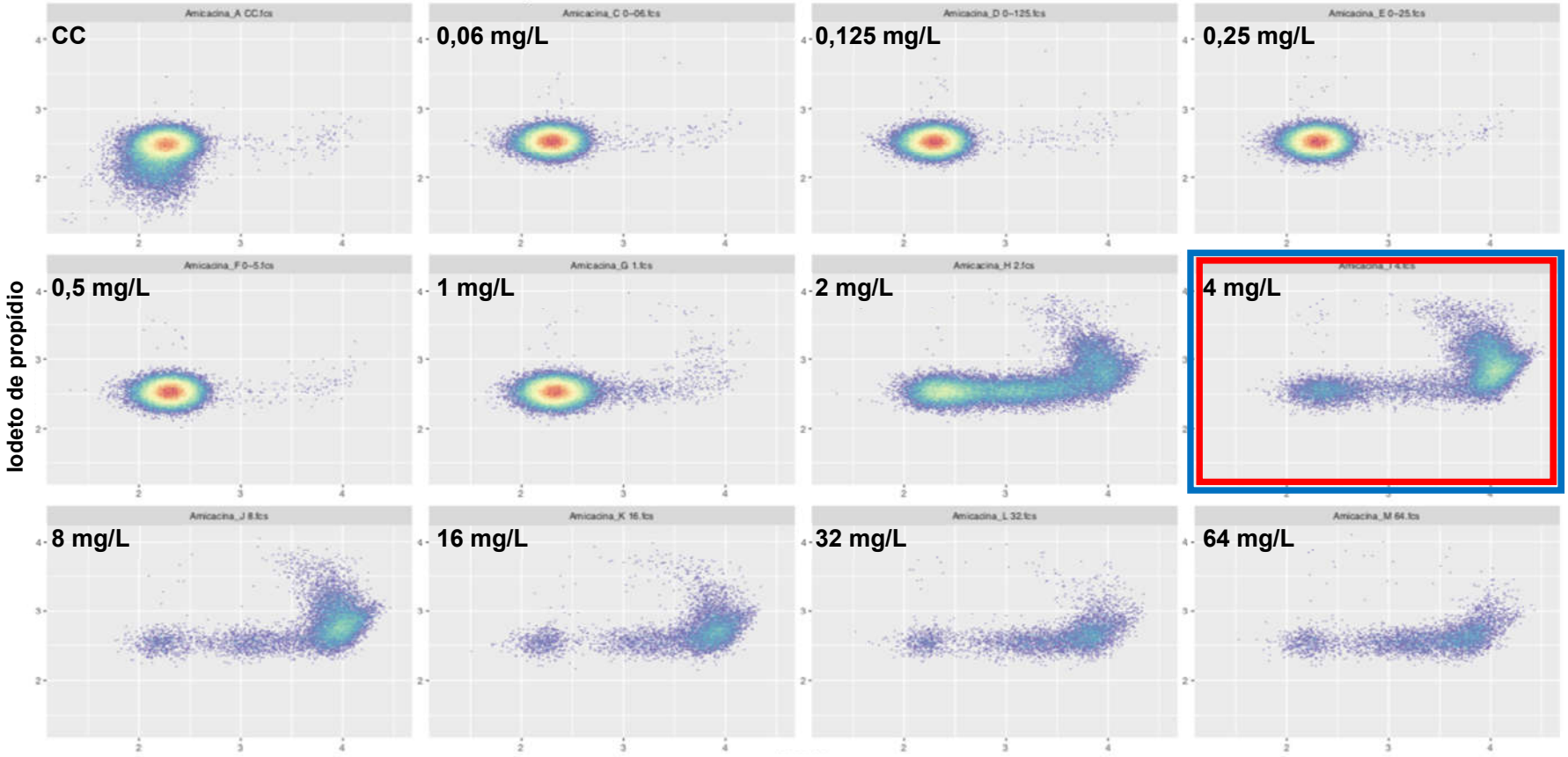
22 – L2251725 - *Escherichia coli* - Meropenem



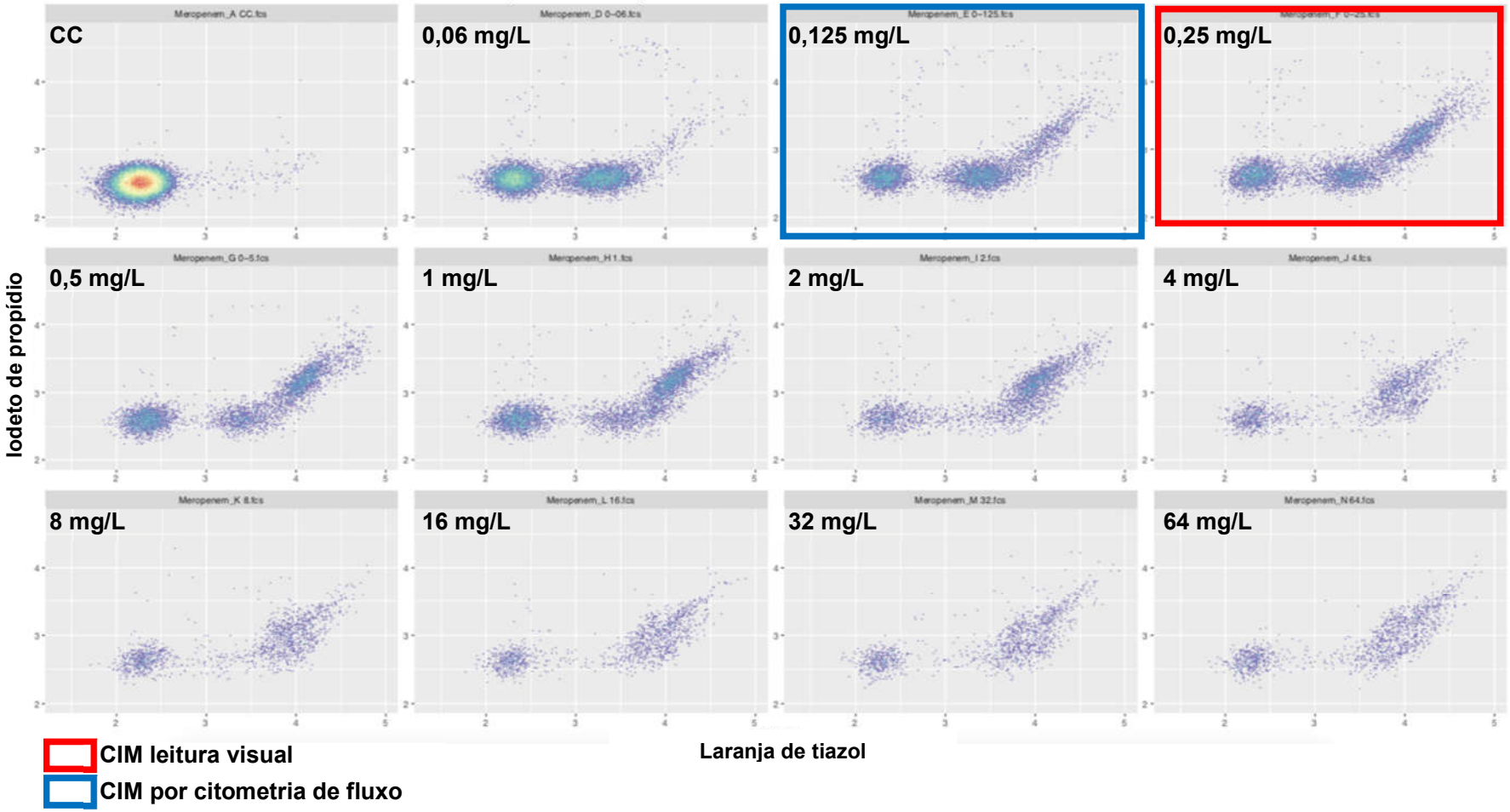
22 – L2251725 - *Escherichia coli* - Polimixina



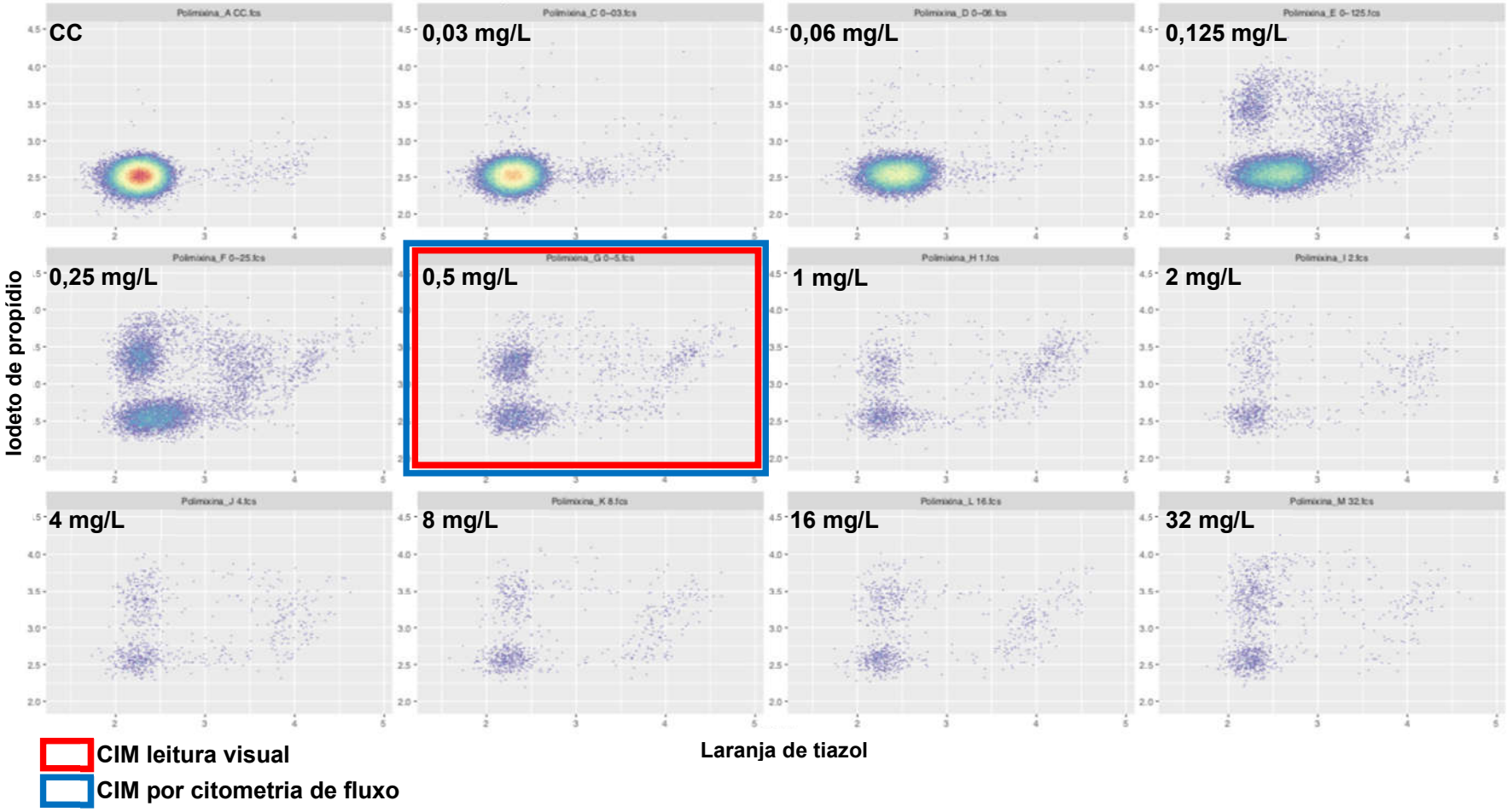
23 – L2264452 - *Enterobacter cloacae complex* - Amicacina



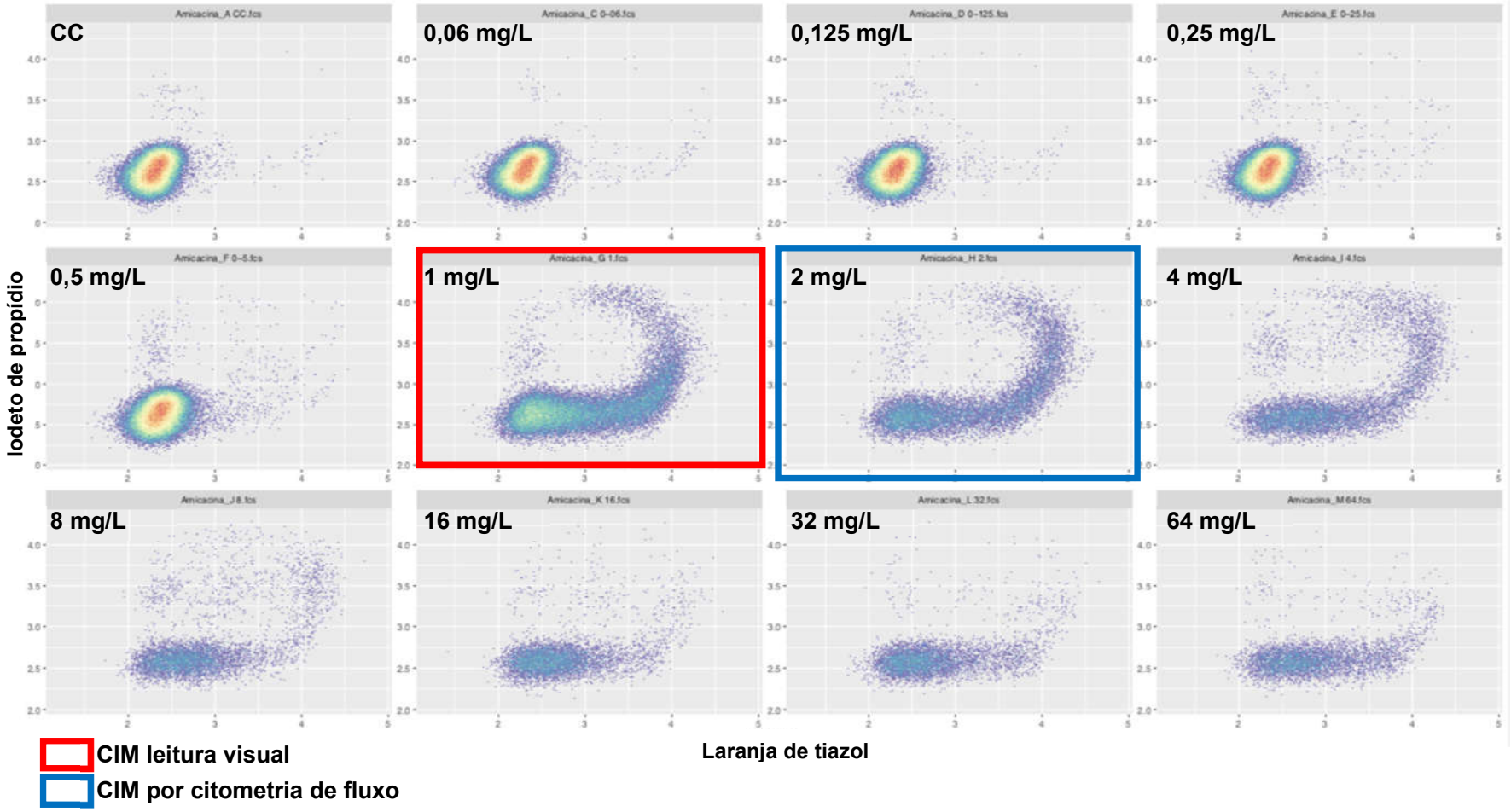
23 – L2264452 - *Enterobacter cloacae complex* - Meropenem



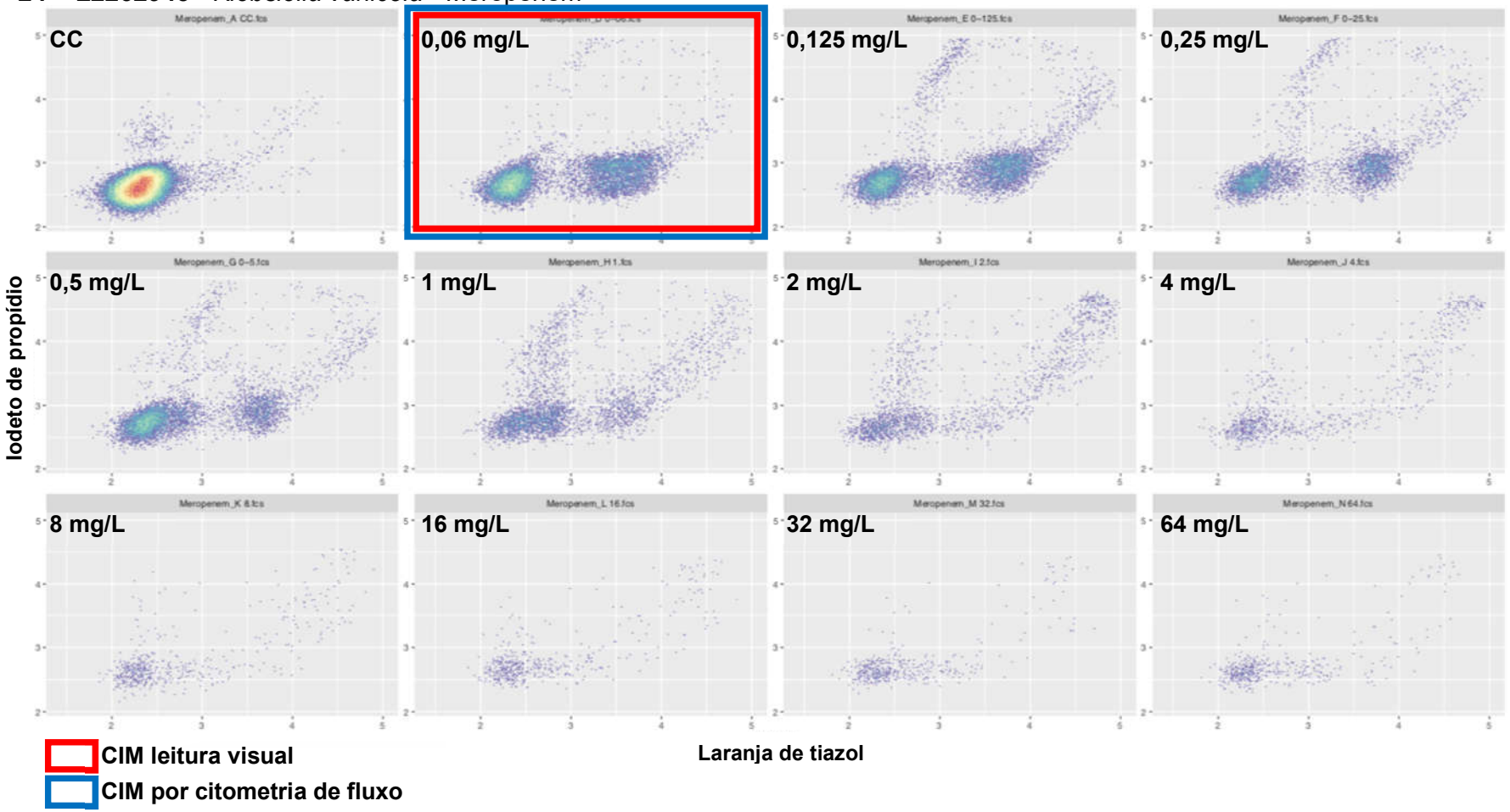
23 – L2264452 - *Enterobacter cloacae complex* - Polimixina



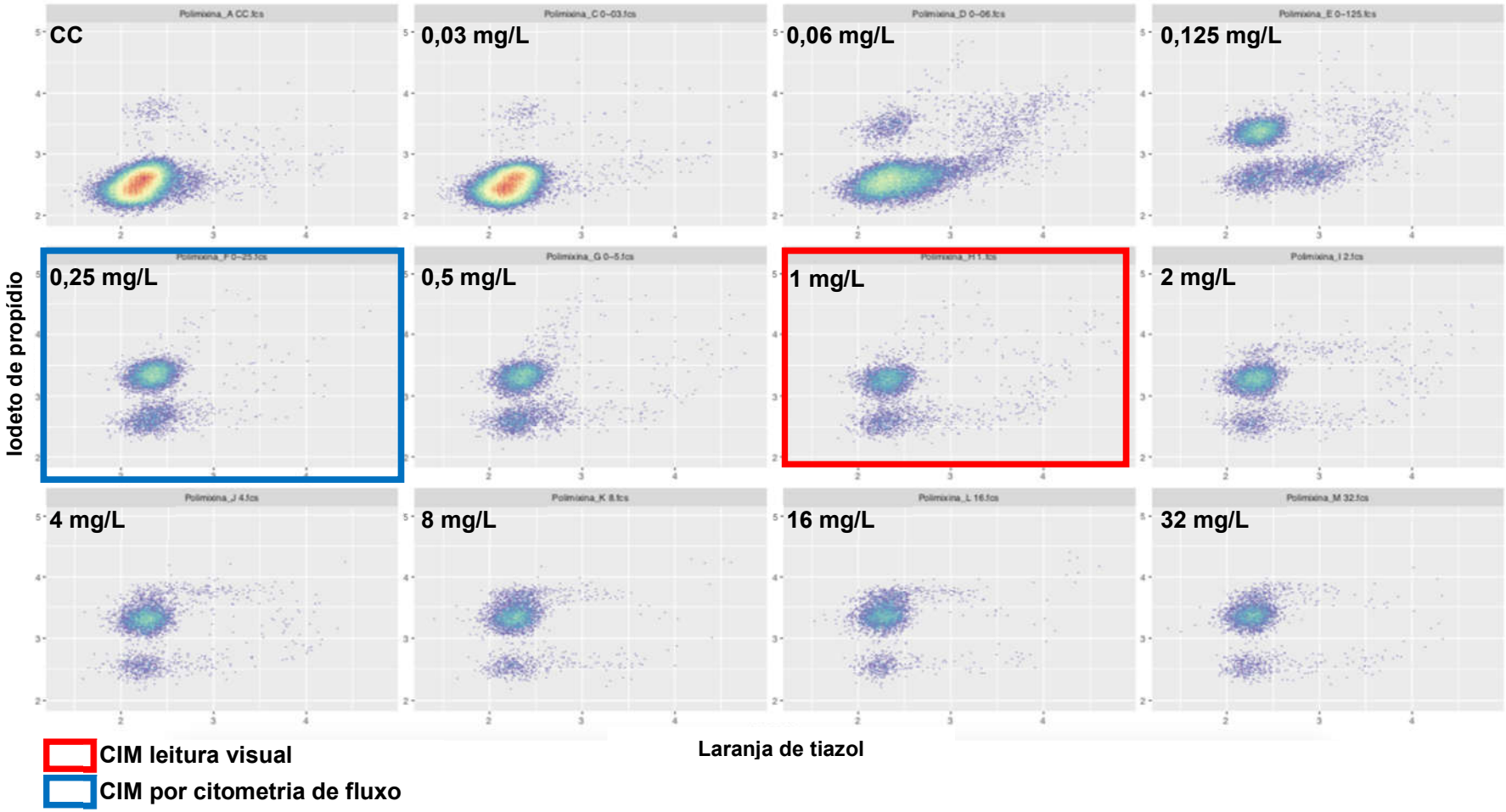
24 – L2262945 - *Klebsiella variicola* - Amicacina



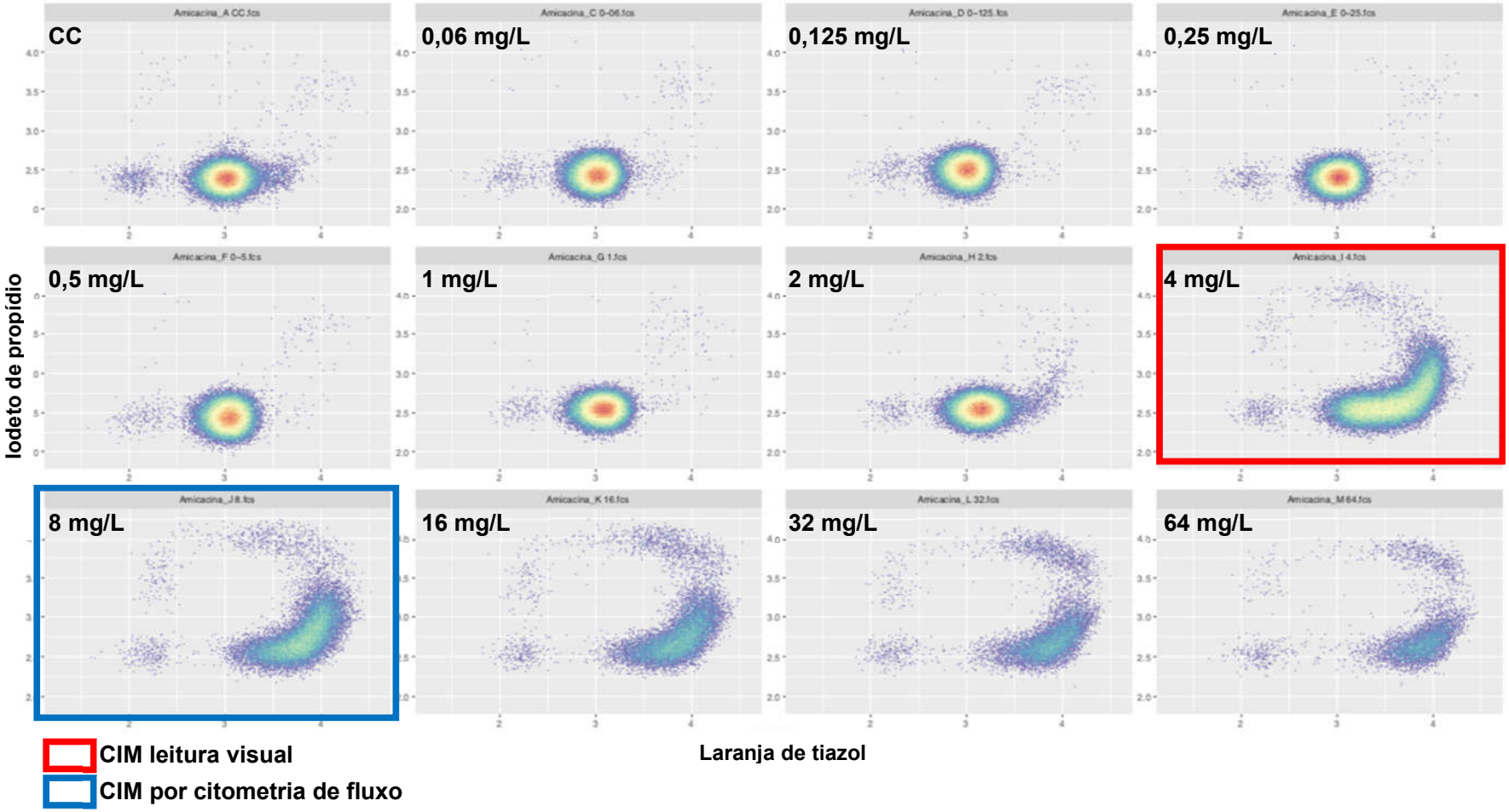
24 – L2262945 - *Klebsiella variicola* - Meropenem



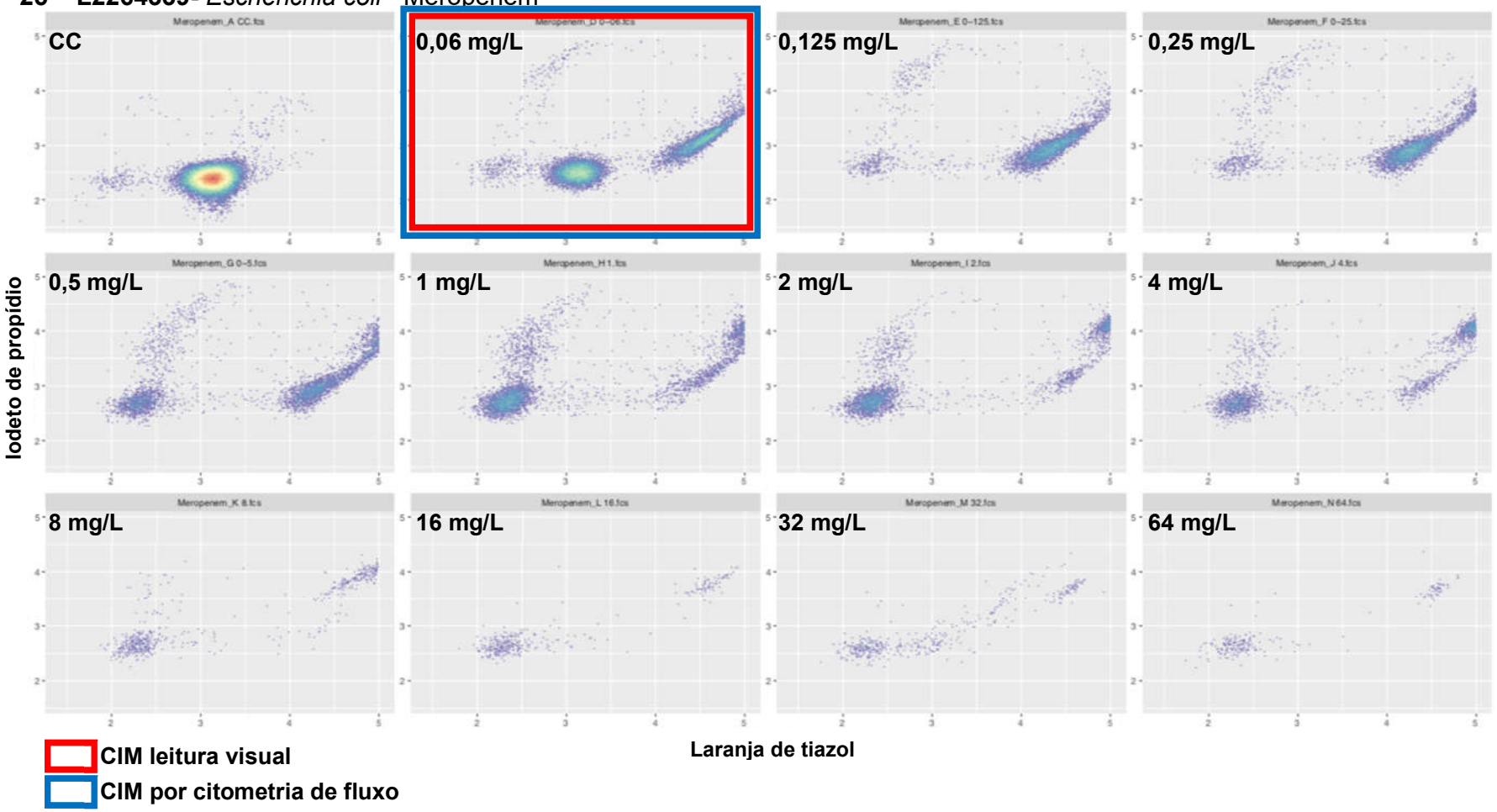
24 – L2262945 - *Klebsiella variicola* - Polimixina



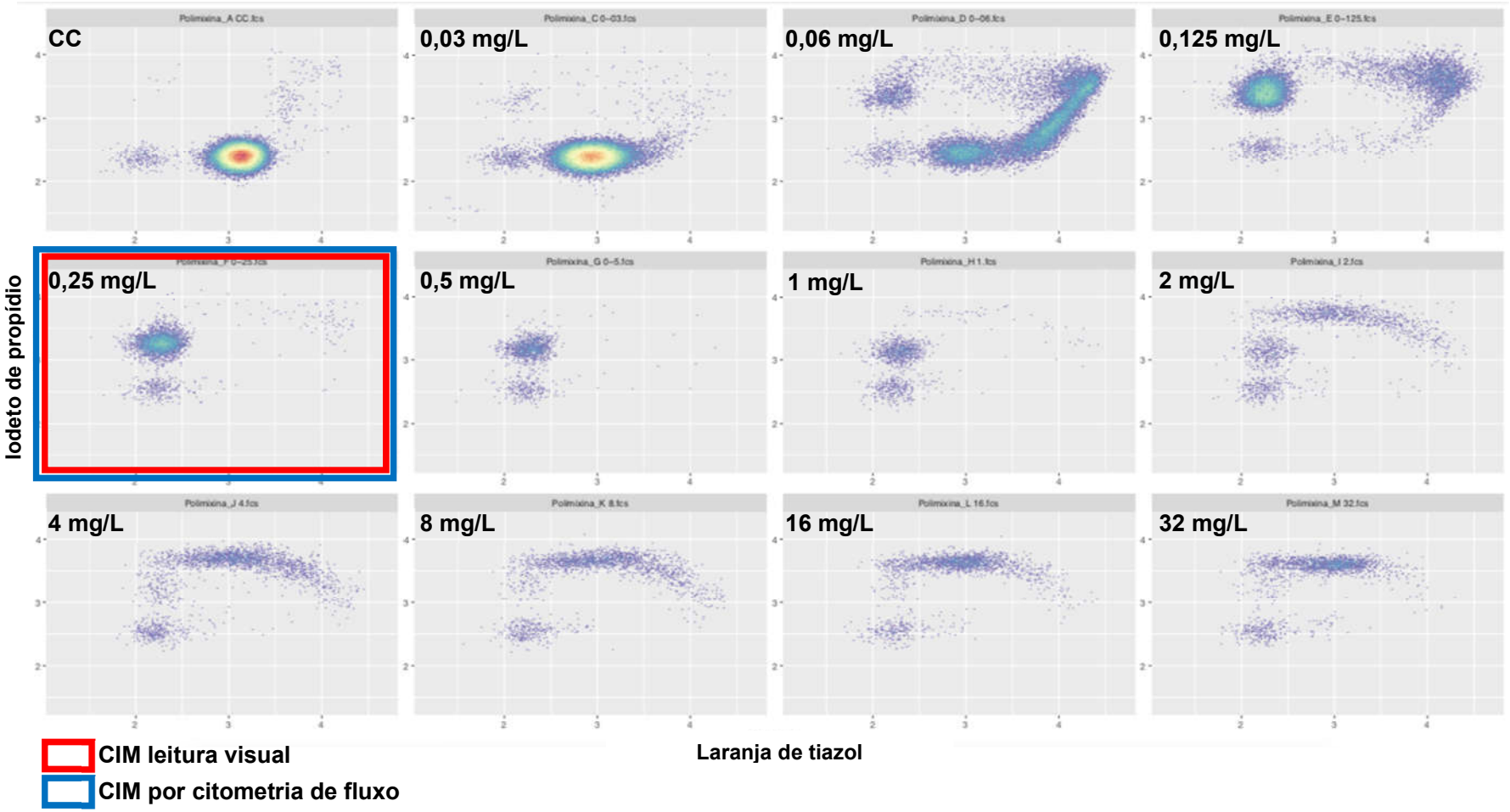
25 – L2264339 - *Escherichia coli* - Amicacina



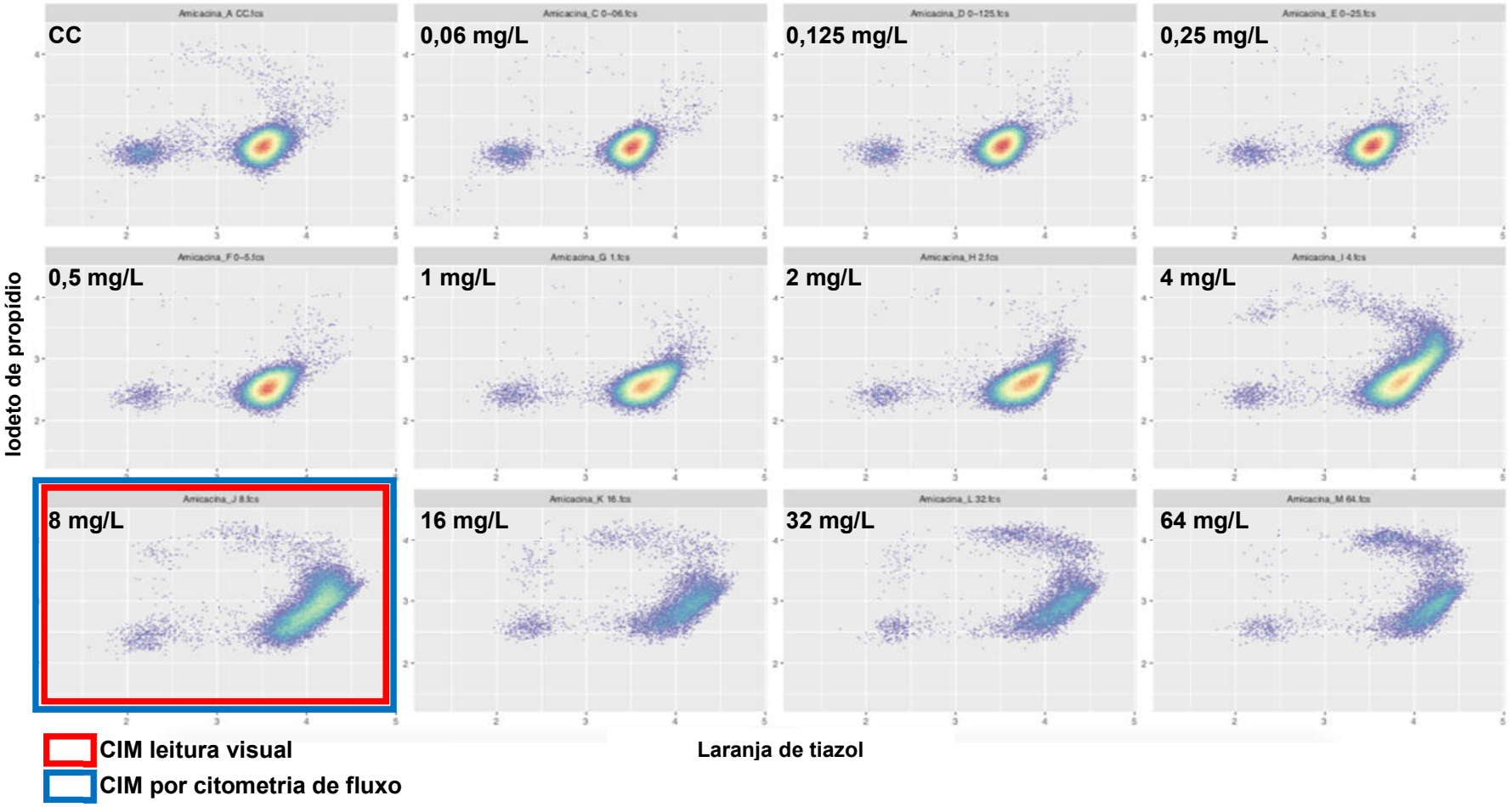
25 – L2264339- *Escherichia coli* - Meropenem



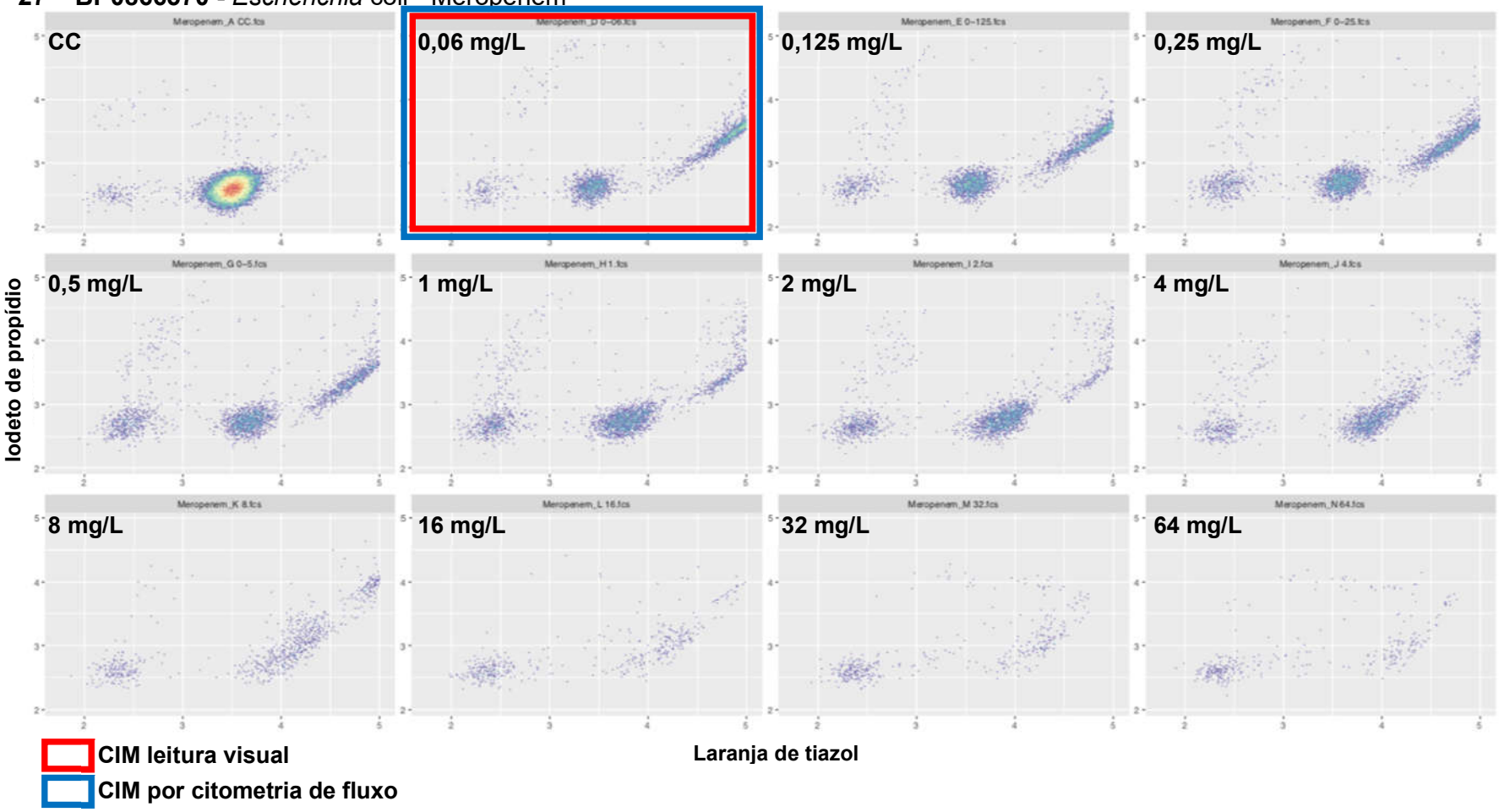
25 – L2264339 - *Escherichia coli* - Polimixina



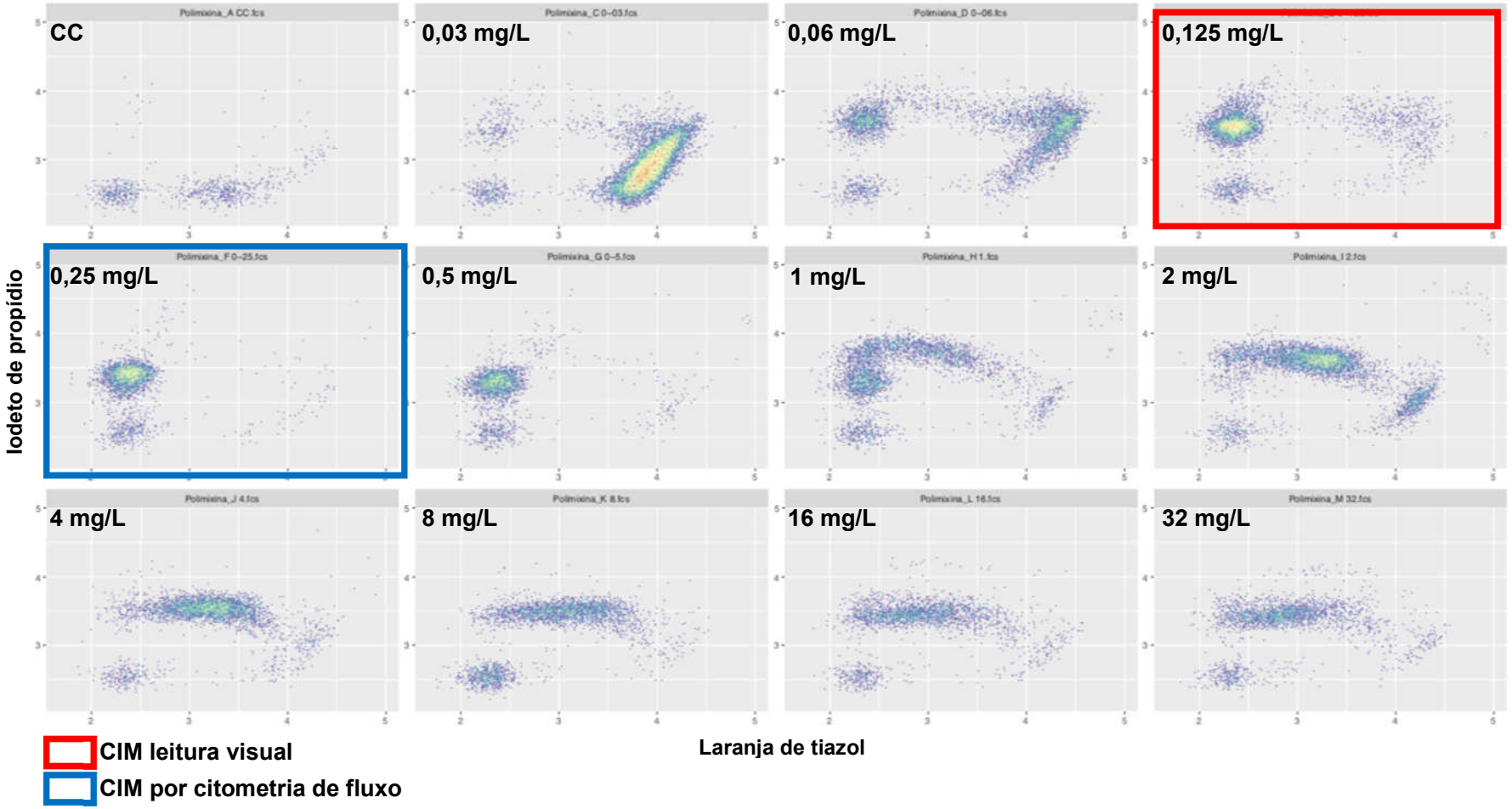
27 – BP0866570 - *Escherichia* coli - Amicacina



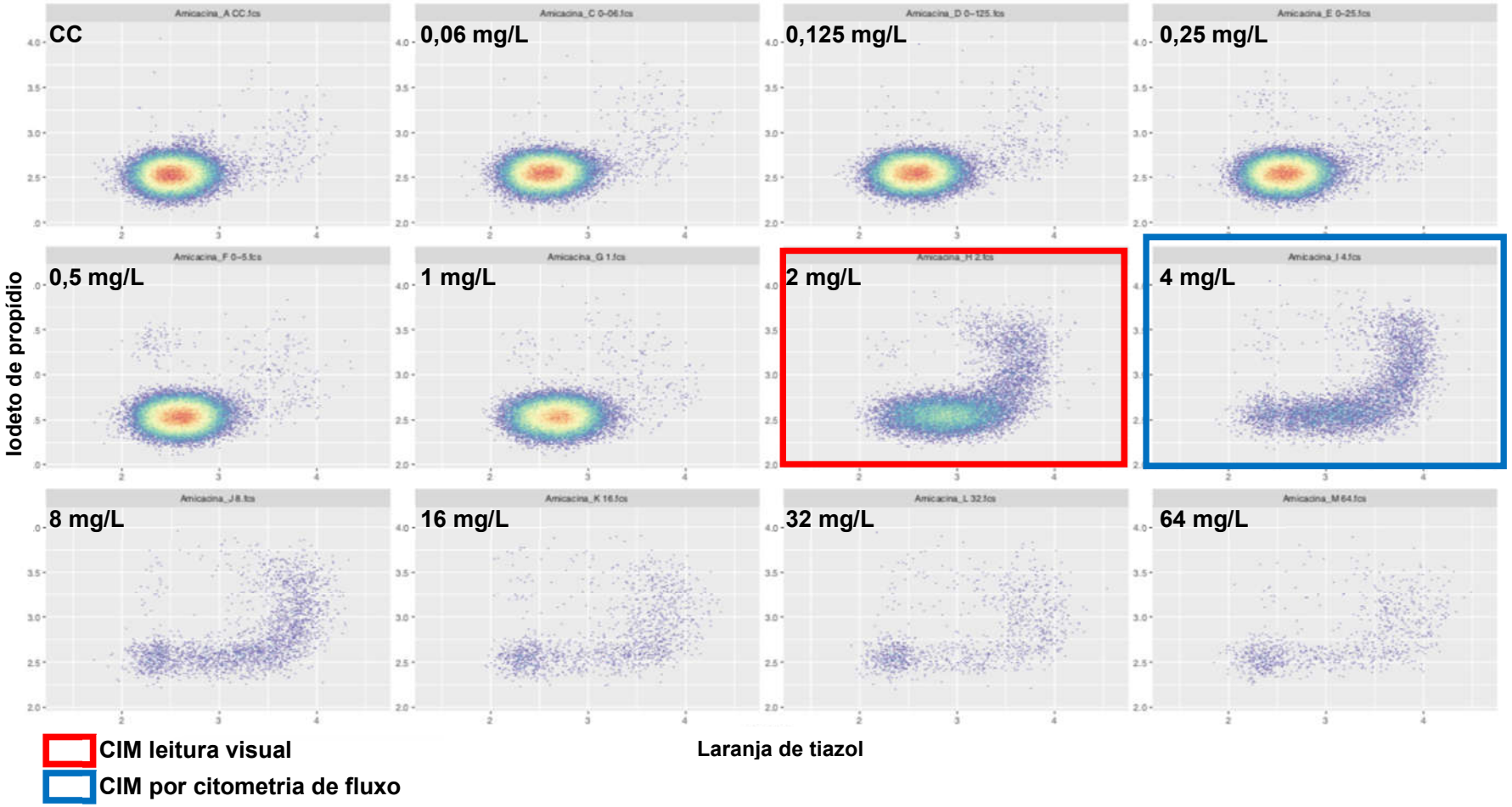
27 – BP0866570 - *Escherichia* coli - Meropenem



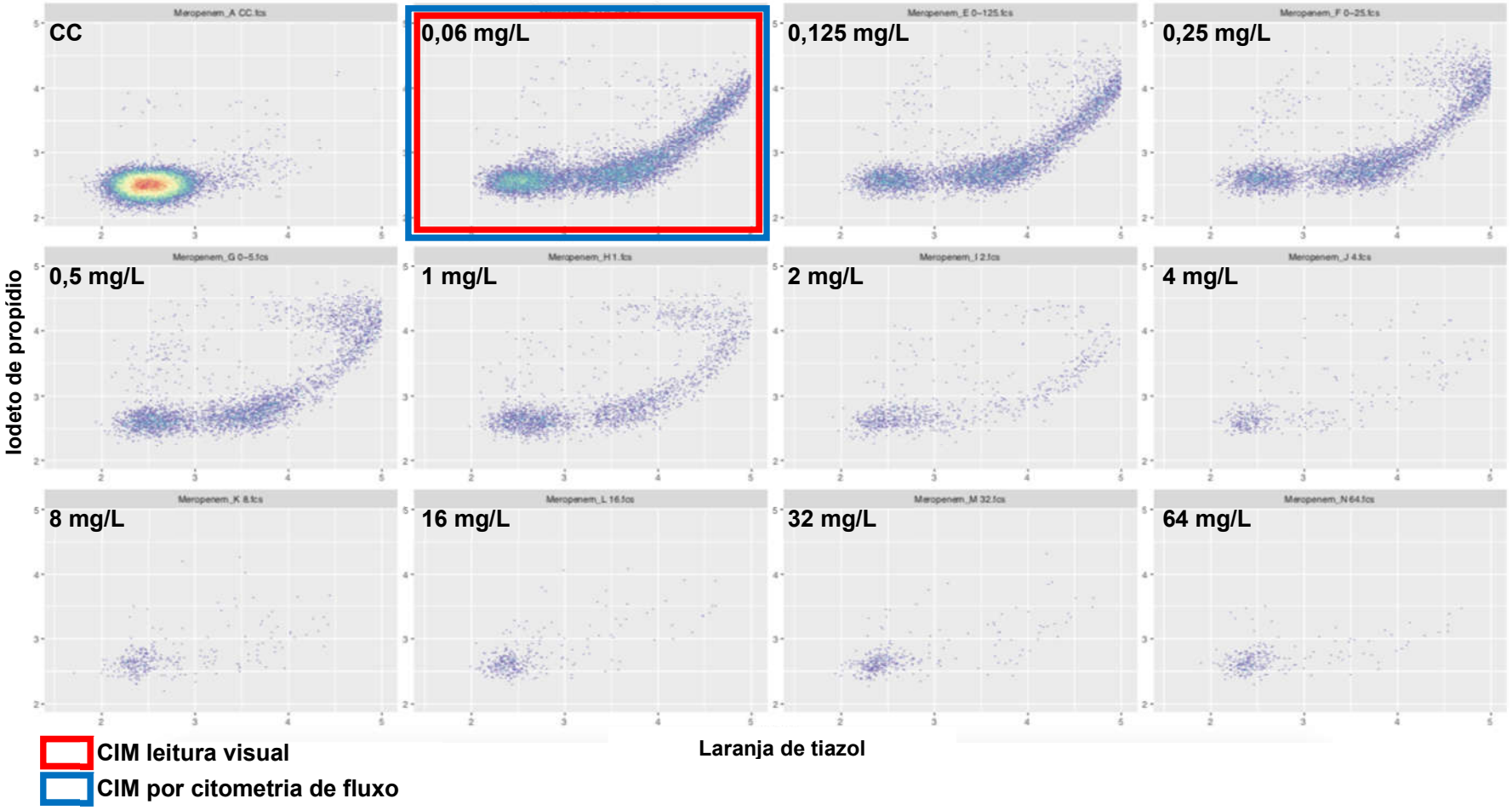
27 – BP0866570 - *Escherichia* coli - Polimixina



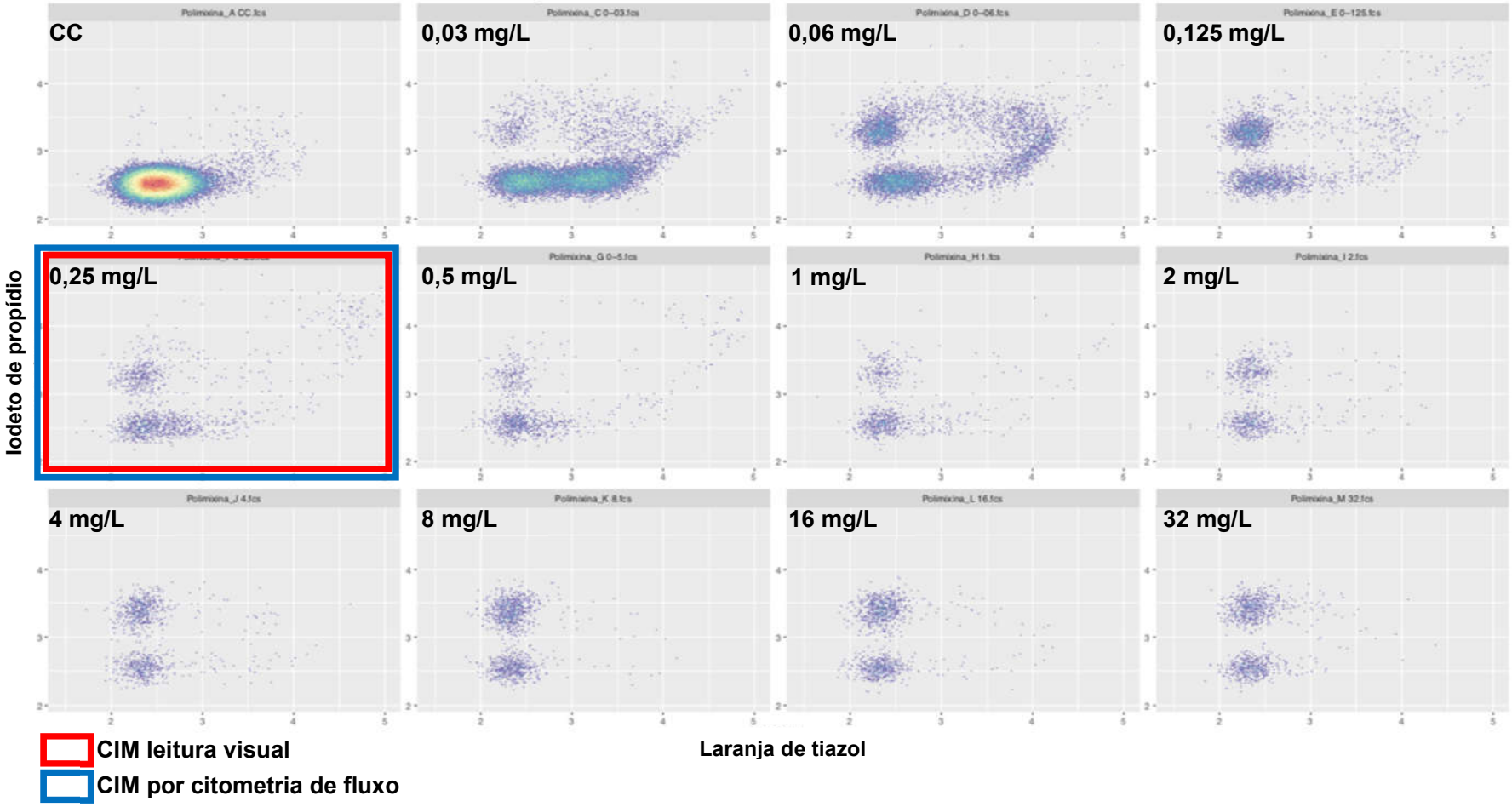
28 – BP0864836 - *Enterobacter cloacae* complex - Amicacina



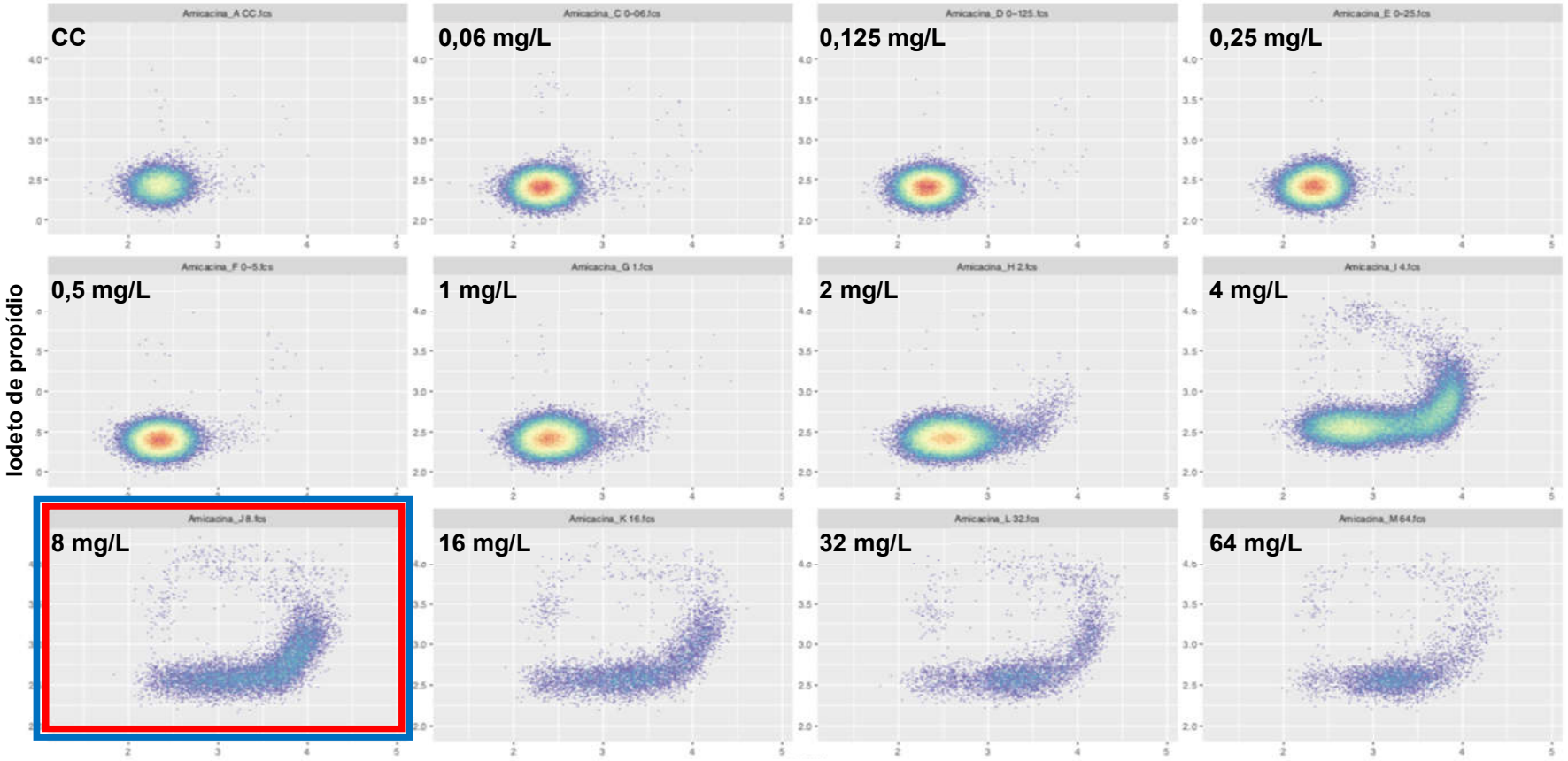
28 – BP0864836 - *Enterobacter cloacae* complex - Meropenem



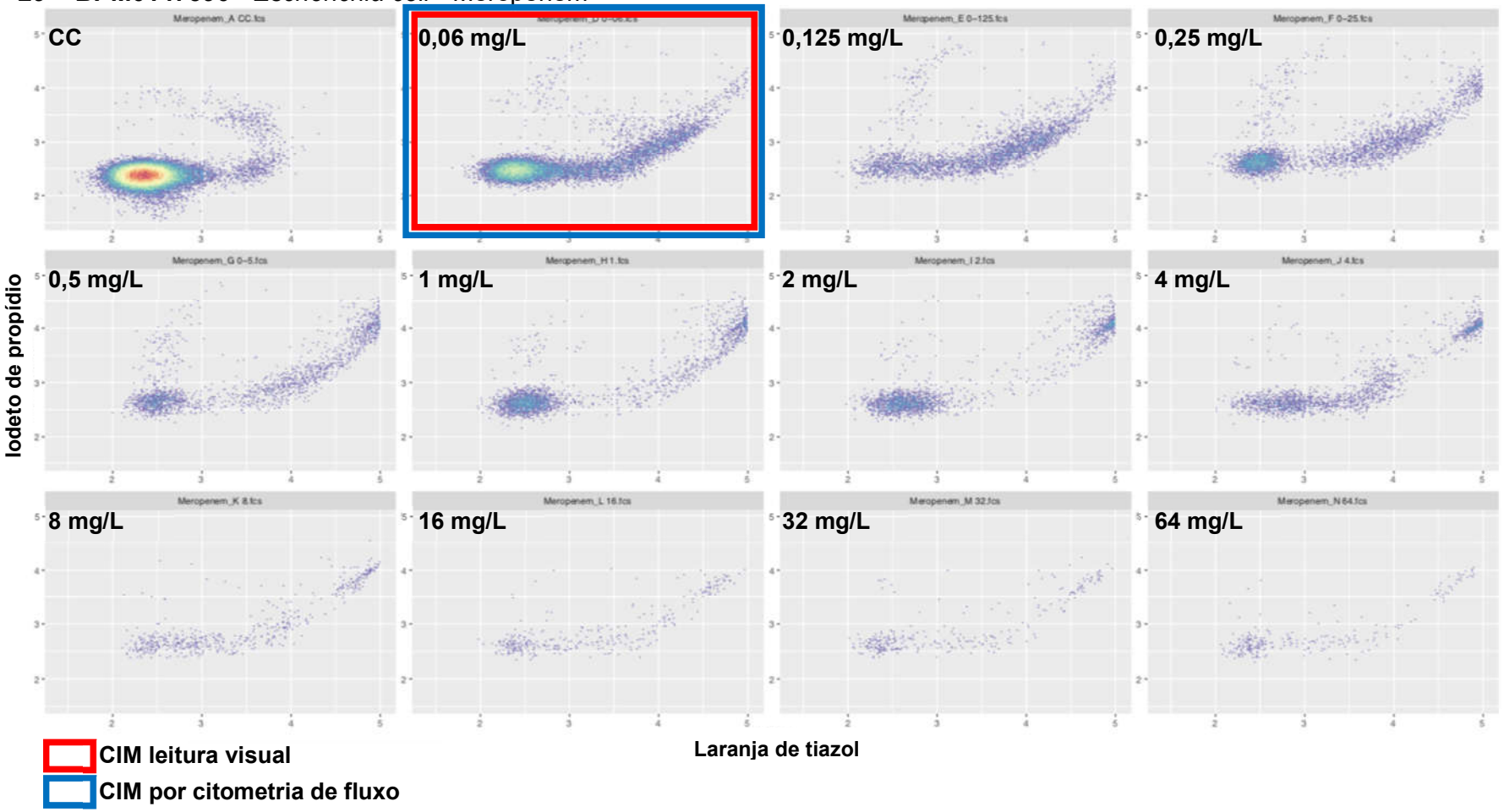
28 – BP0864836 - *Enterobacter cloacae* complex - Polimixina



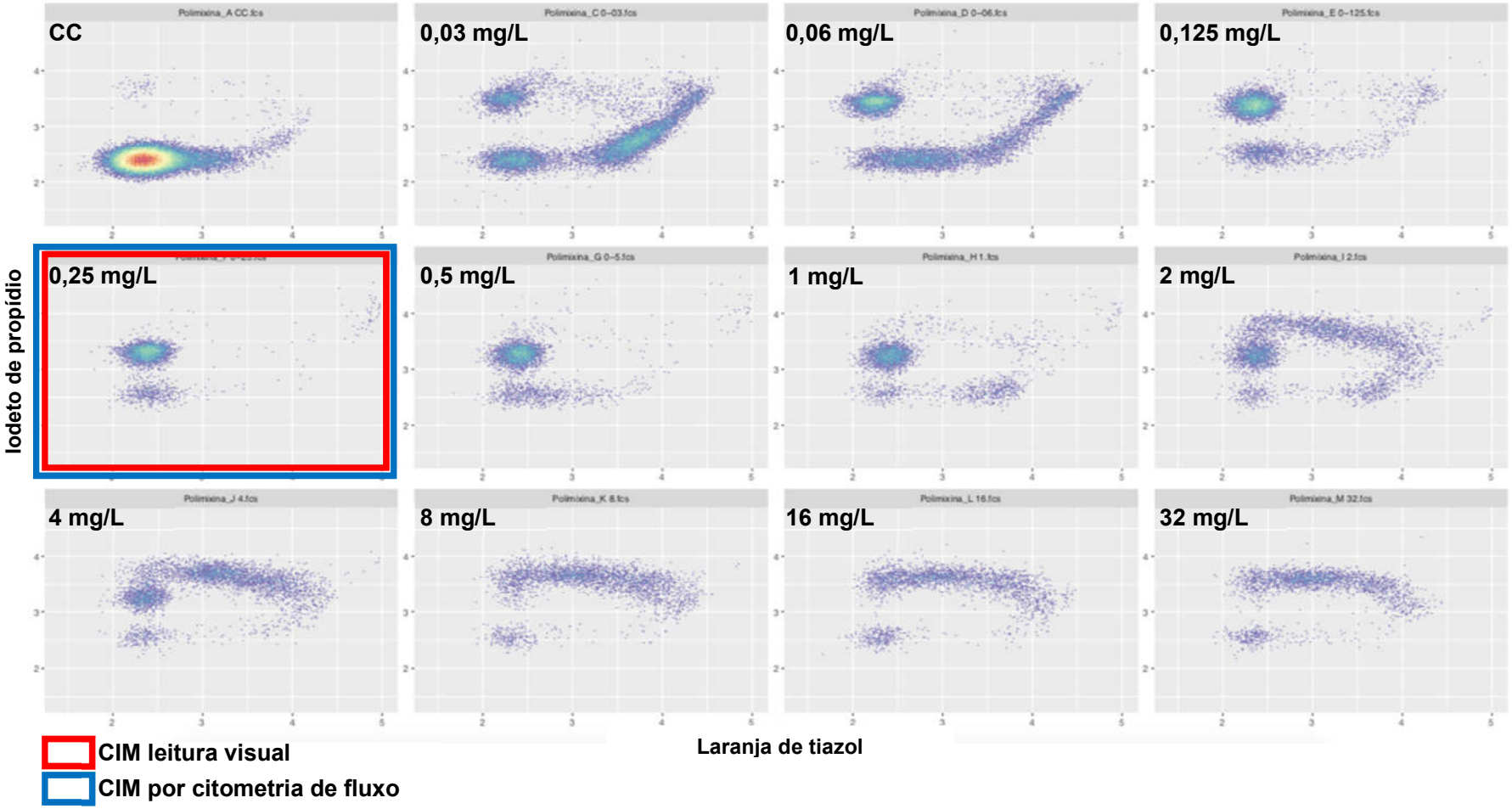
29 – BPM0147590 - *Escherichia coli* - Amicacina



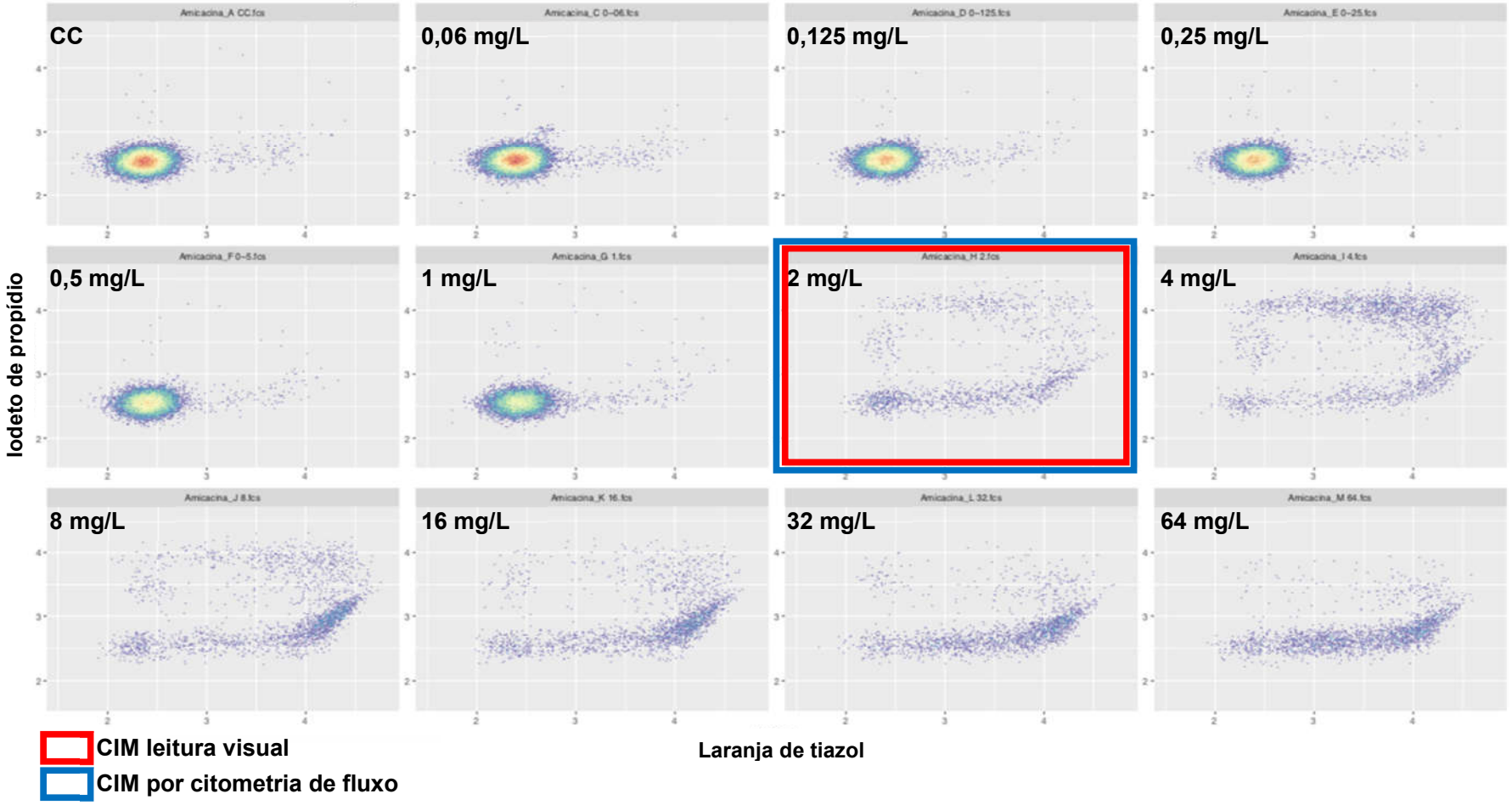
29 – BPM0147590 - *Escherichia coli* - Meropenem



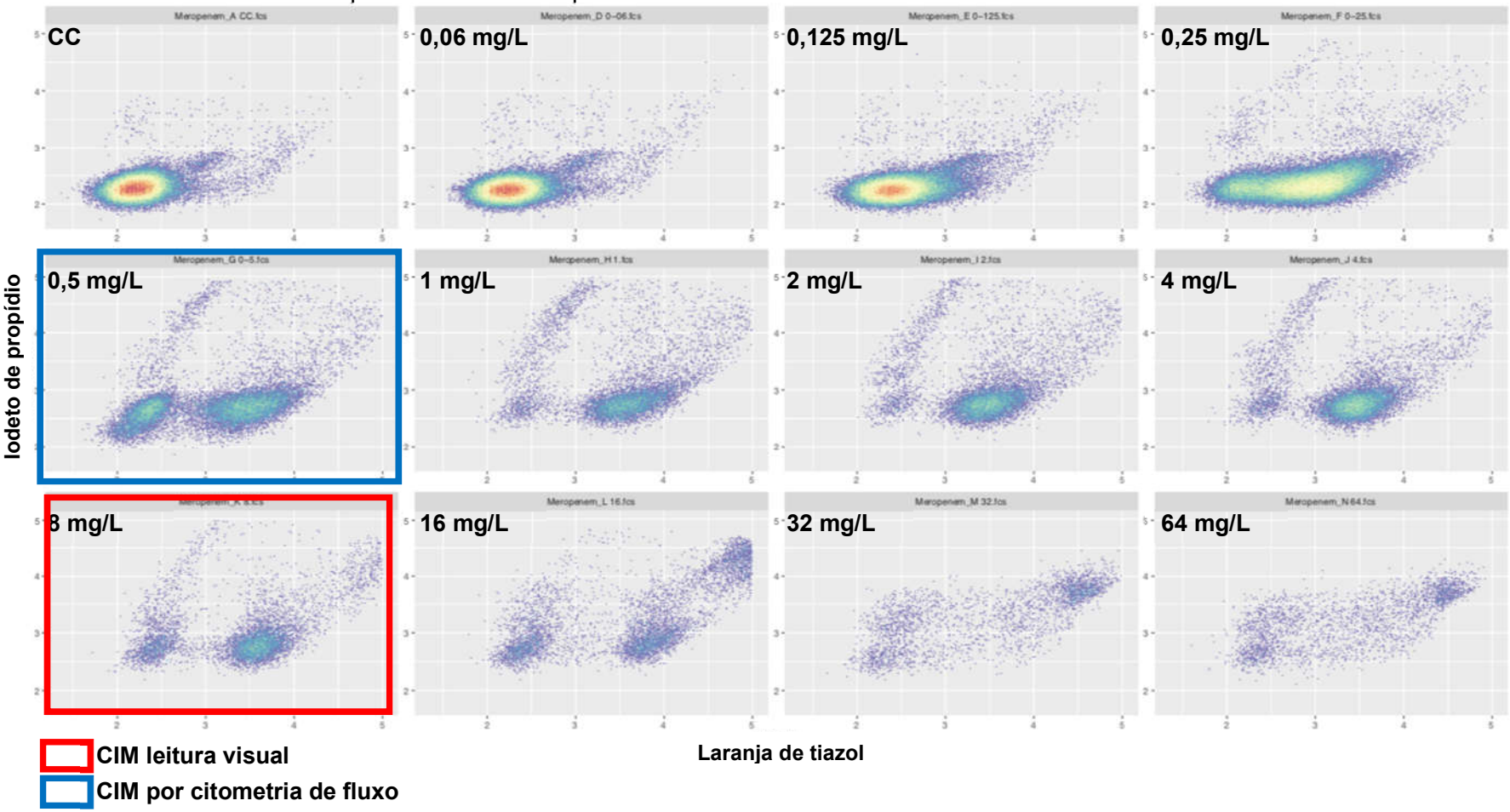
29 – BPM0147590 - *Escherichia coli* - Polimixina



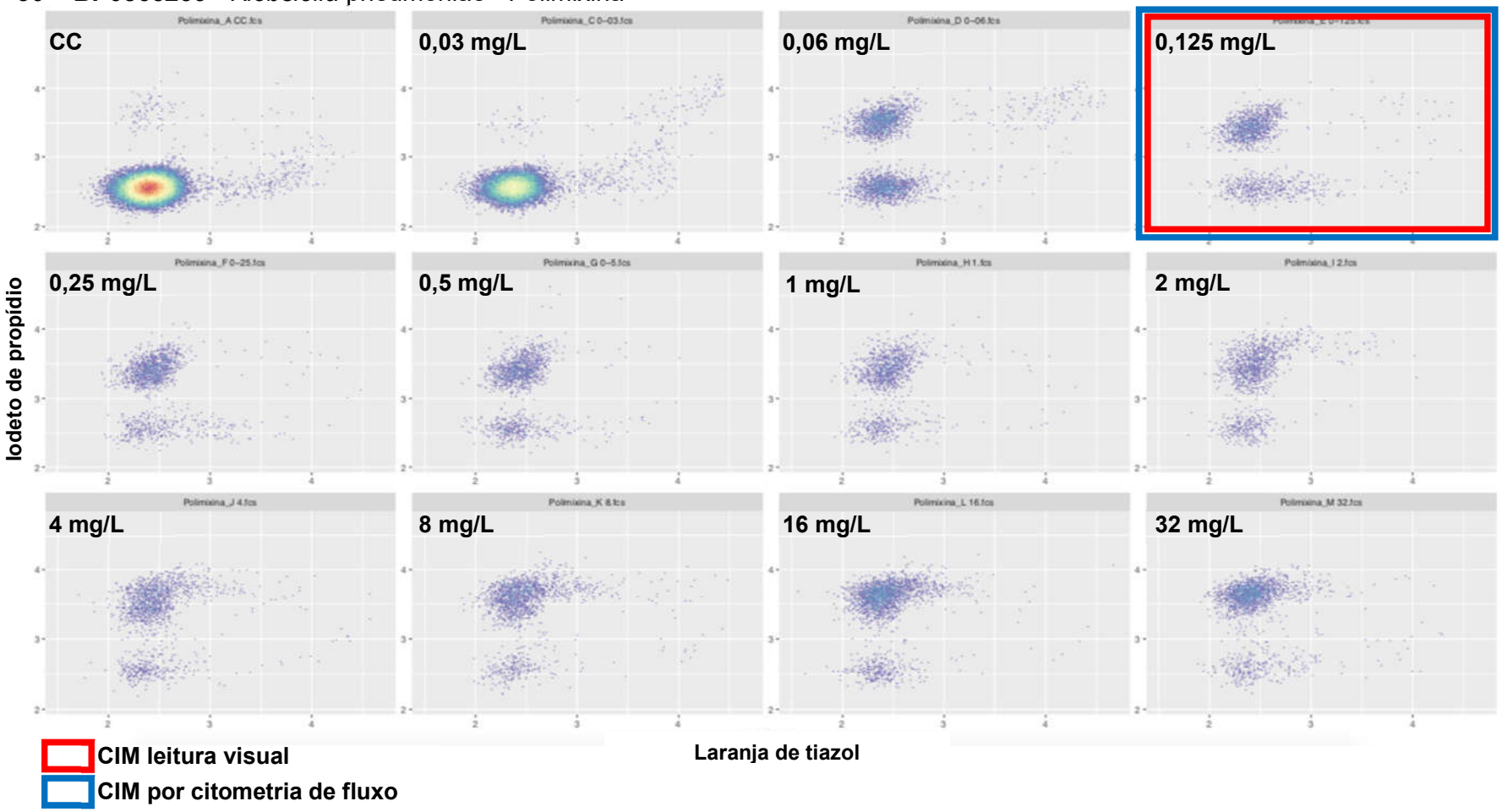
30 – BP0865239 - *Klebsiella* pneumoniae - Amicacina



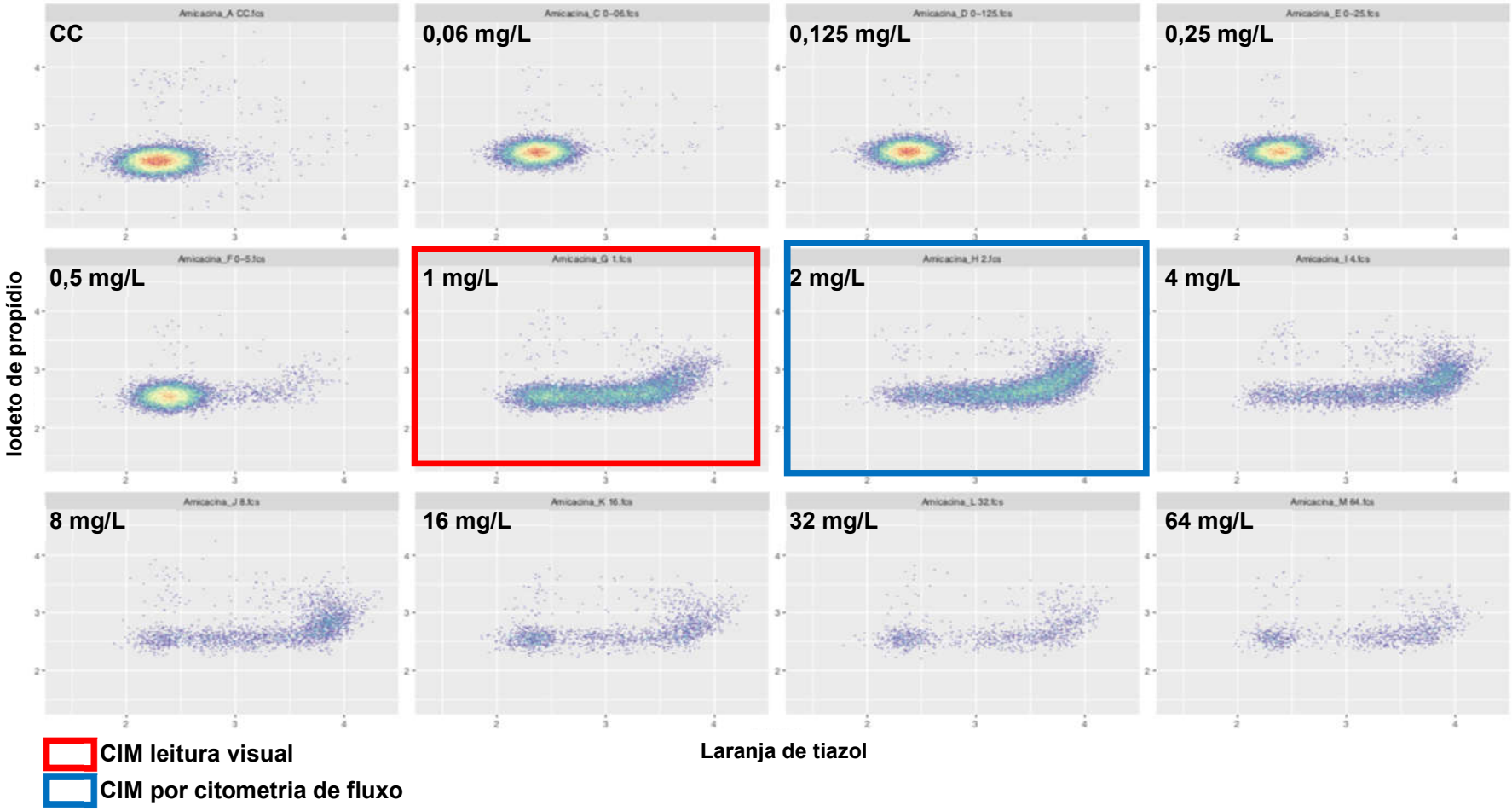
30 – BP0865239 - *Klebsiella* pneumoniae - Meropenem



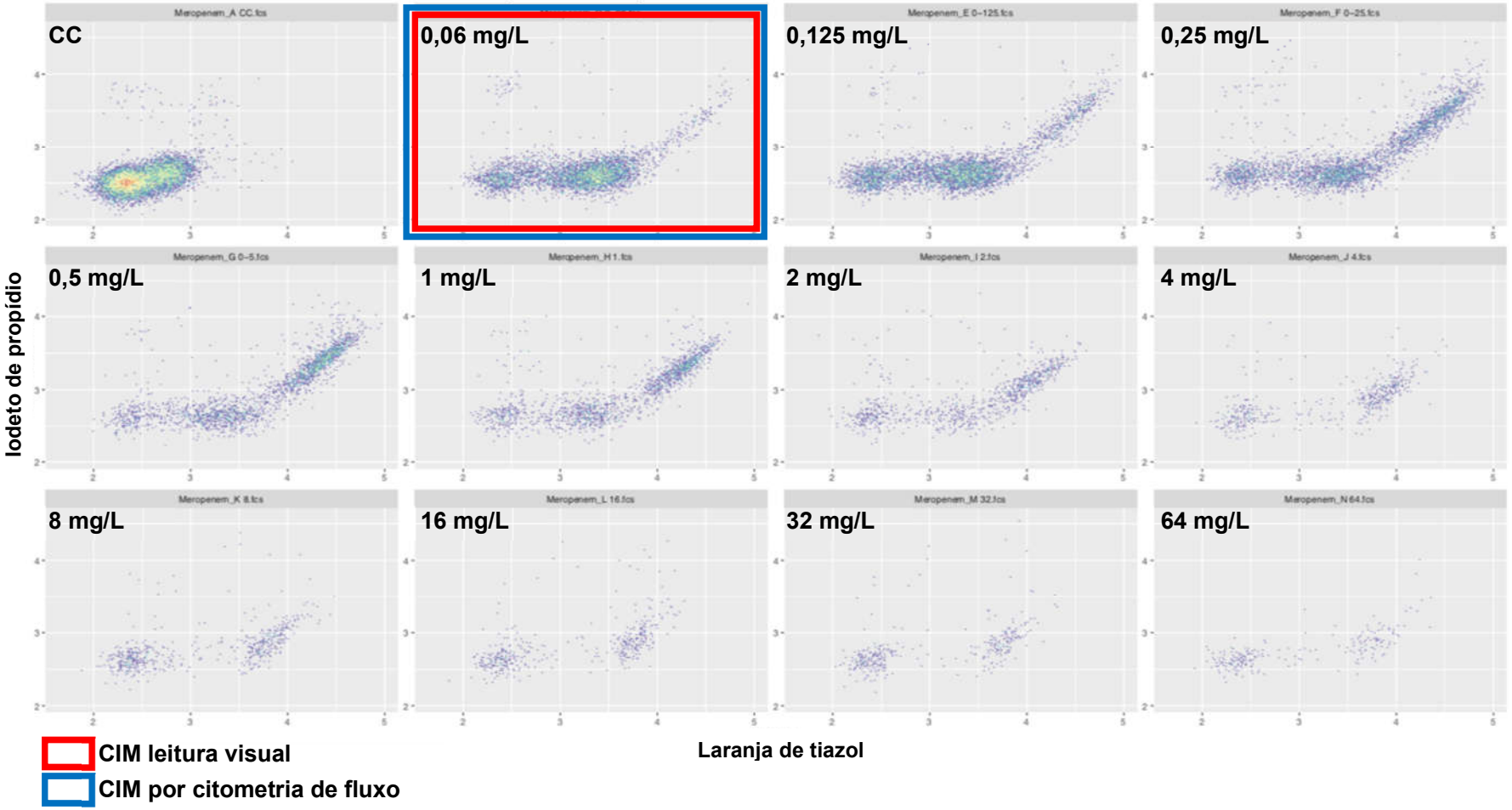
30 – BP0865239 - *Klebsiella* pneumoniae - Polimixina



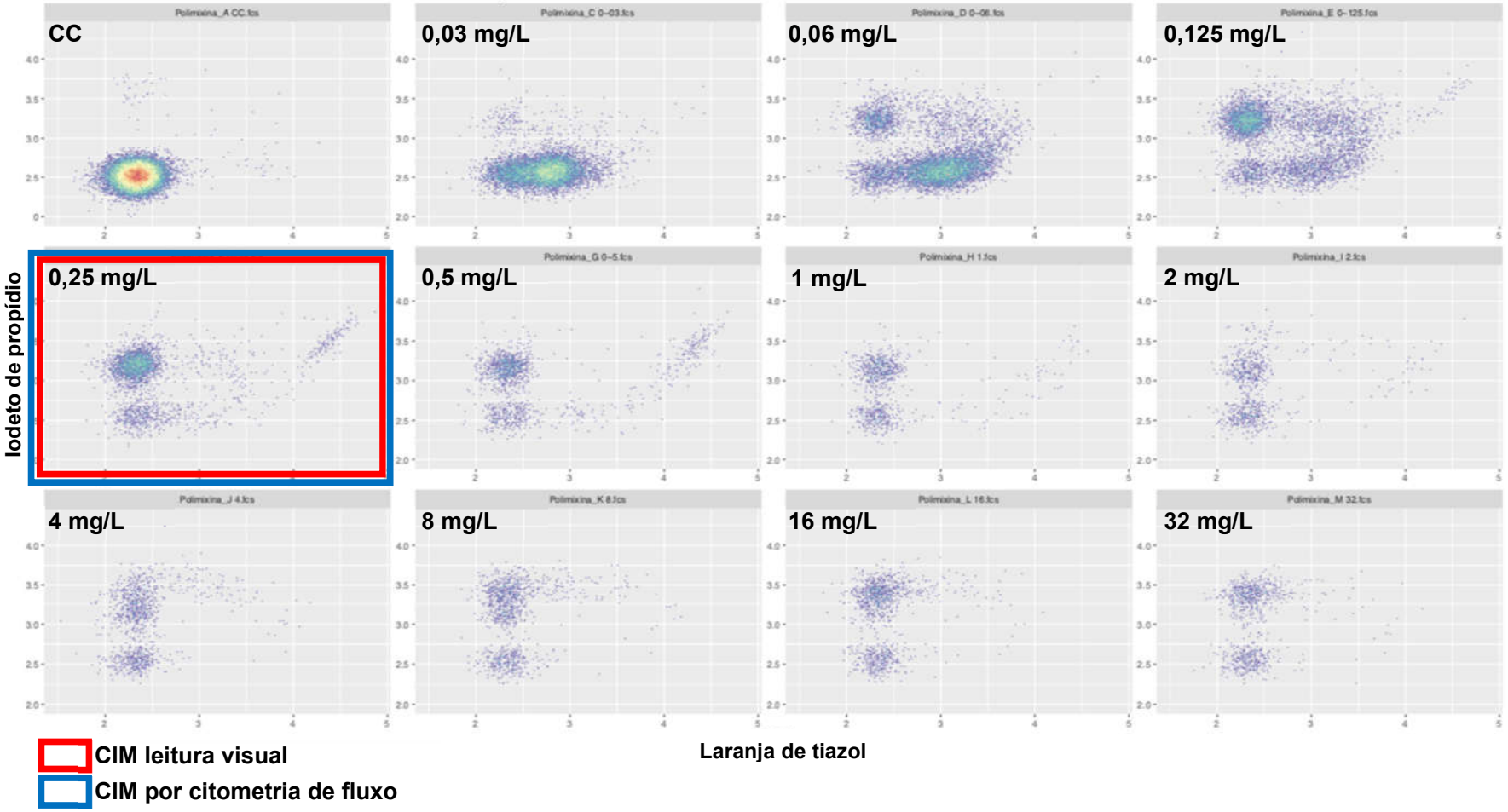
31 – L2270216 - *Enterobacter cloacae complex* - Amicacina



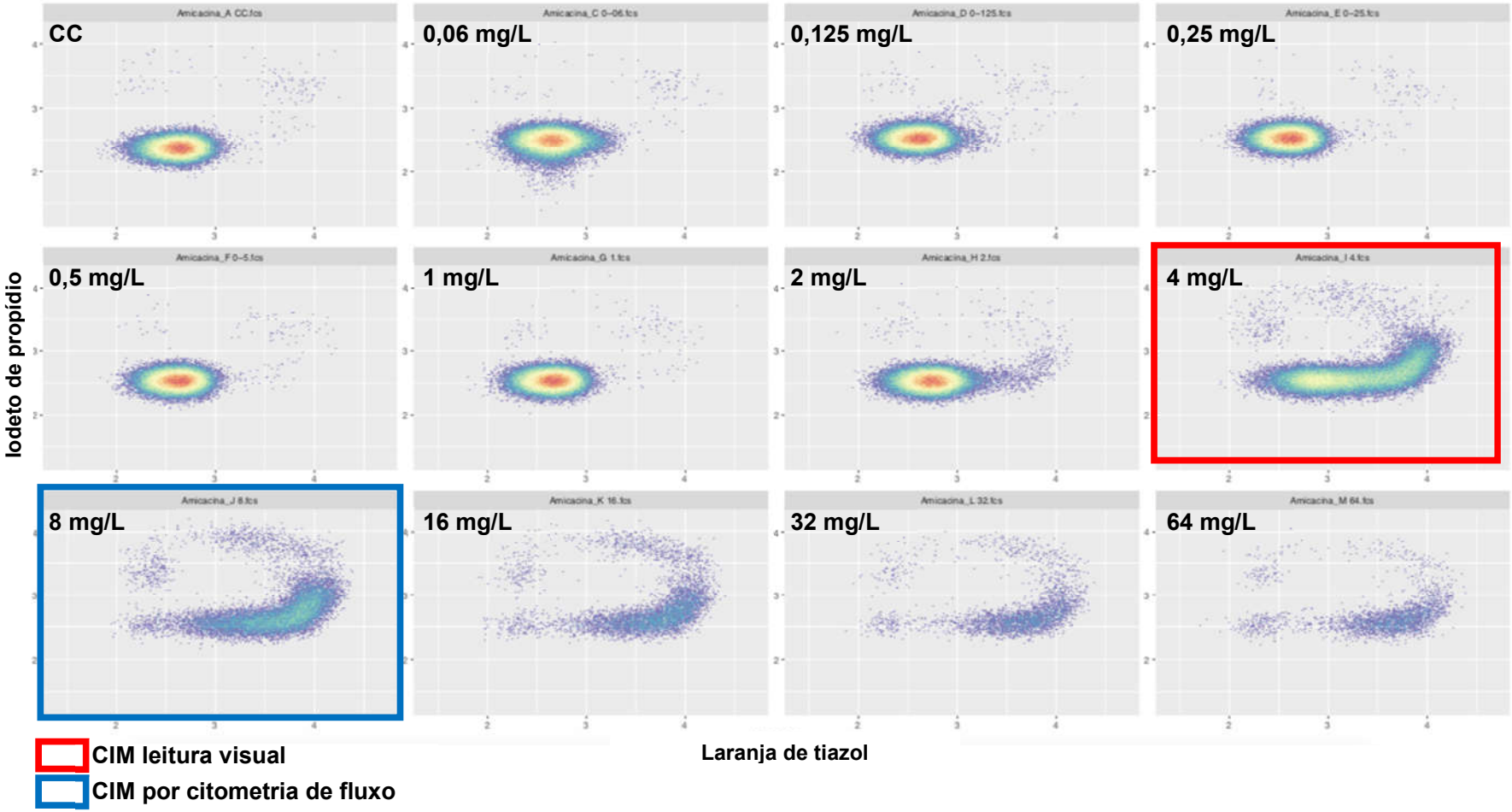
31 – L2270216 - *Enterobacter cloacae complex* - Meropenem



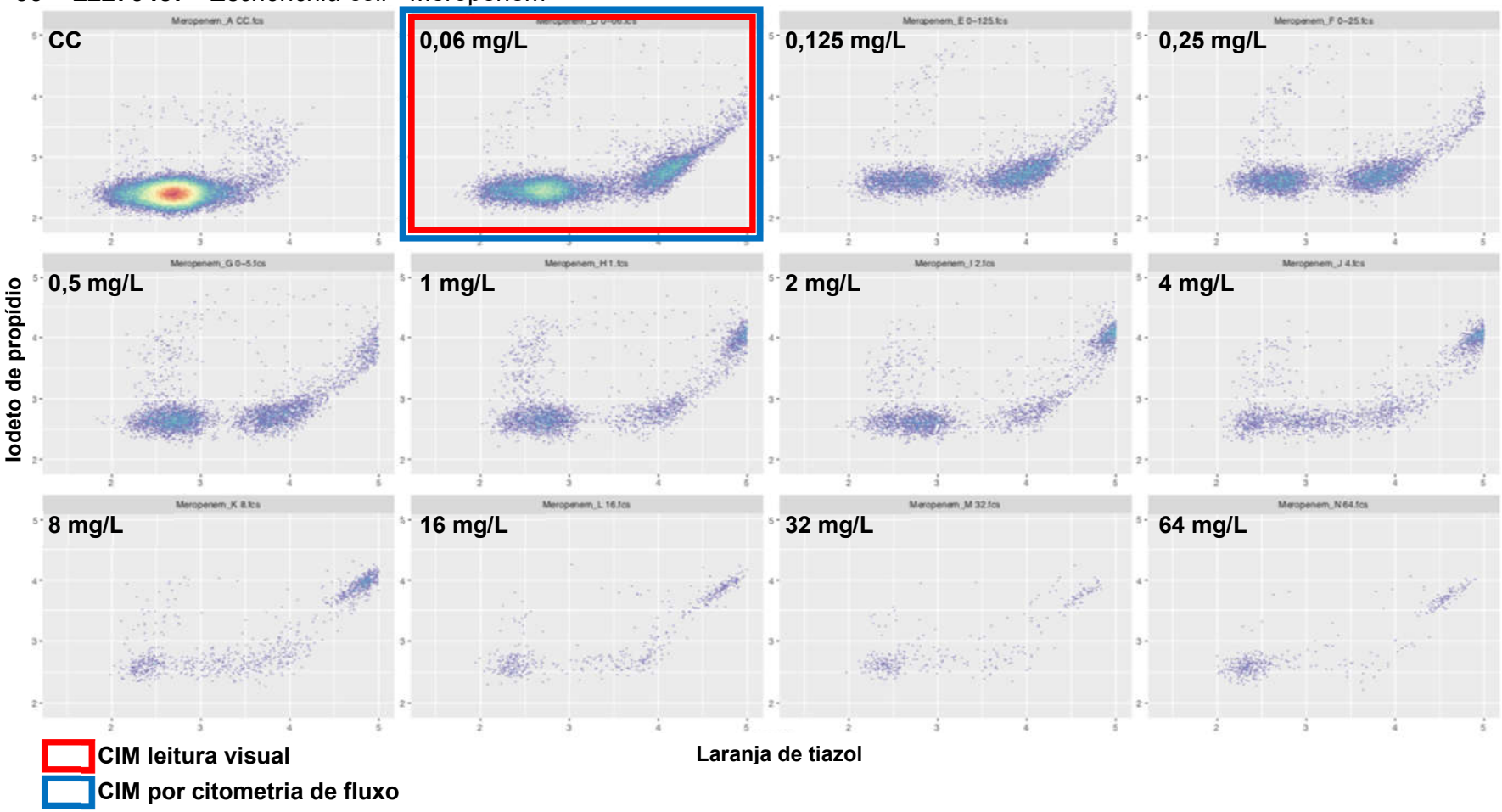
31 – L2270216 - *Enterobacter cloacae complex* - Polimixina



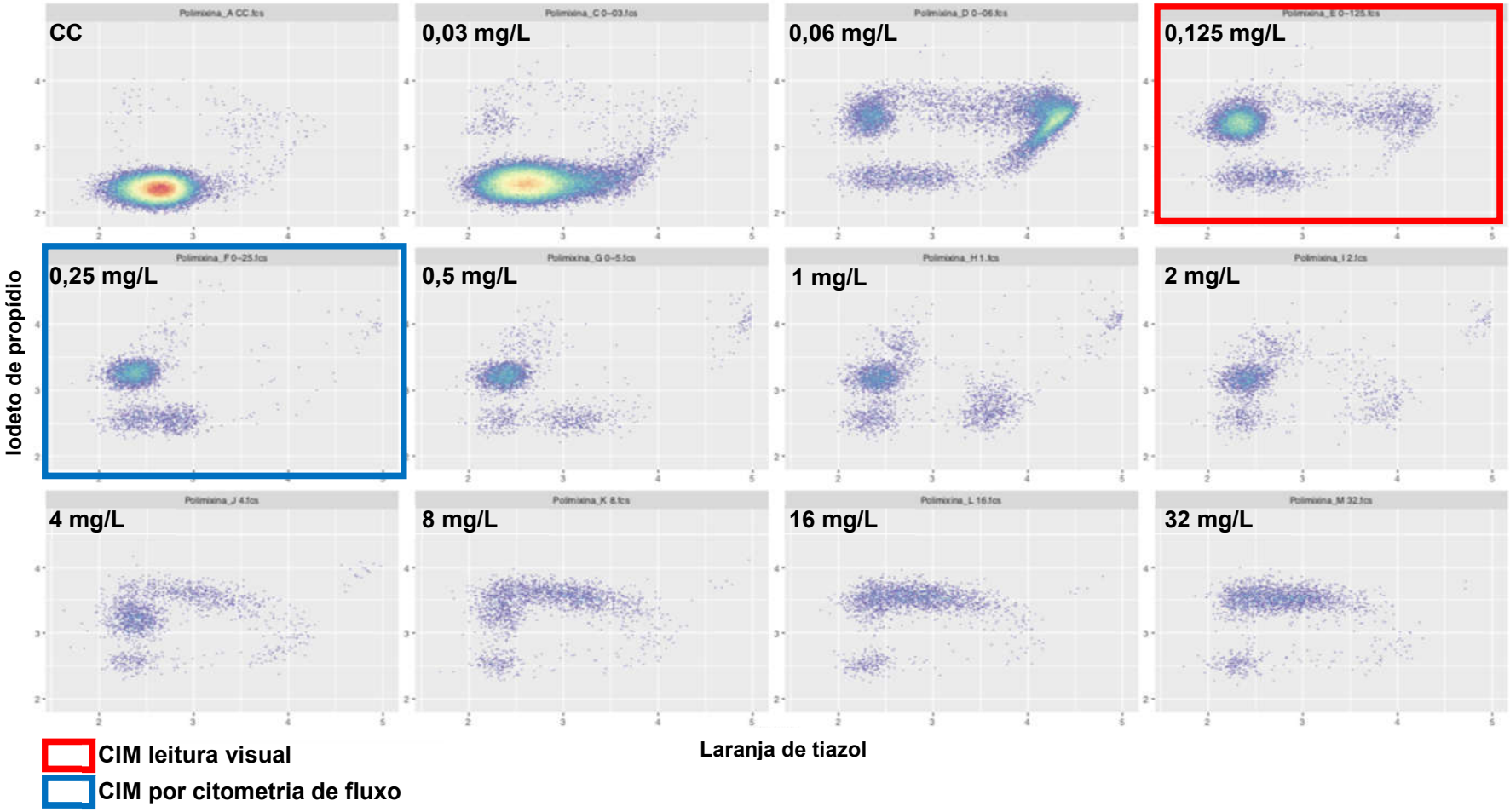
33 – L2273487 - *Escherichia* coli - Amicacina



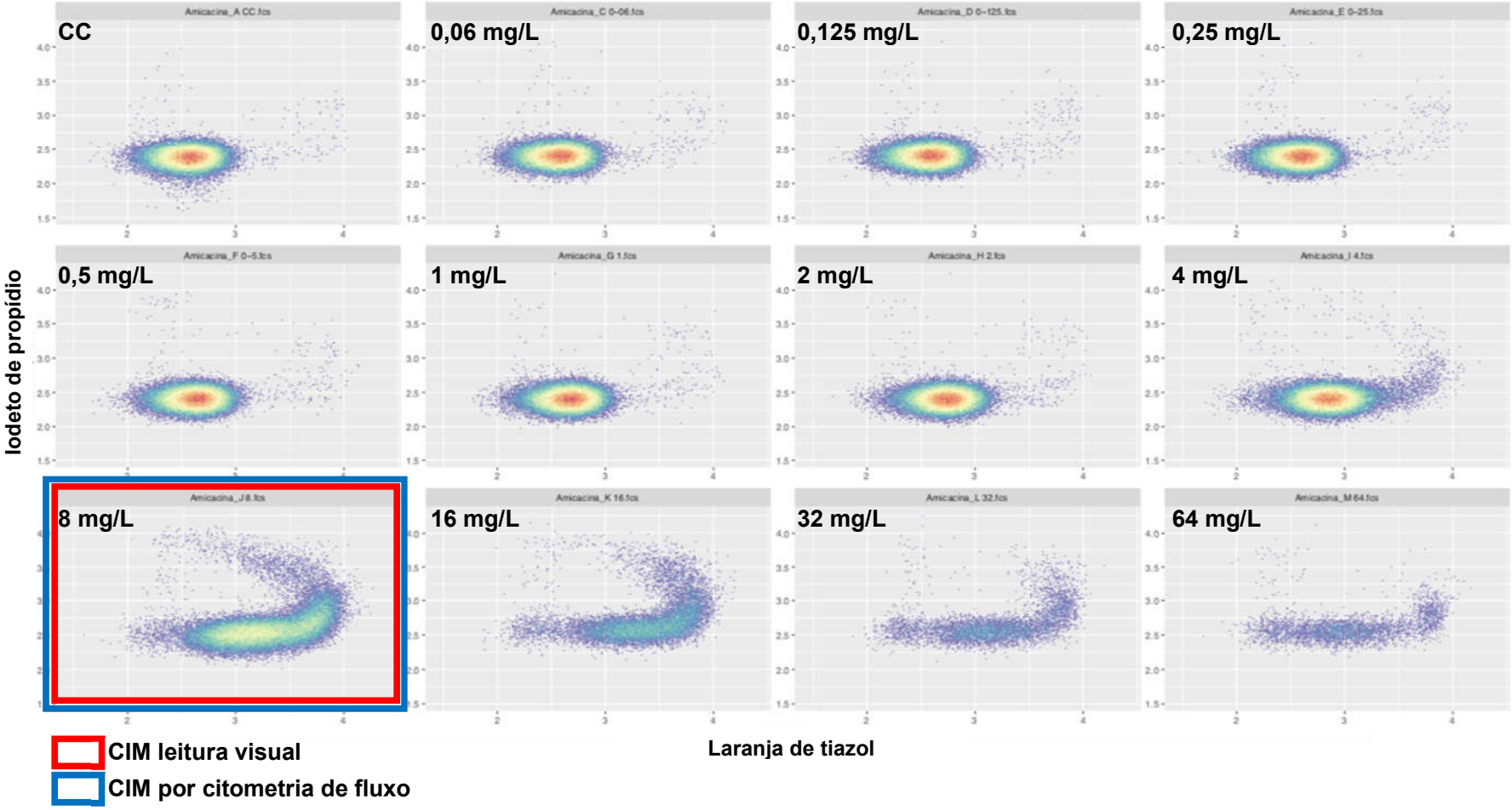
33 – L2273487 - *Escherichia* coli - Meropenem



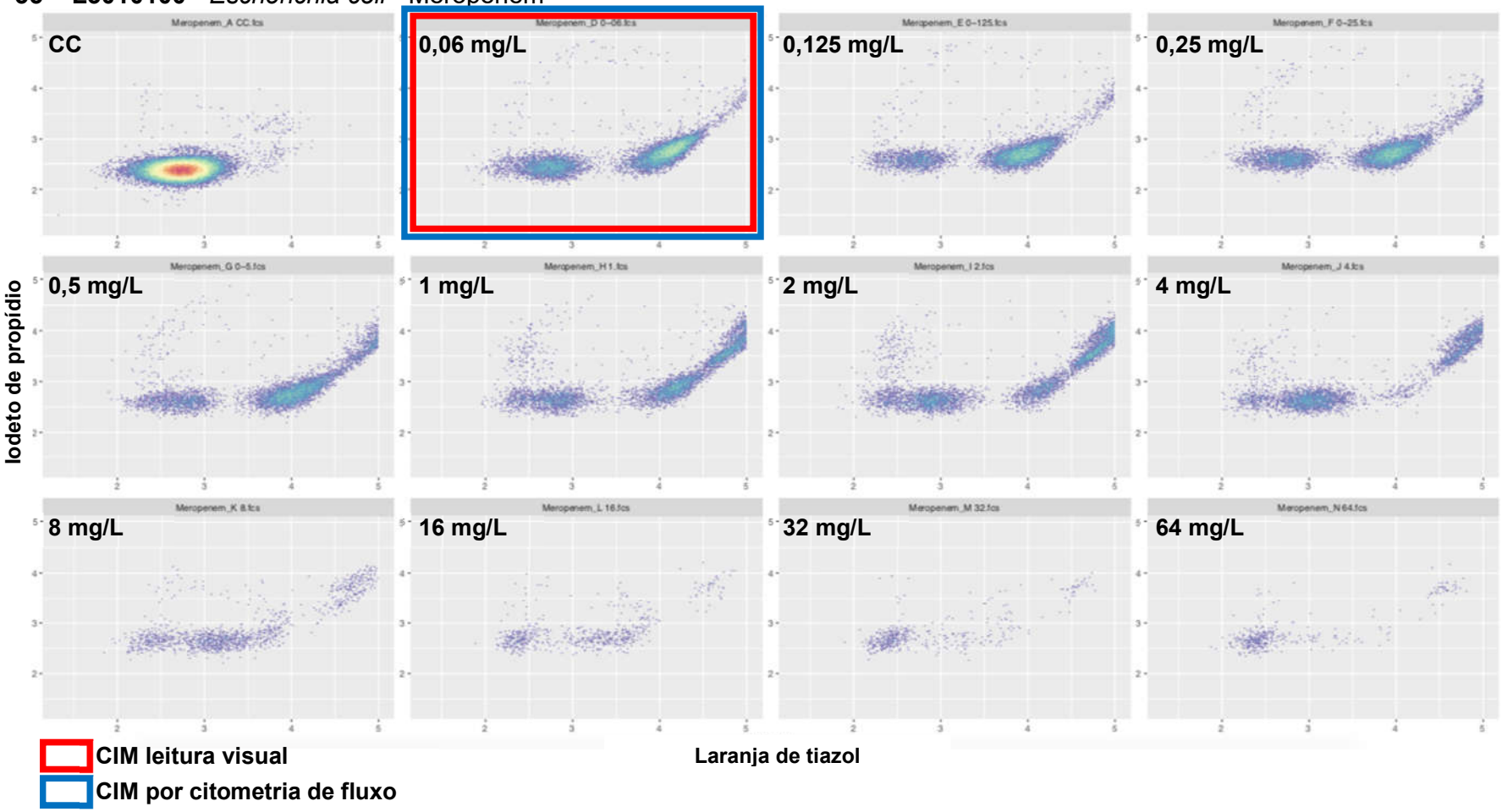
33 – L2273487 - *Escherichia* coli - Polimixina



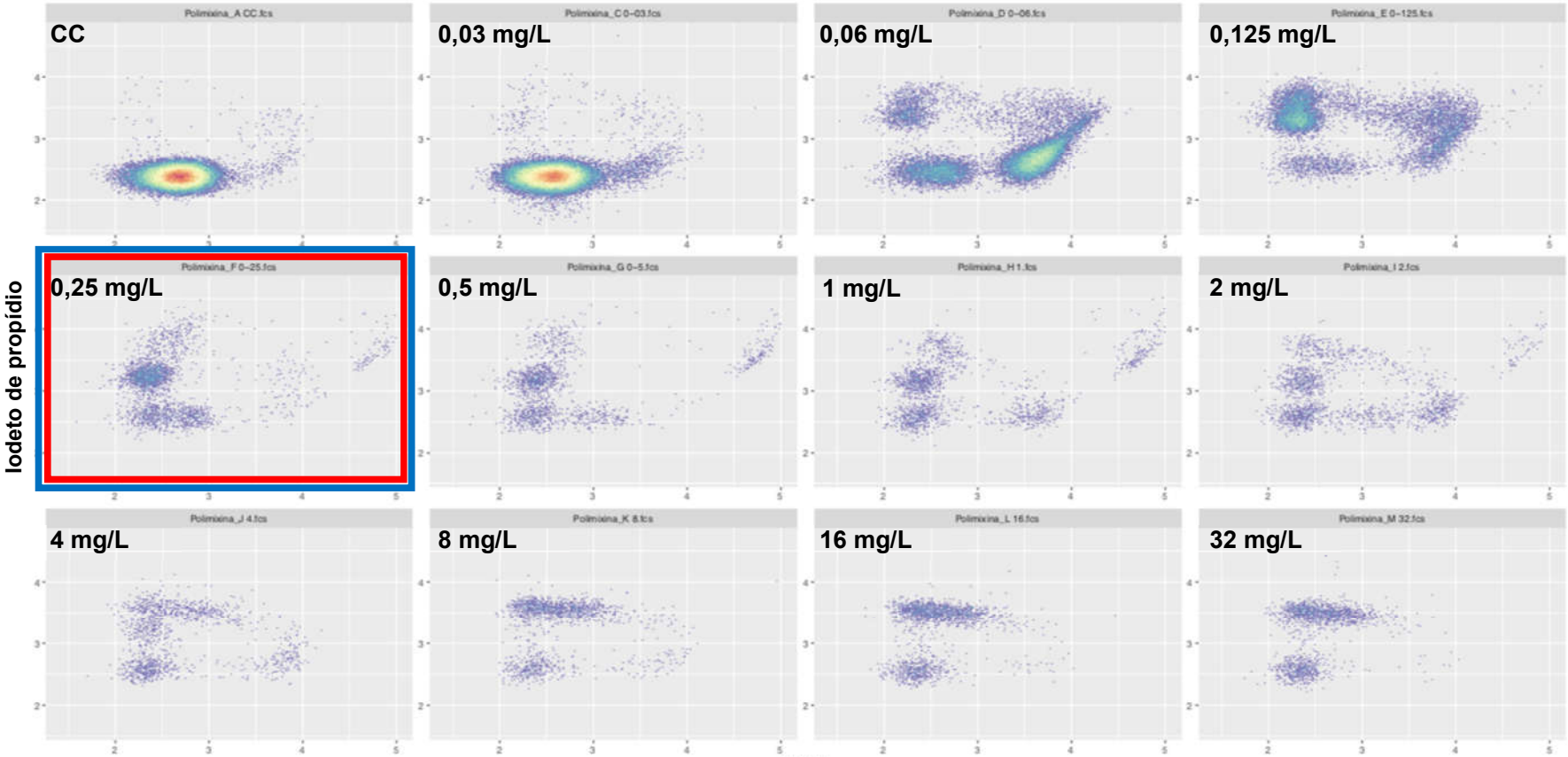
35 – L3010100 - *Escherichia coli* - Amicacina



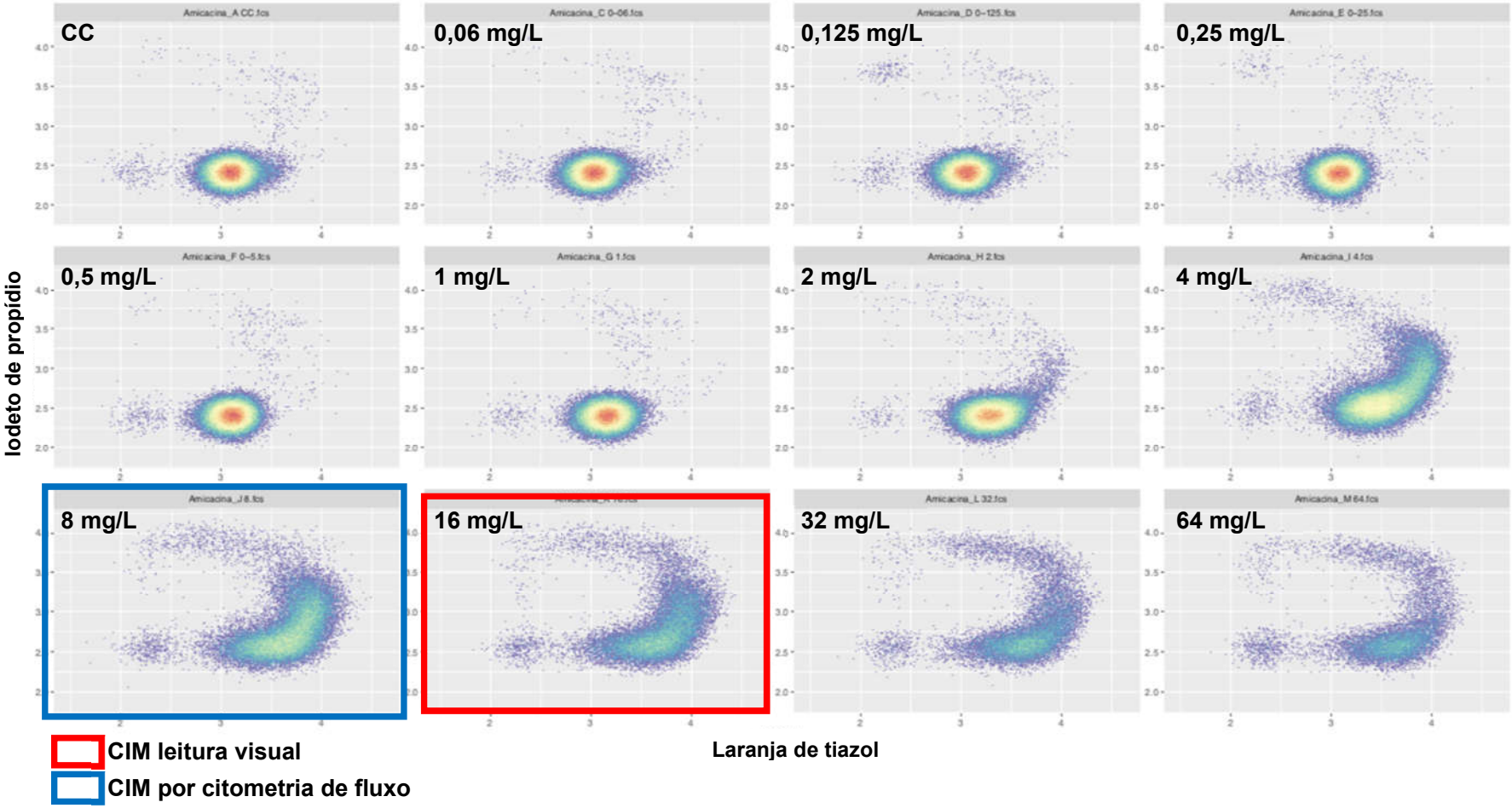
35 – L3010100 - *Escherichia coli* - Meropenem



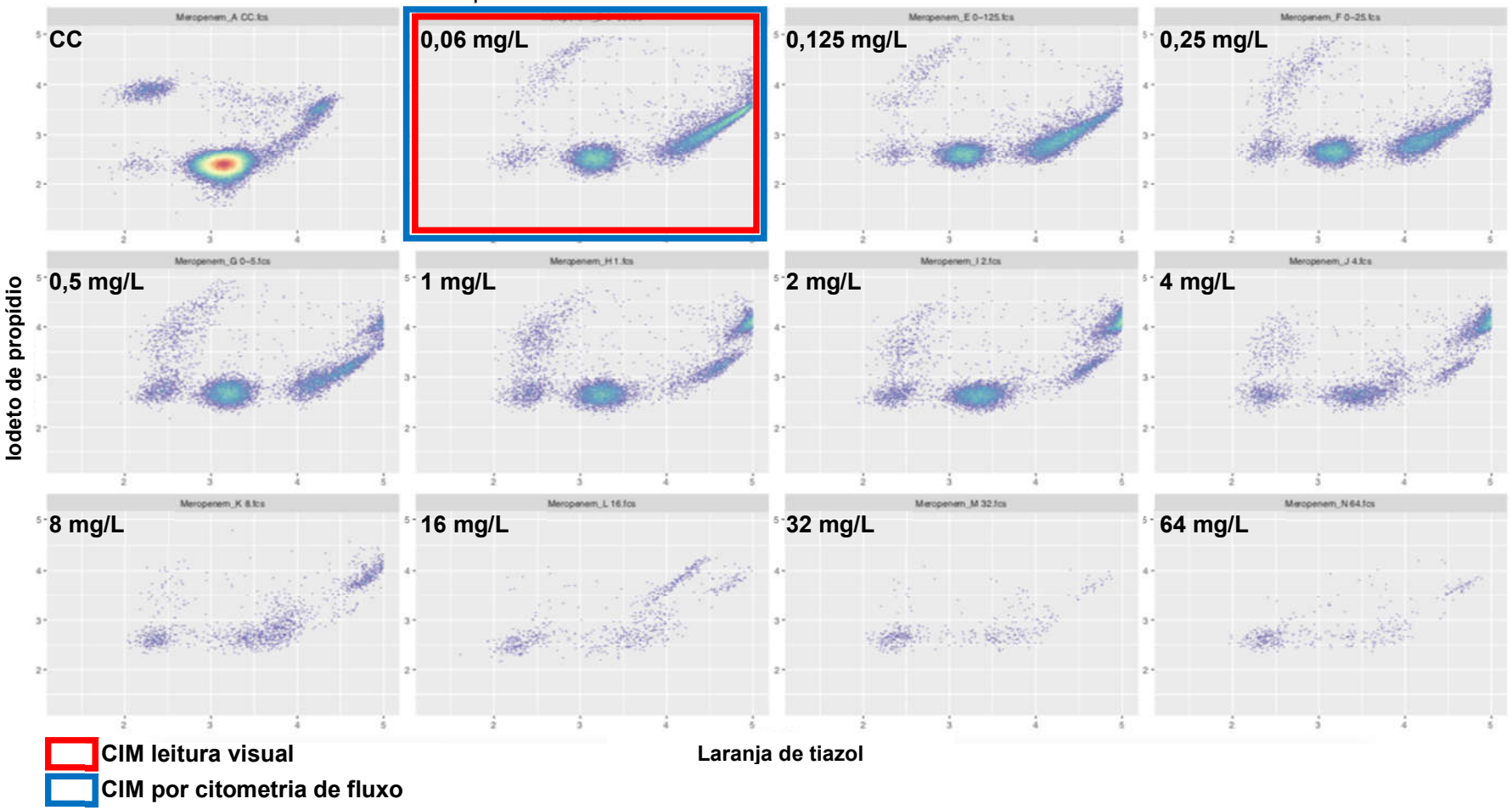
35 – L3010100 - *Escherichia coli* - Polimixina



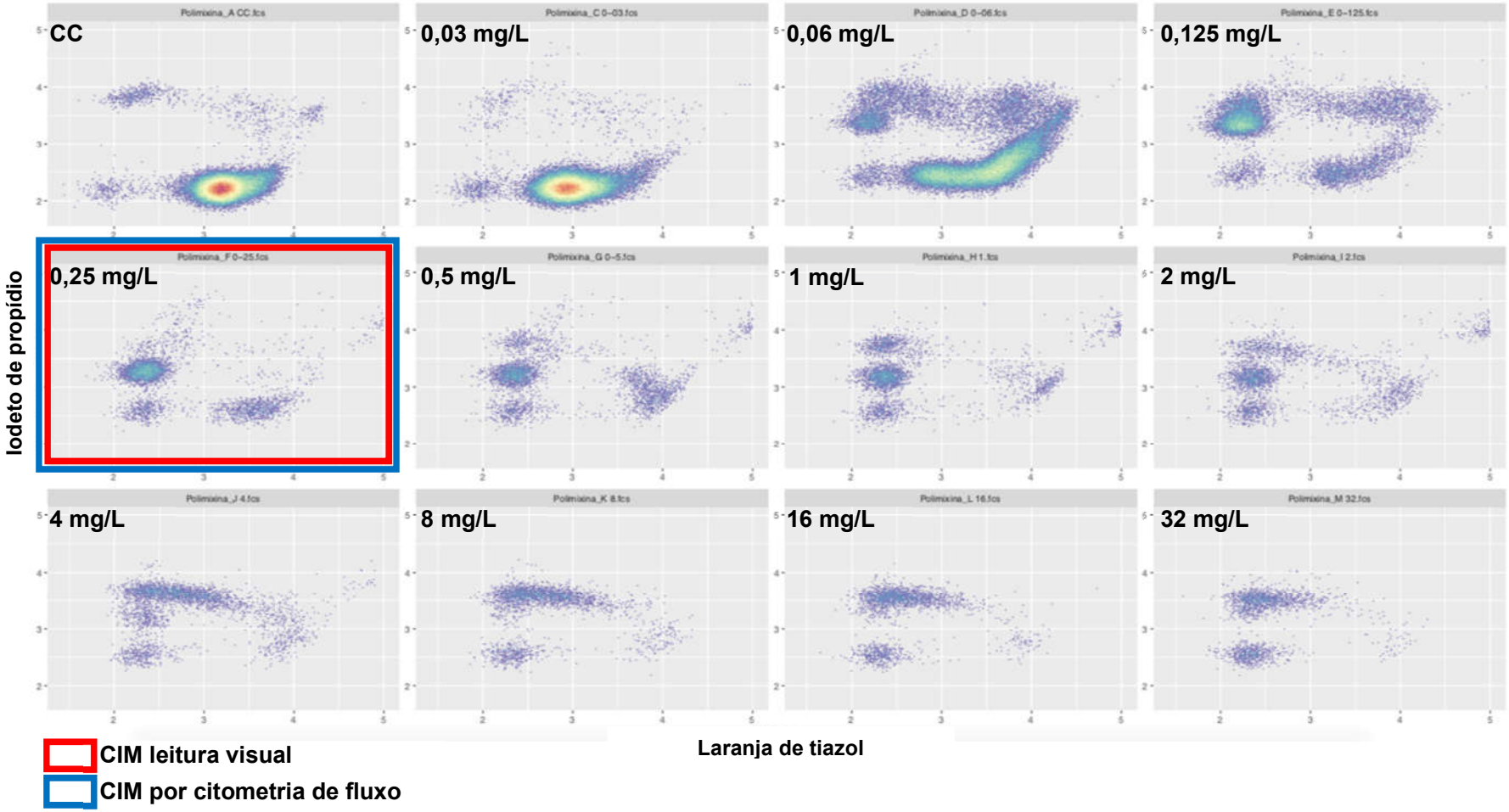
36 – L3010142 - *Escherichia* coli - Amicacina



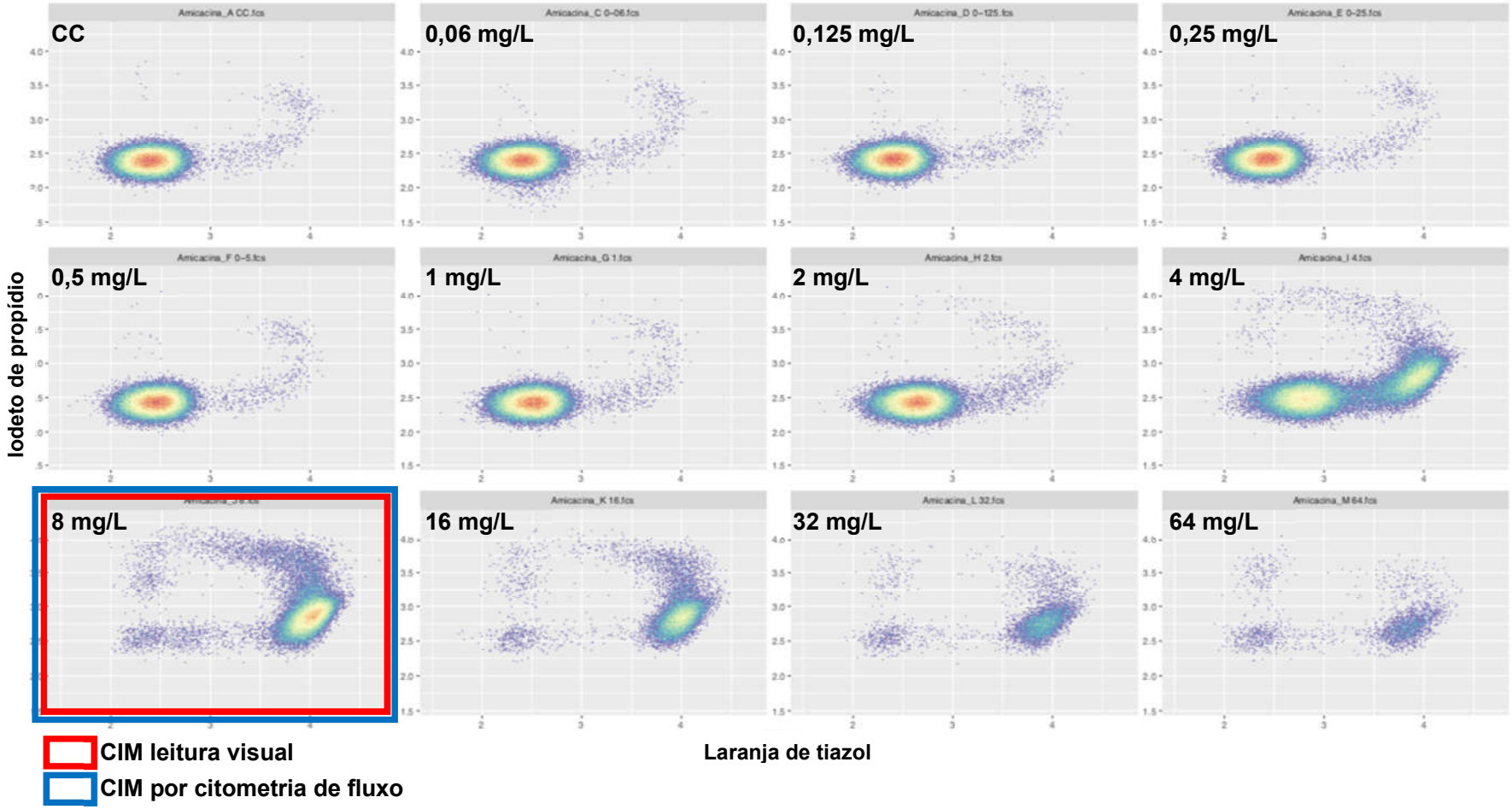
36 – L3010142 - *Escherichia* coli - Meropenem



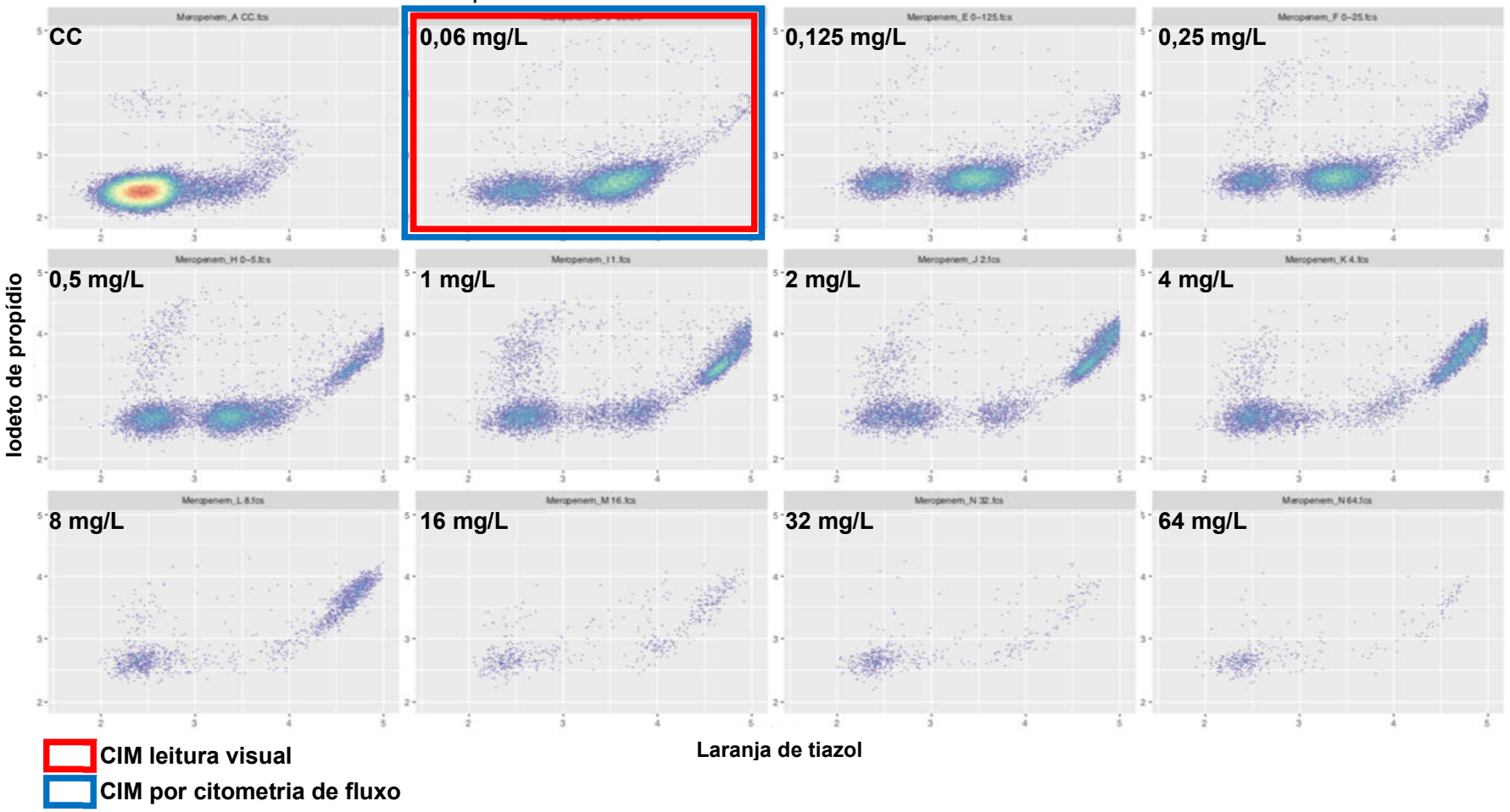
36 – L3010142 - *Escherichia* coli - Polimixina



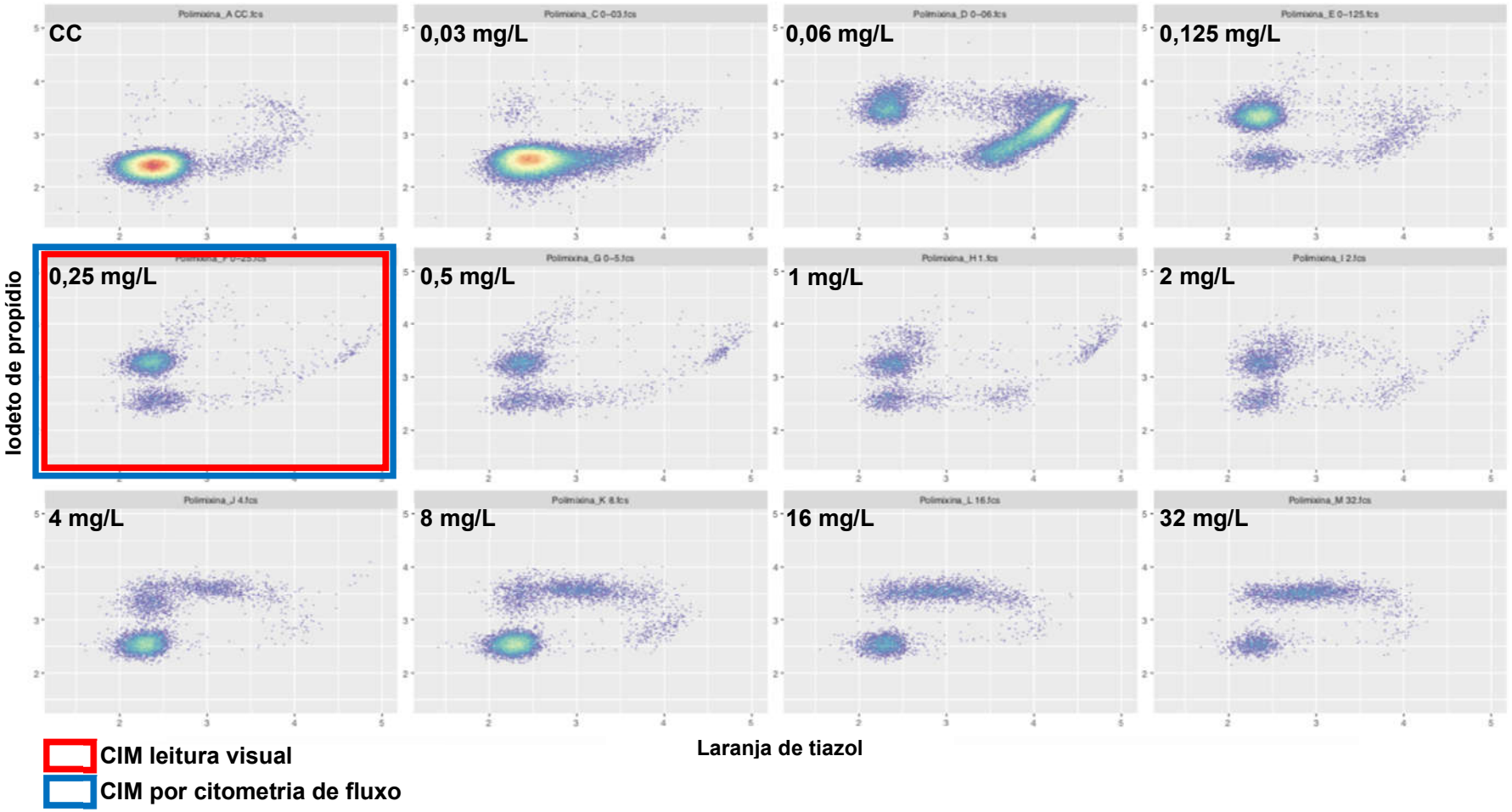
37 – L3010014 - *Escherichia coli* - Amicacina



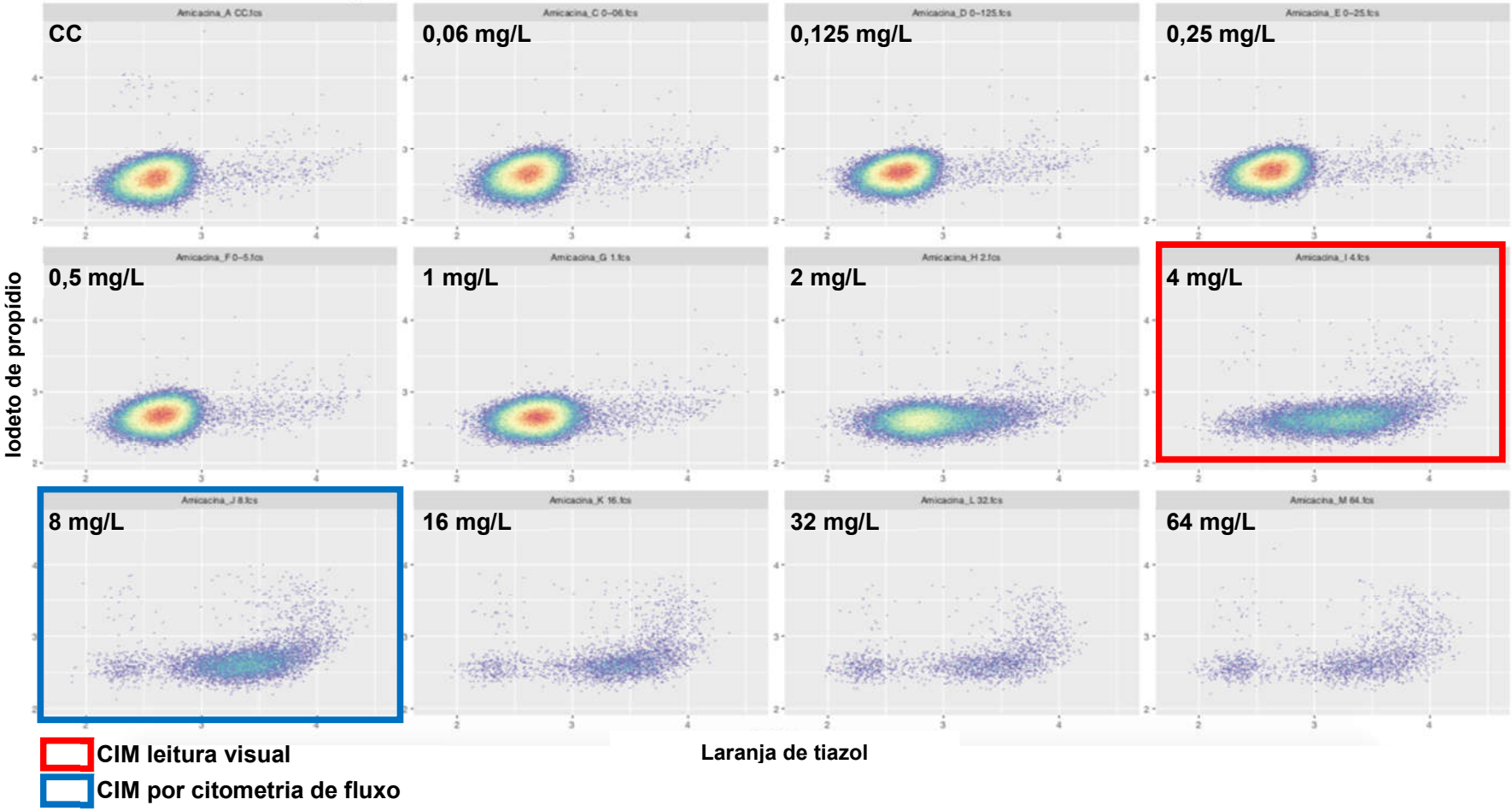
37 – L3010014 - *Escherichia coli* - Meropenem



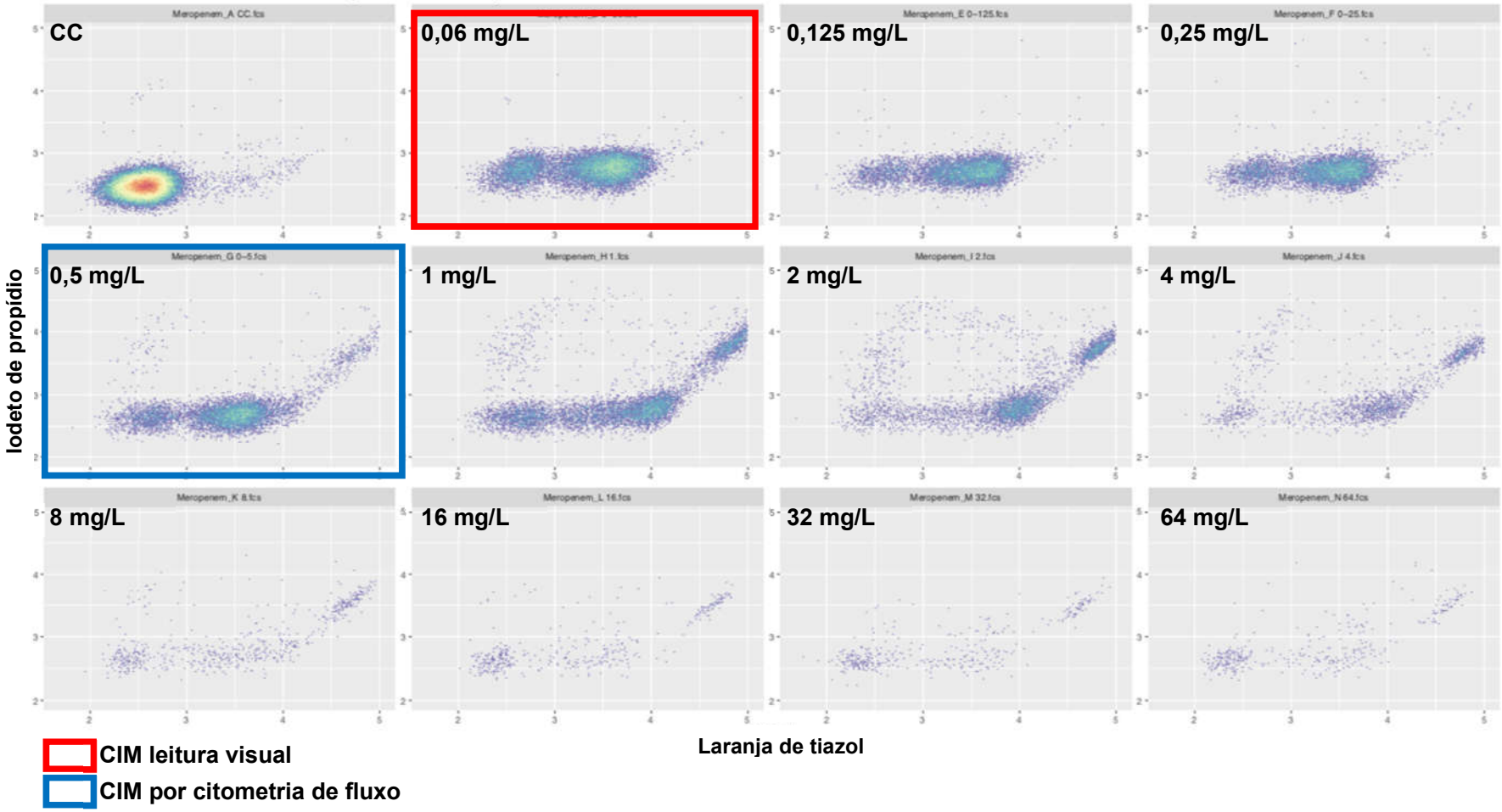
37 – L3010014 - *Escherichia coli* - Polimixina



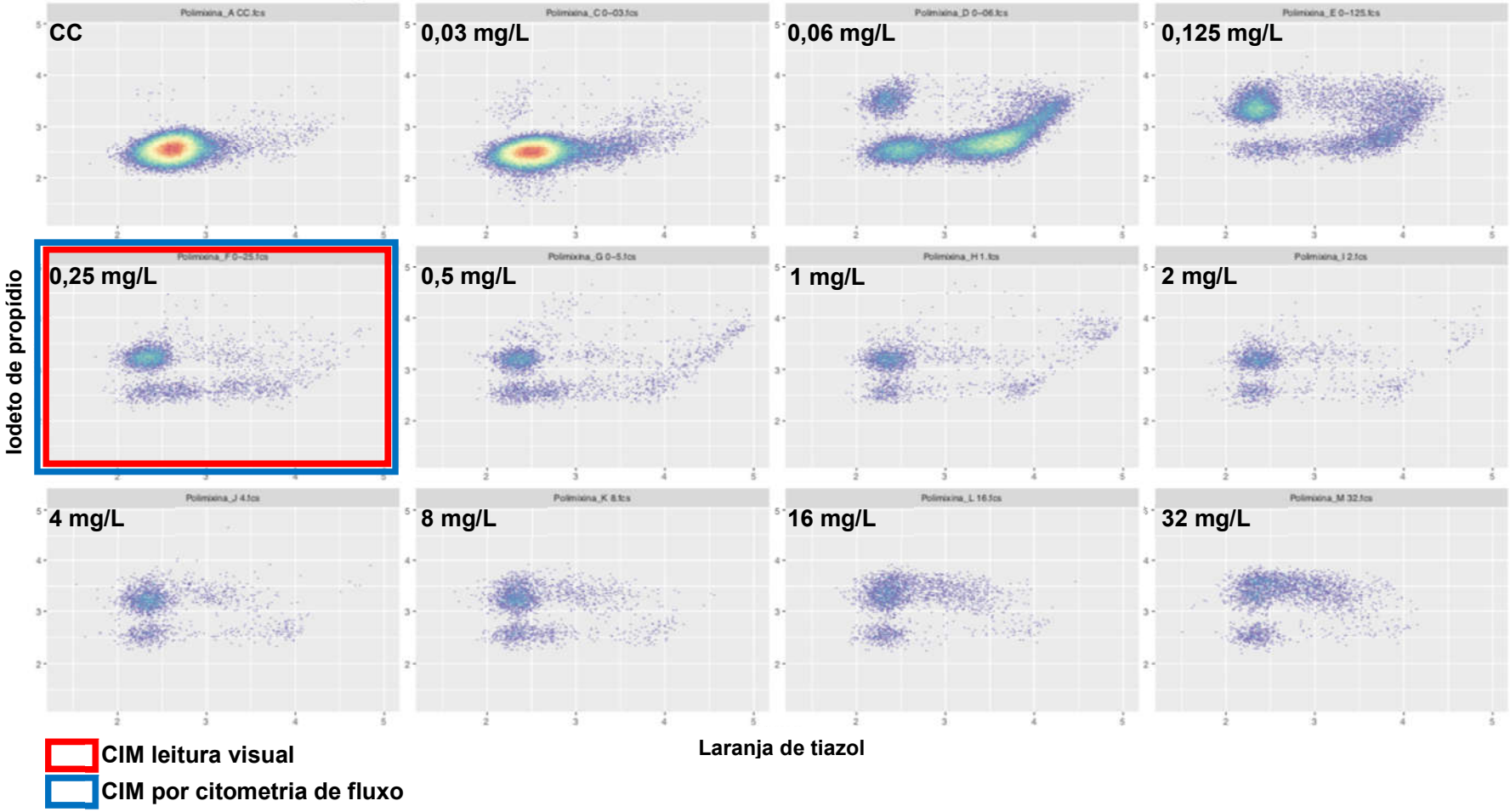
38 – L2280193 - *Klebsiella oxytoca* - Amicacina



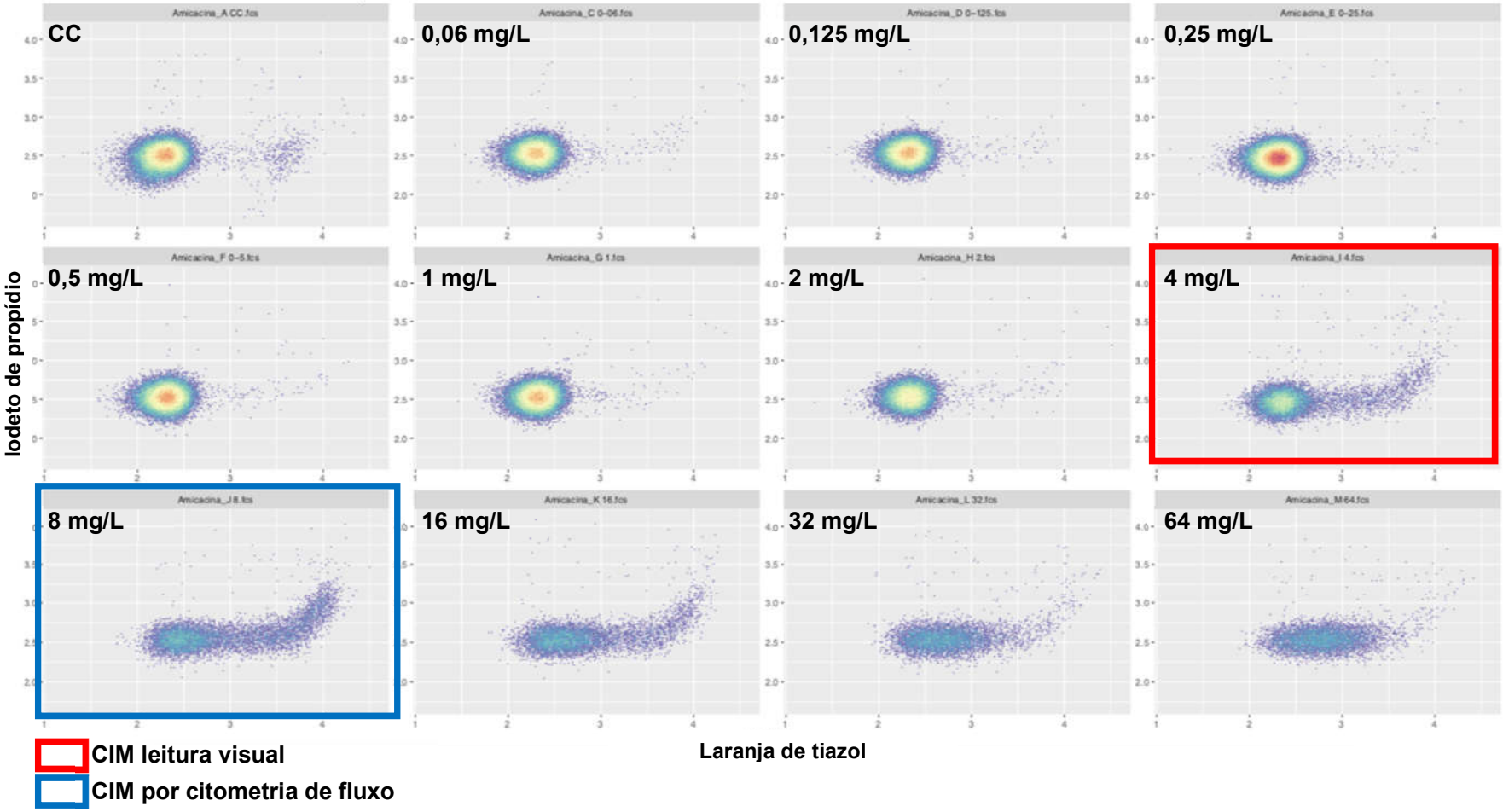
38 – L2280193 - *Klebsiella oxytoca* - Meropenem



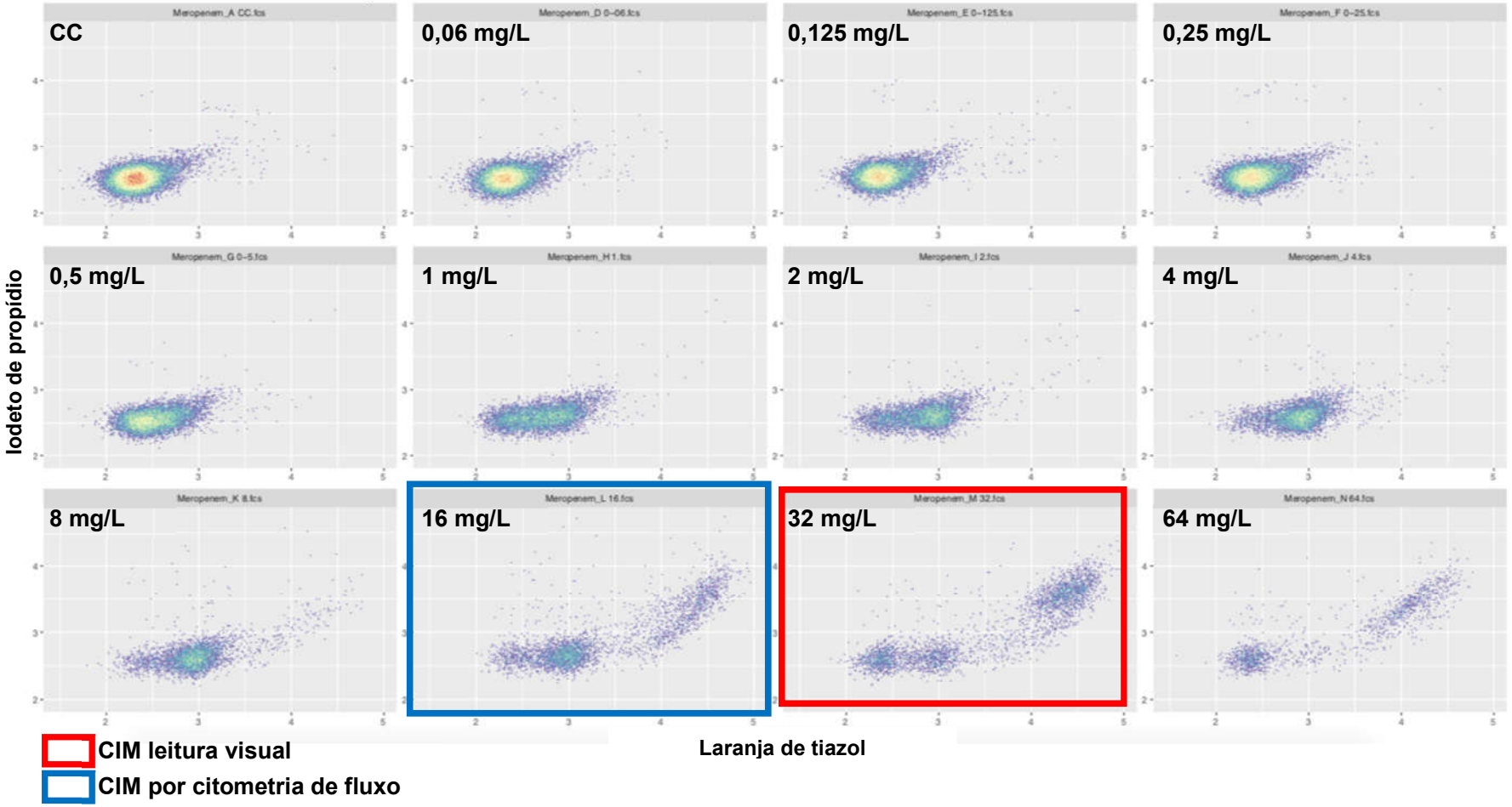
38 – L2280193 - *Klebsiella oxytoca* - Polimixina



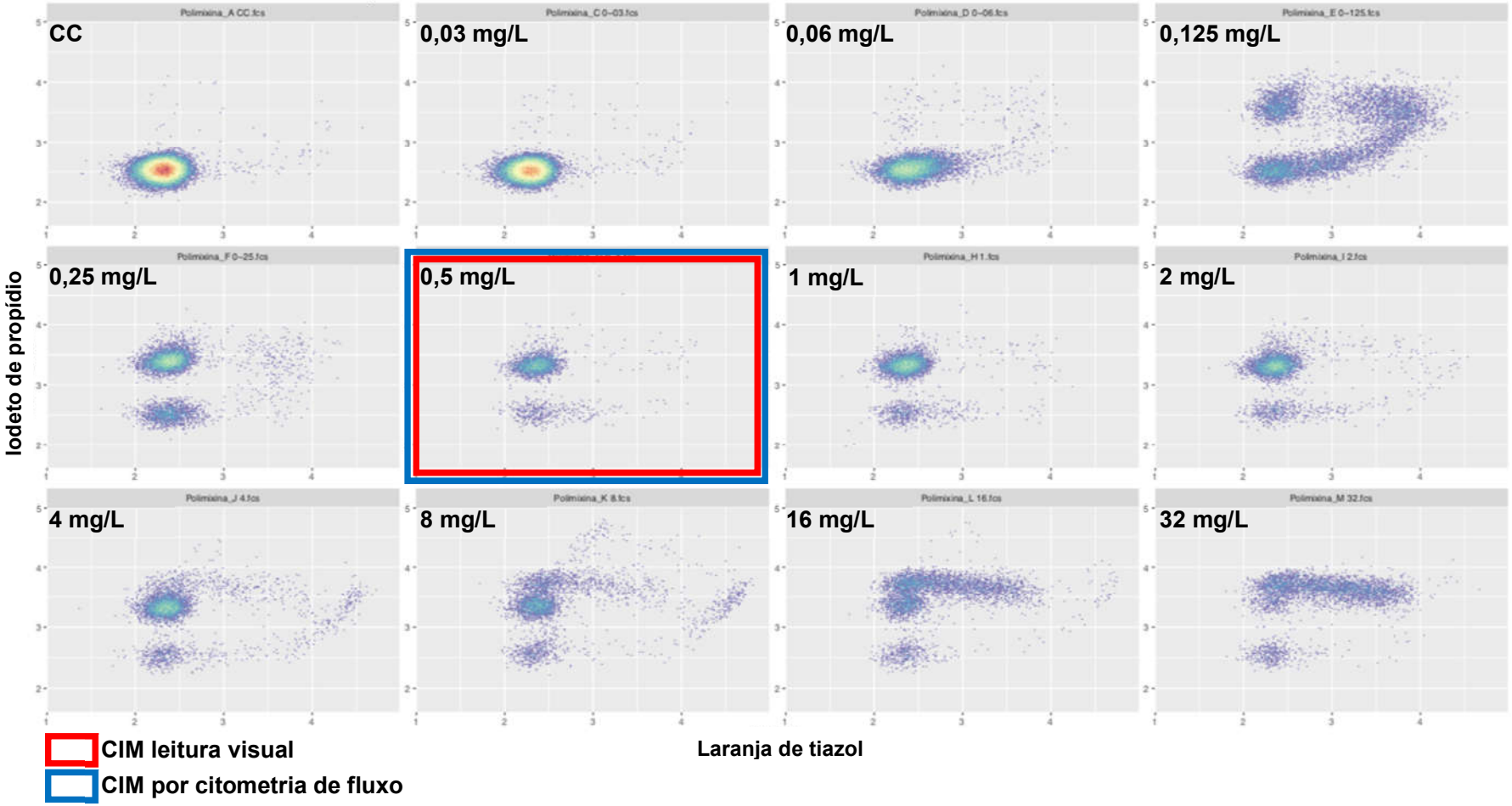
39 – BPM0147734 - *Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



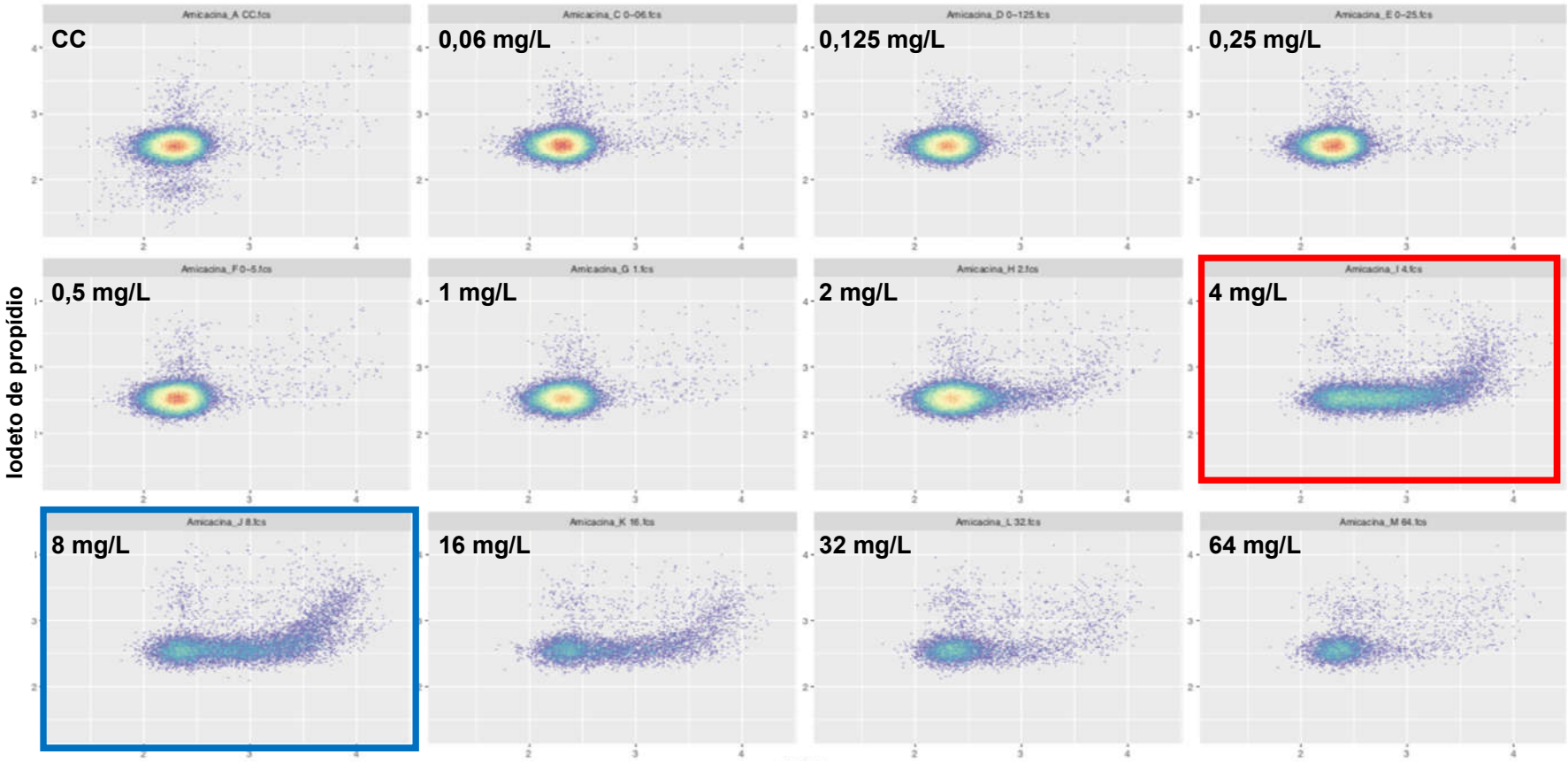
39 – BPM0147734 - *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



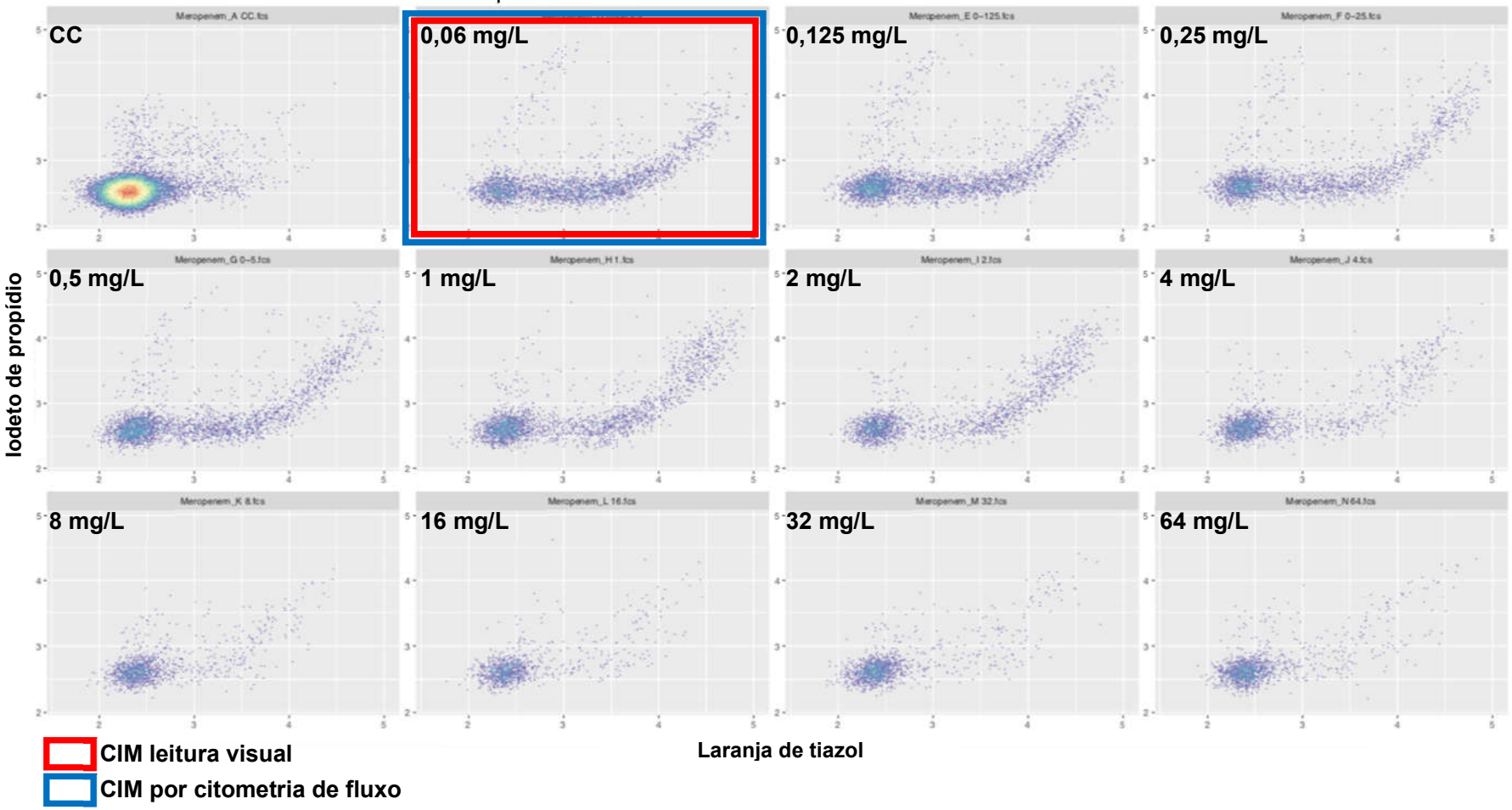
39 – BPM0147734 - *Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



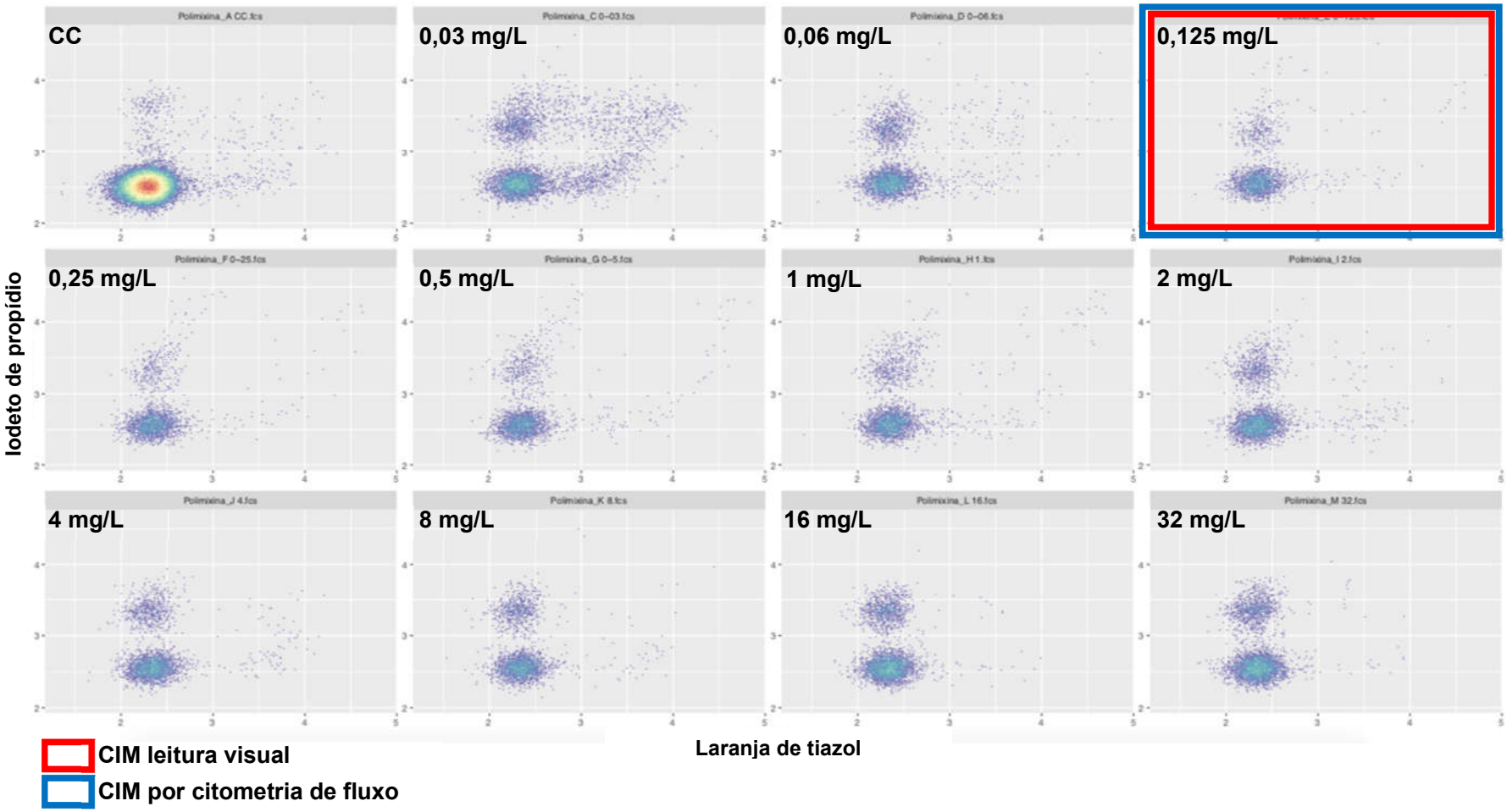
42 – L2294124 - *Citrobacter koseri* - Amicacina



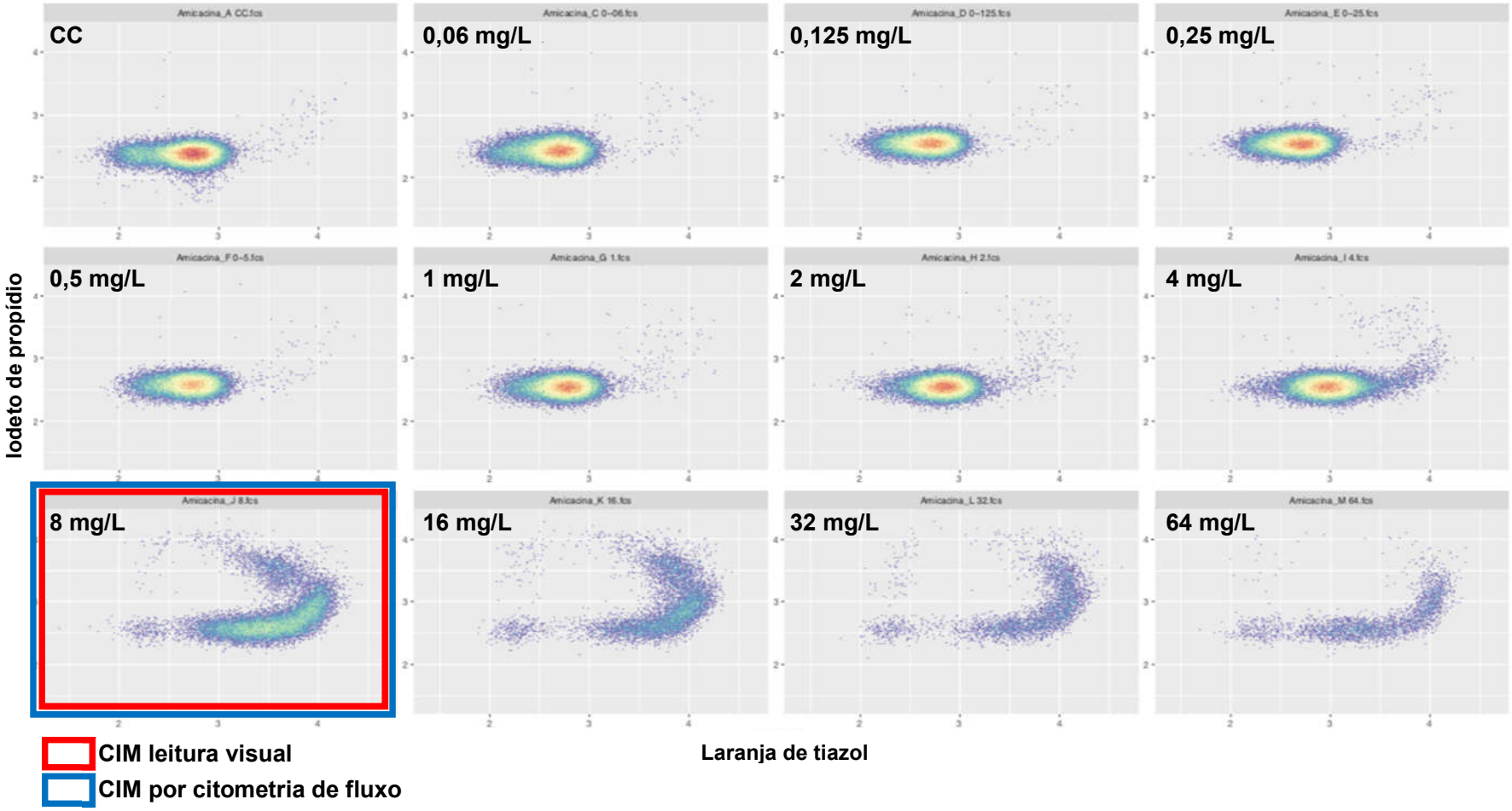
42 – L2294124 - *Citrobacter koseri* - Meropenem



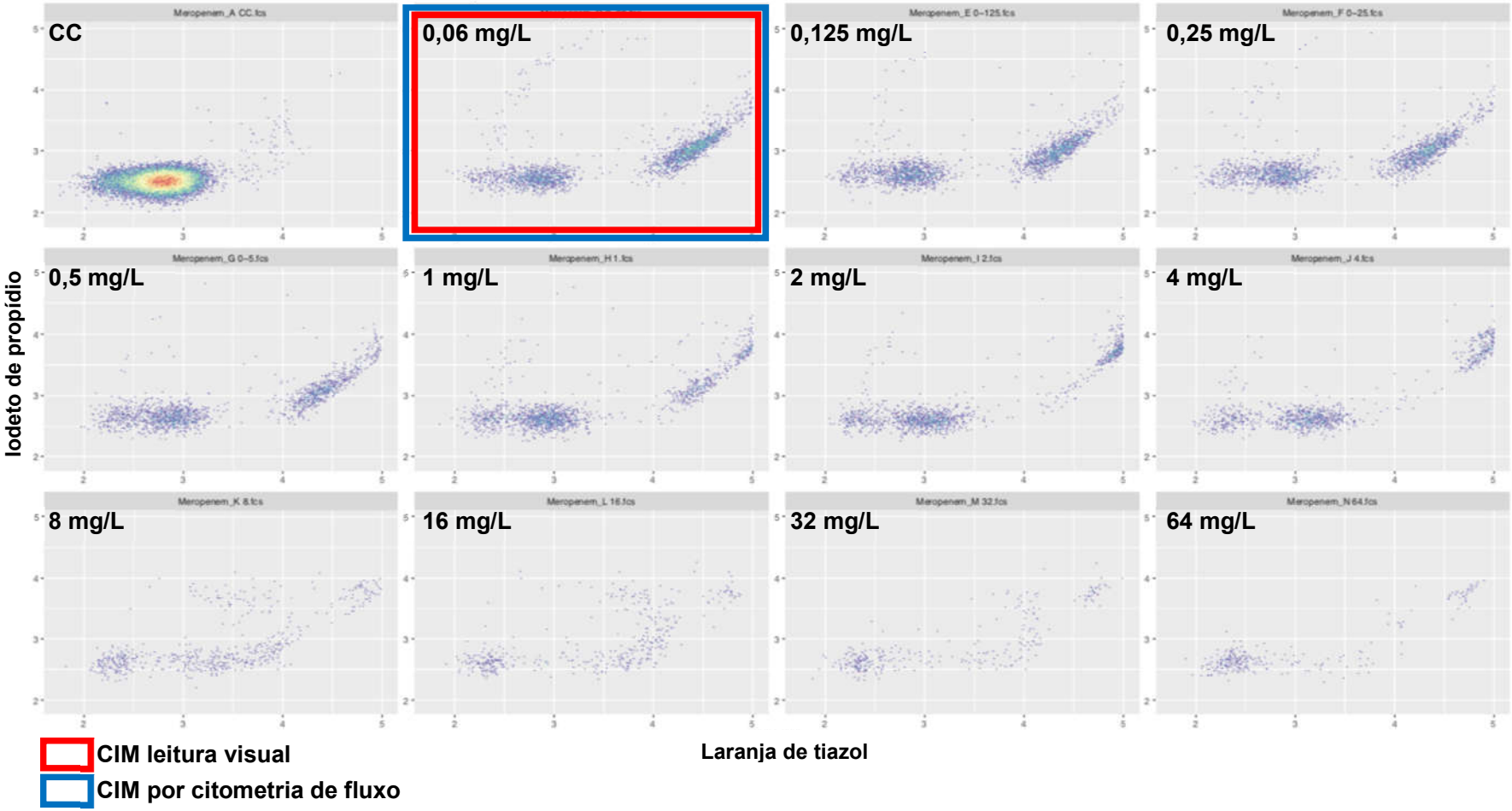
42 – L2294124 - *Citrobacter koseri* - Polimixina



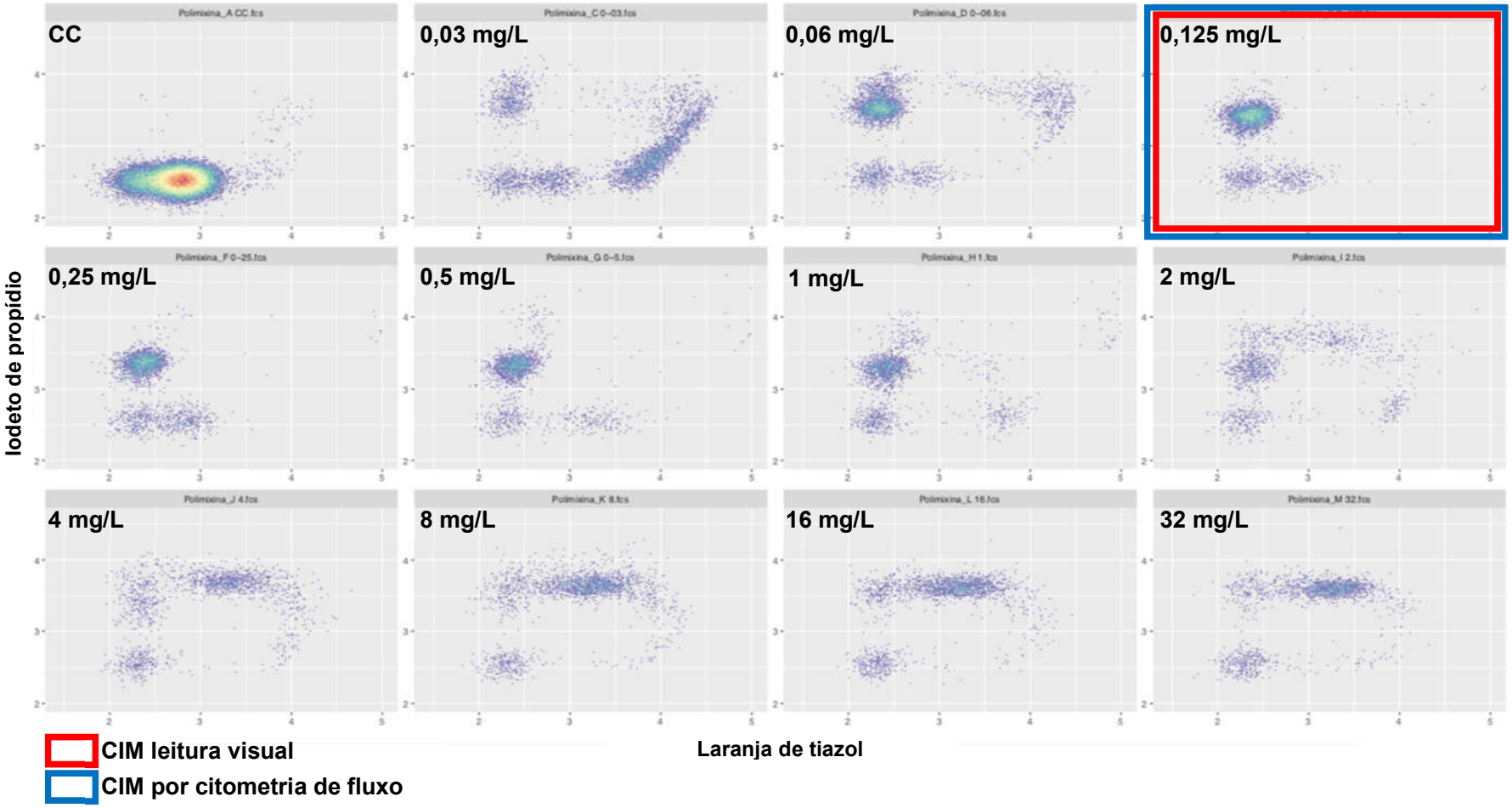
43 – L3010100 - *Escherichia coli* - Amicacina



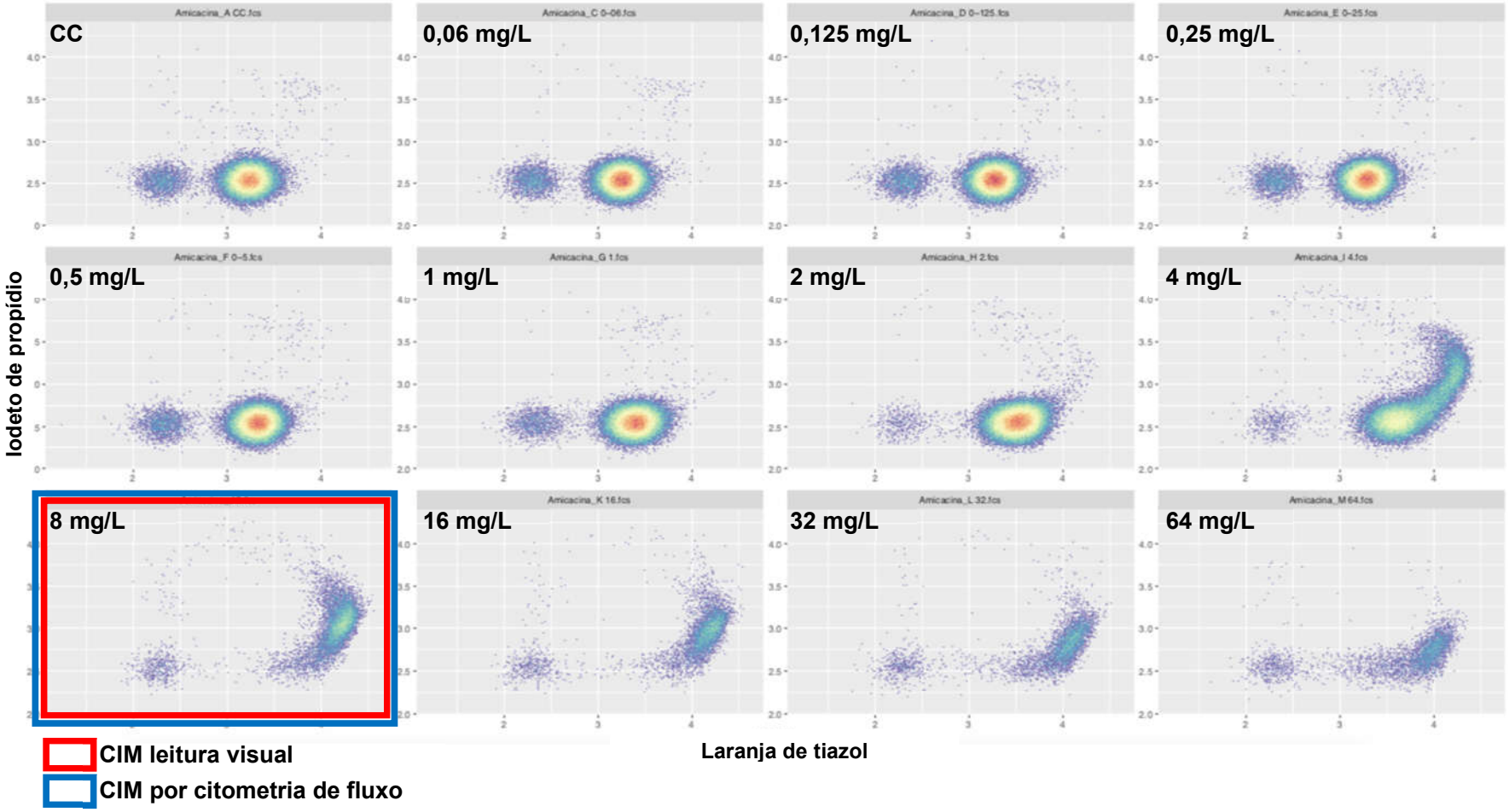
43 – L3010100 - *Escherichia coli* - Meropenem



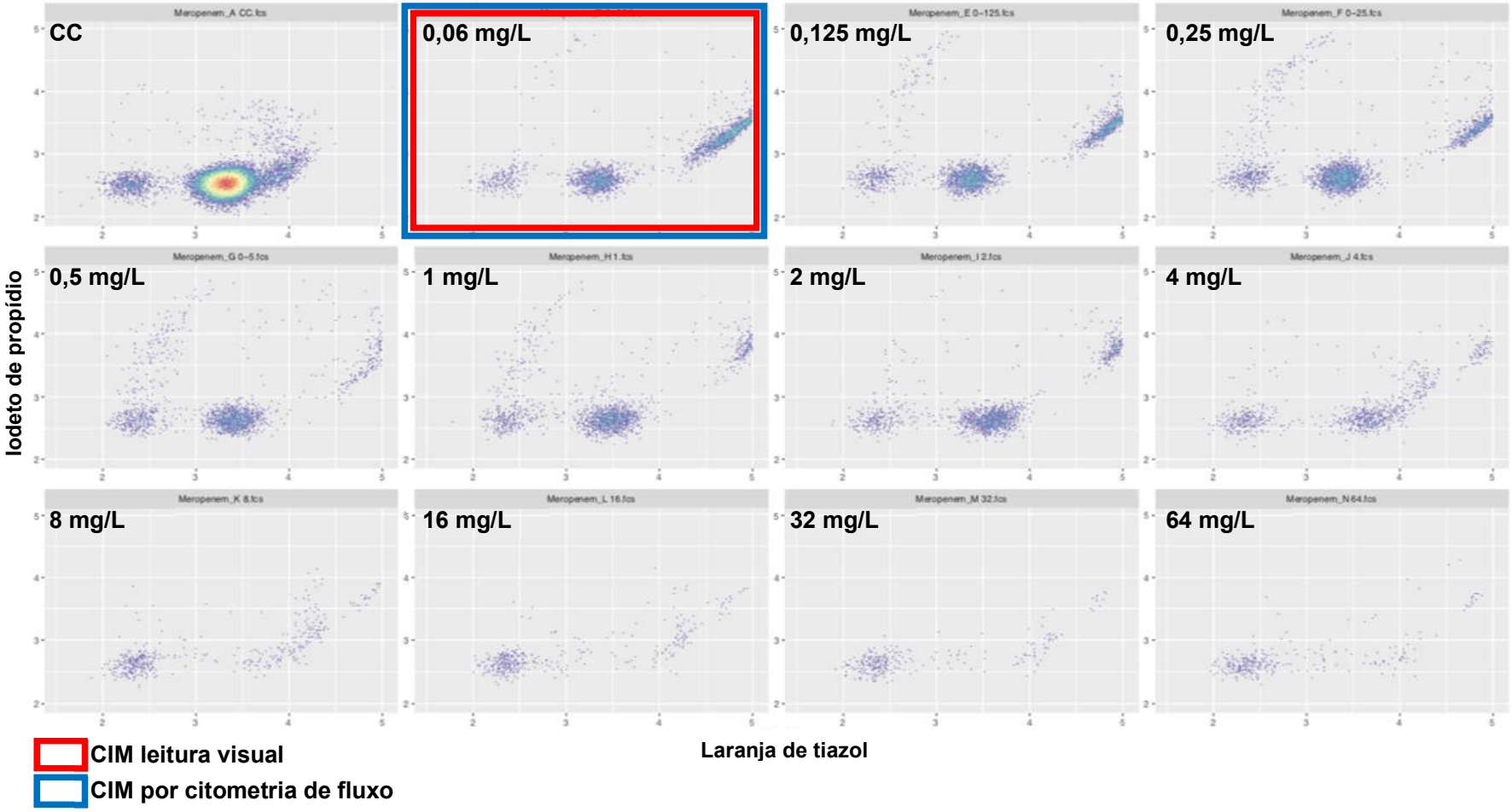
43 – L3010100 - *Escherichia coli* - Polimixina



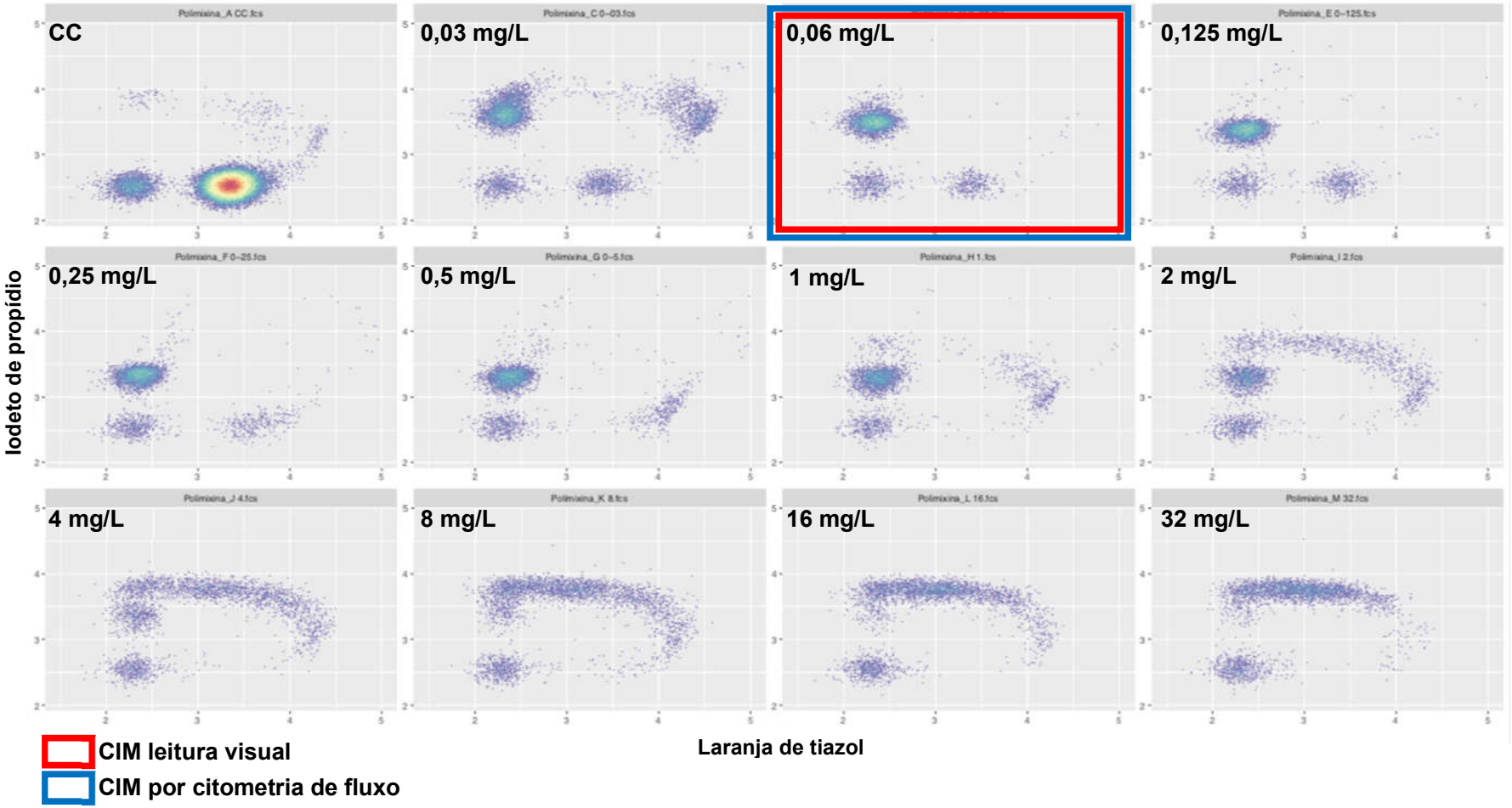
44 – L3021732 - *Escherichia* coli - Amicacina



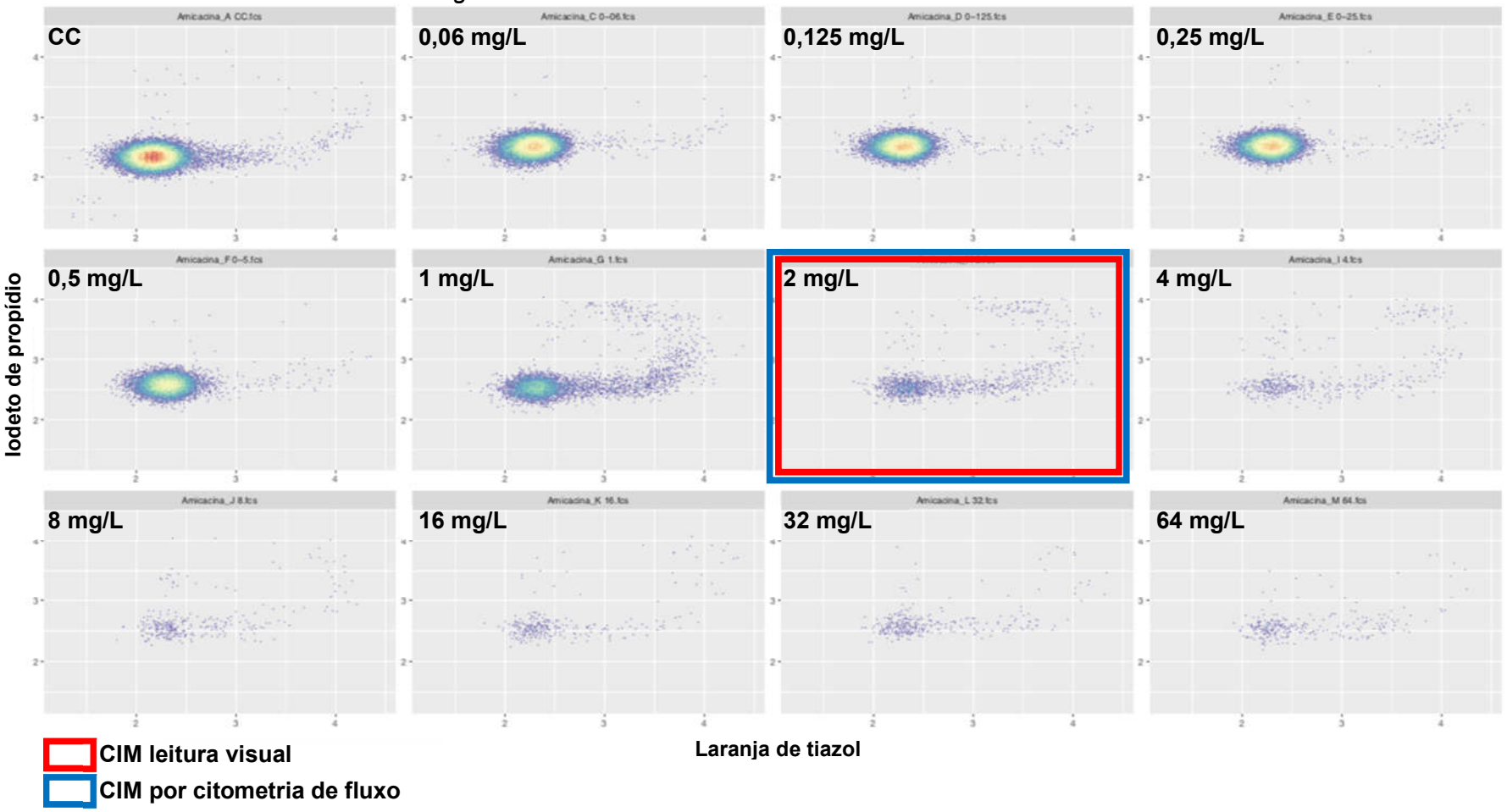
44 – L3021732 - *Escherichia* coli - Meropenem



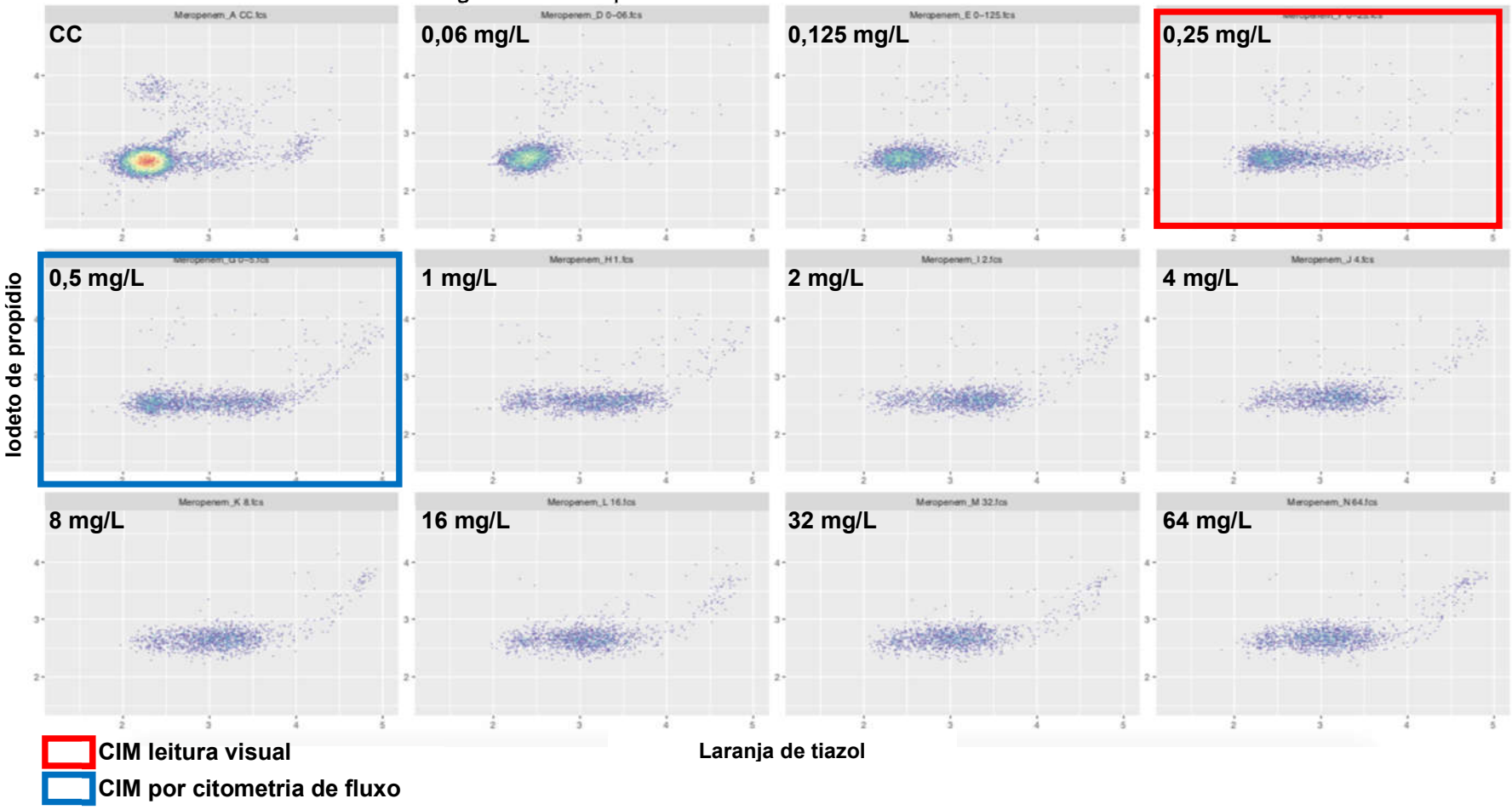
44 – L3021732 - *Escherichia* coli - Polimixina



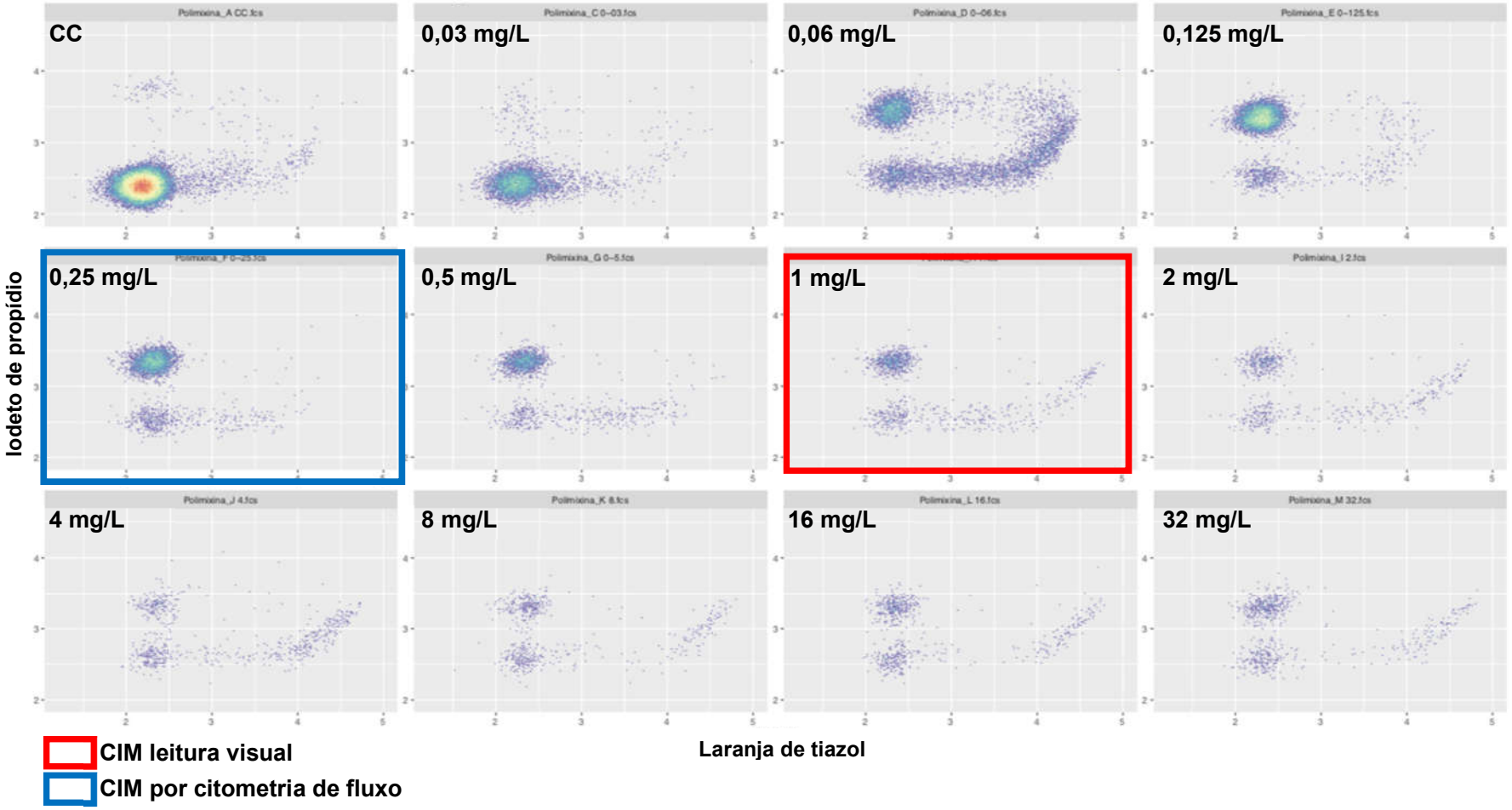
45 – BP0870831 - *Pseudomonas aeruginosa* - Amicacina



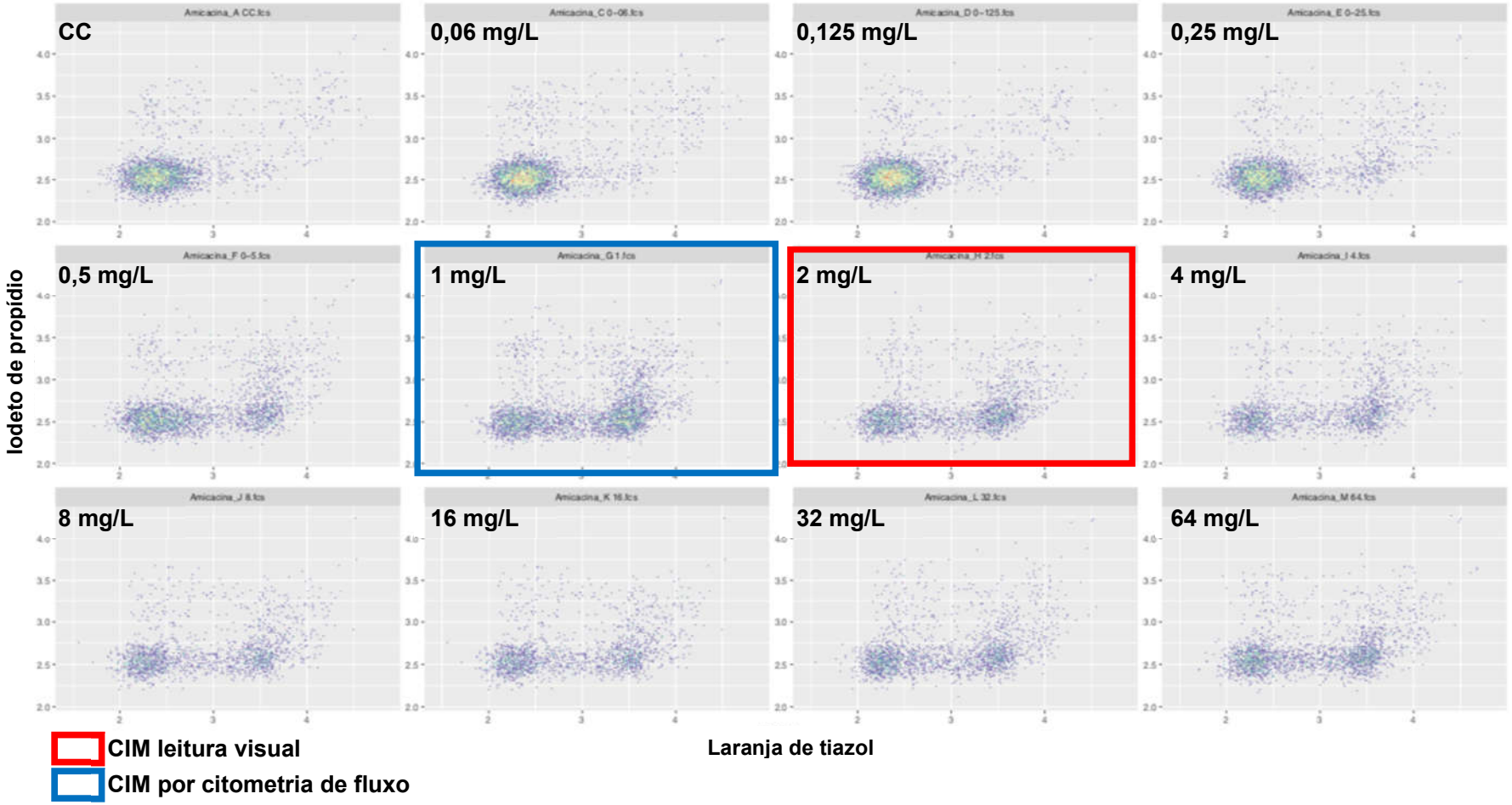
45 – BP0870831 - *Pseudomonas aeruginosa* - Meropenem



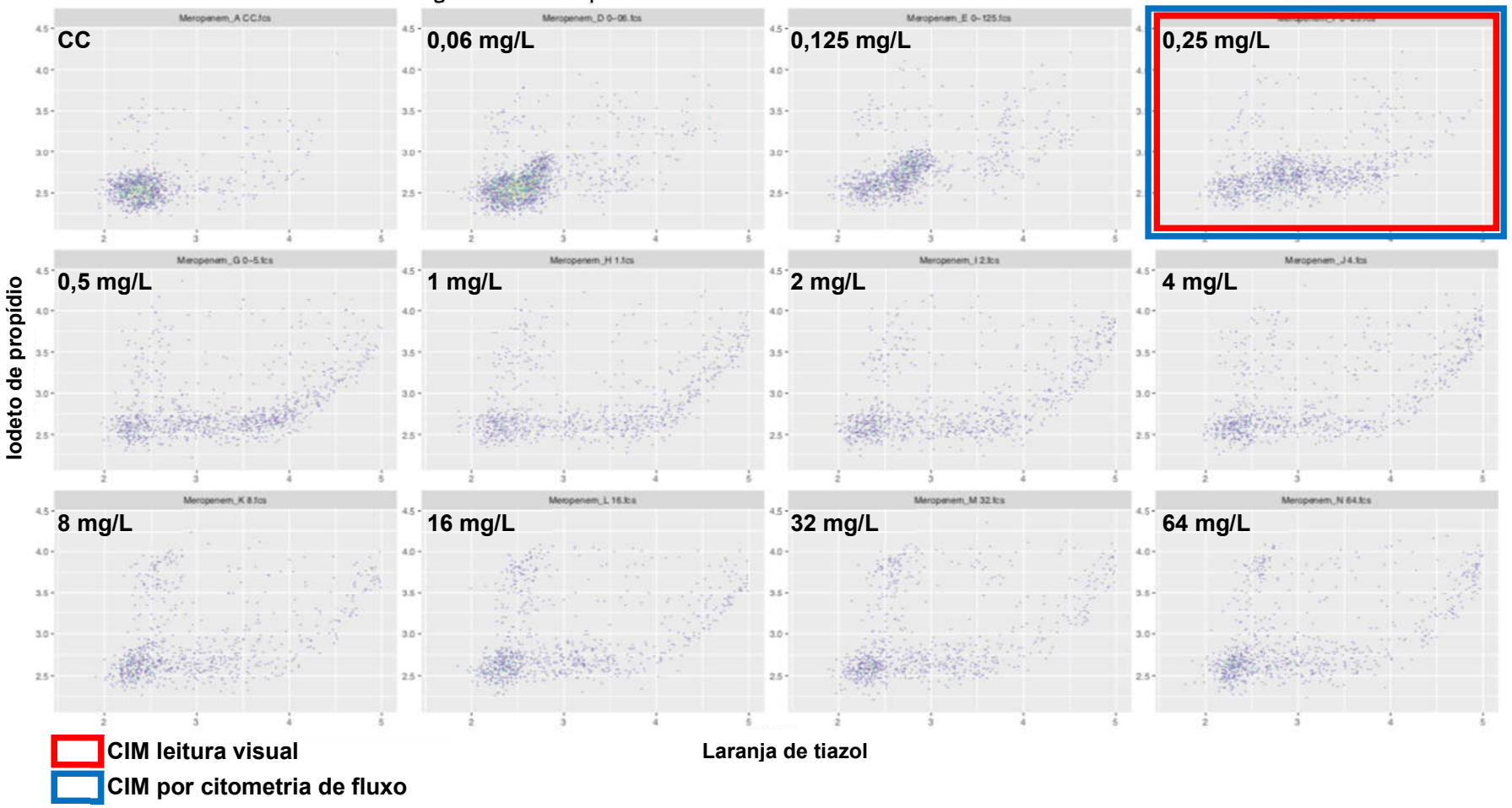
45 – BP0870831 - *Pseudomonas aeruginosa* - Polimixina



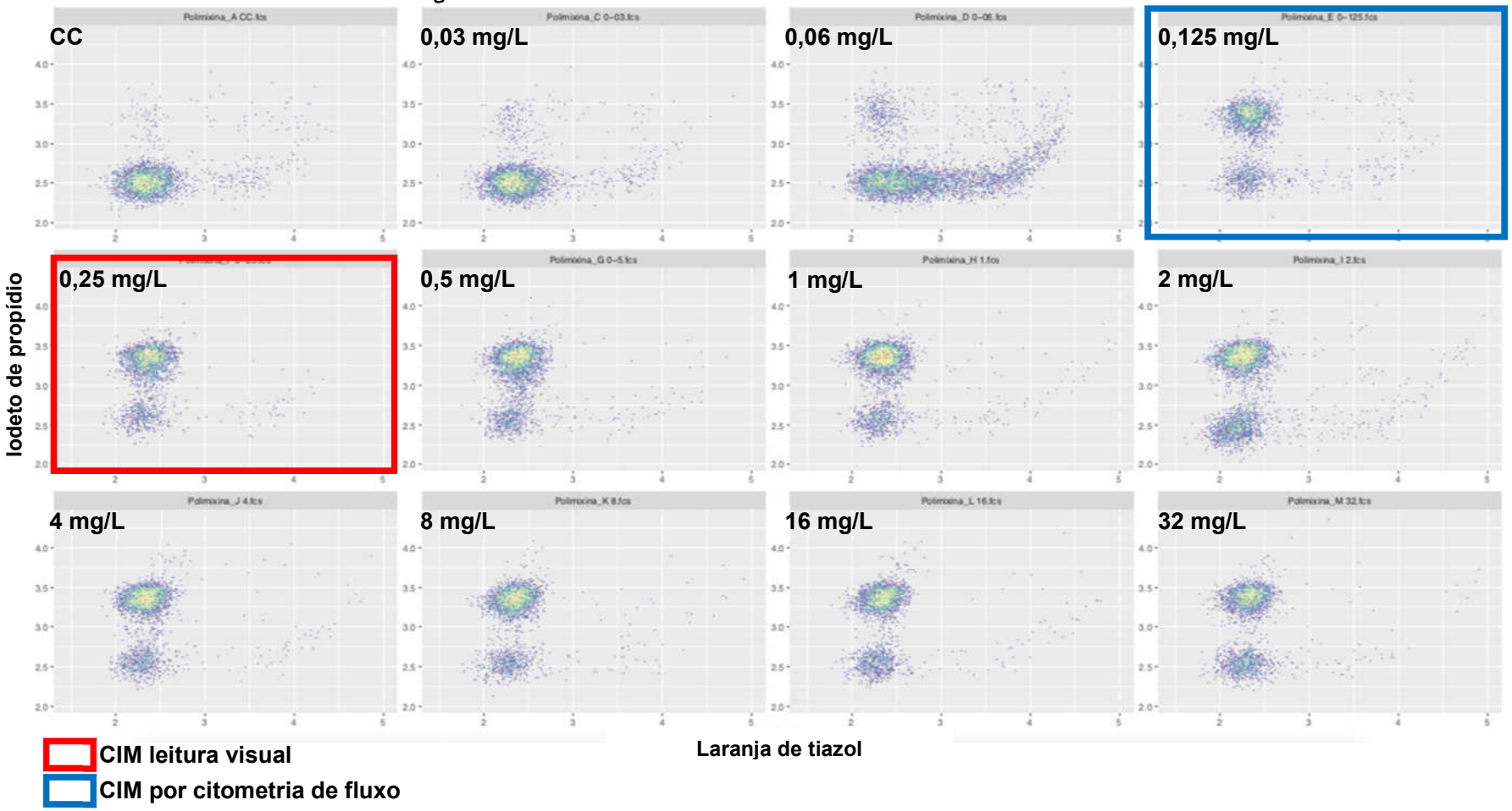
50 – L3082000 - *Pseudomonas aeruginosa* - Amicacina



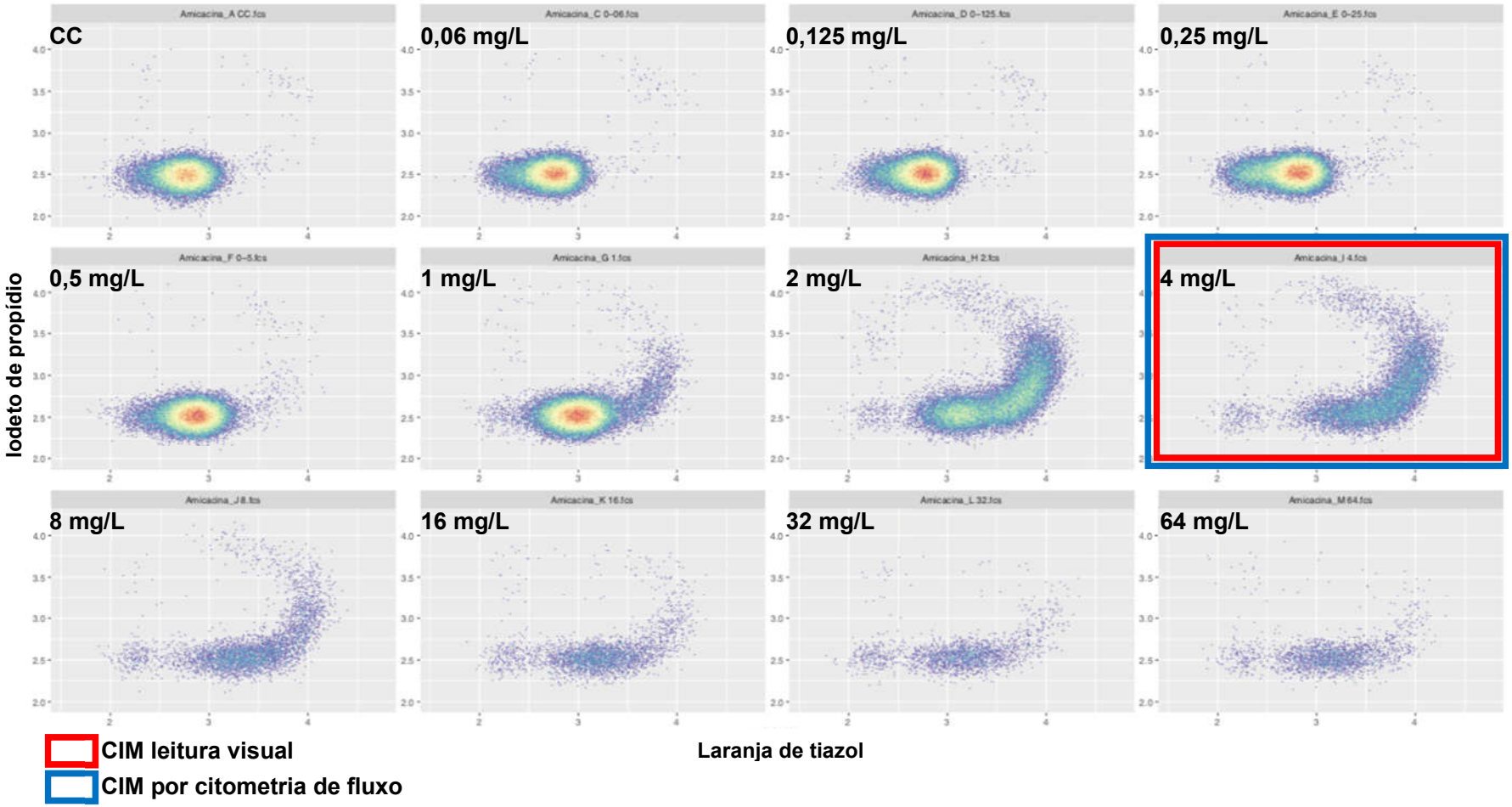
50 – L3082000 - *Pseudomonas aeruginosa* - Meropenem



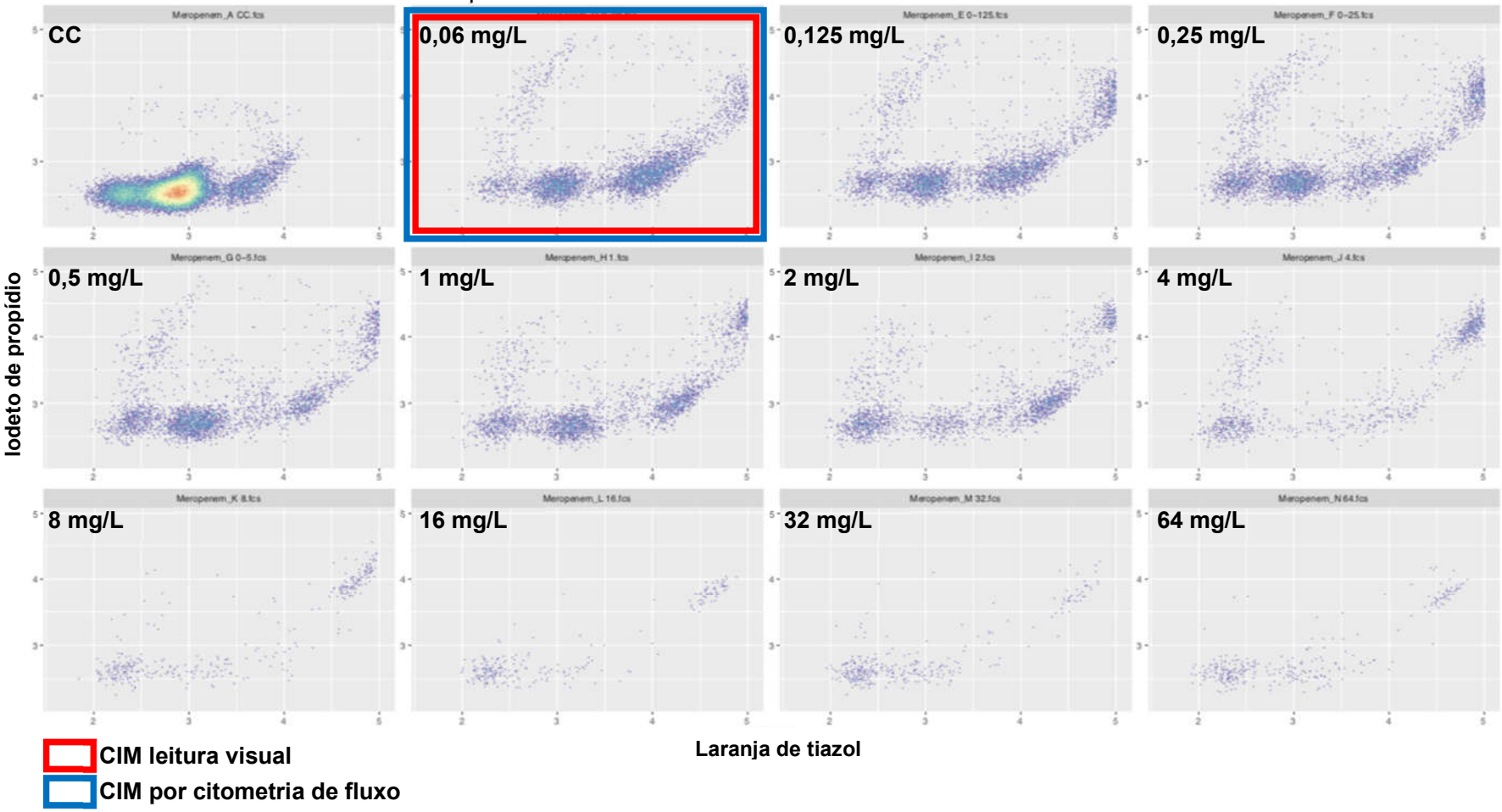
50 – L3082000 - *Pseudomonas aeruginosa* - Polimixina



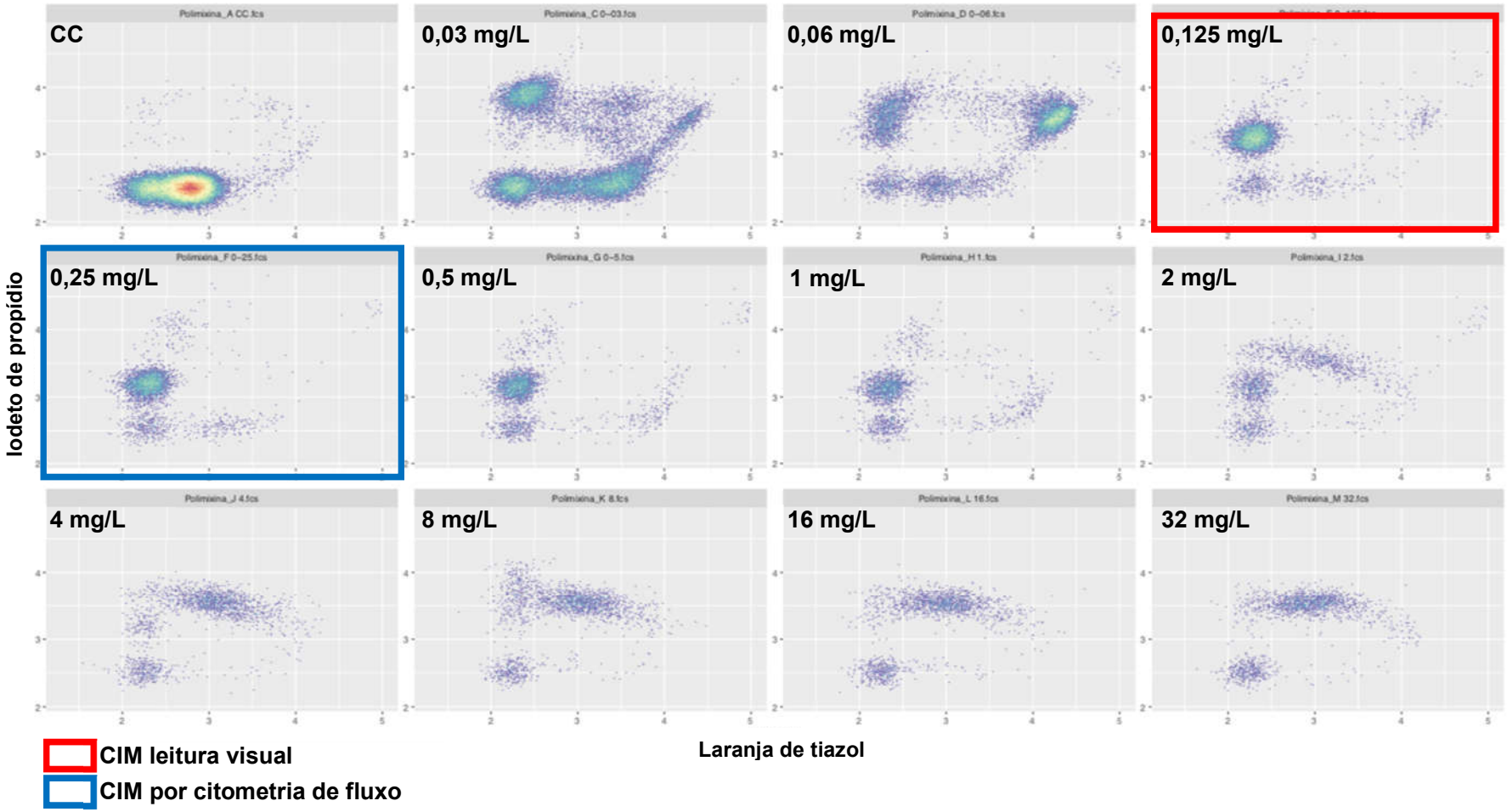
51 – L3080203 - *Escherichia coli* - Amicacina



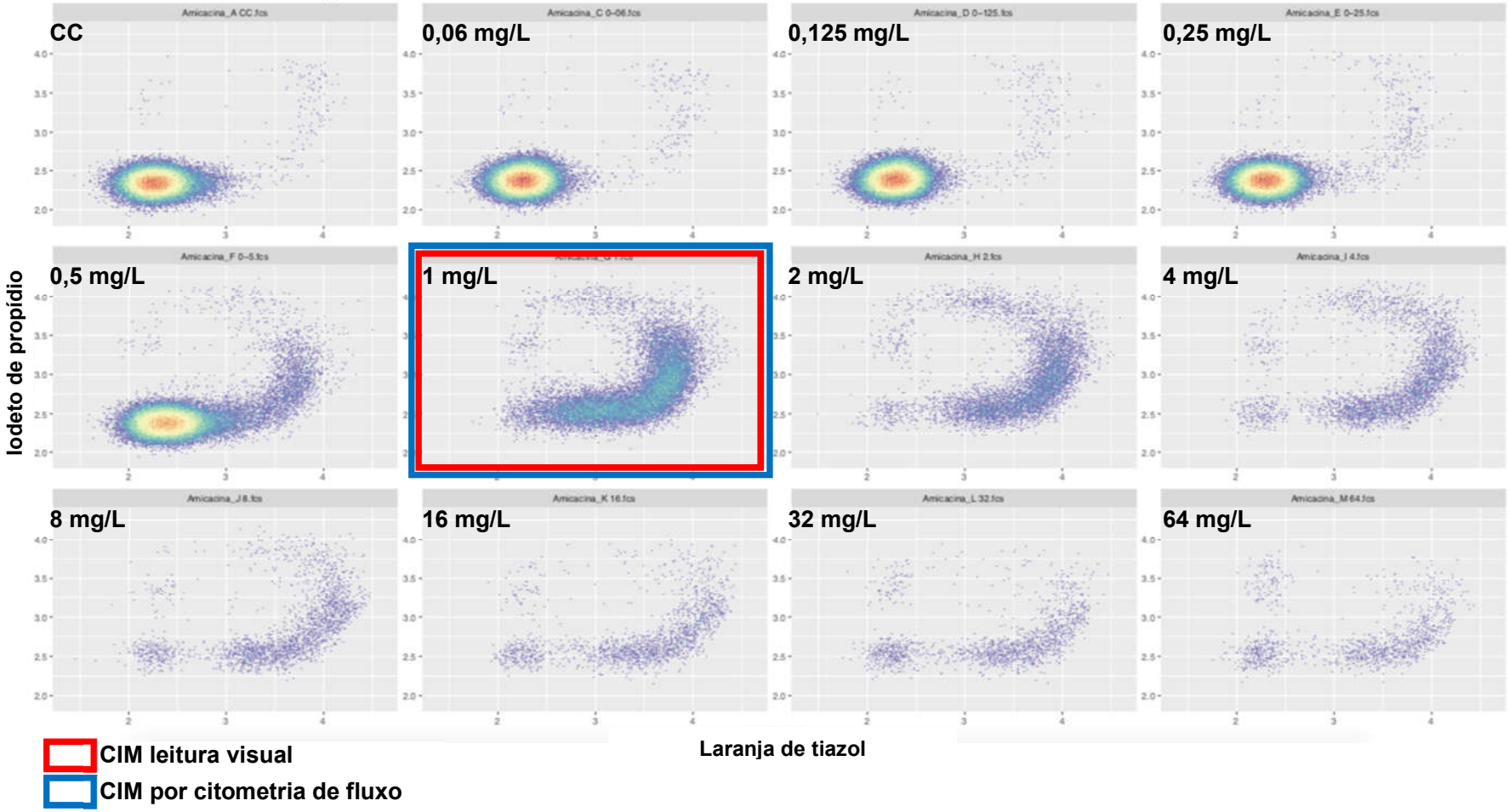
51 – L3080203 - *Escherichia coli* - Meropenem



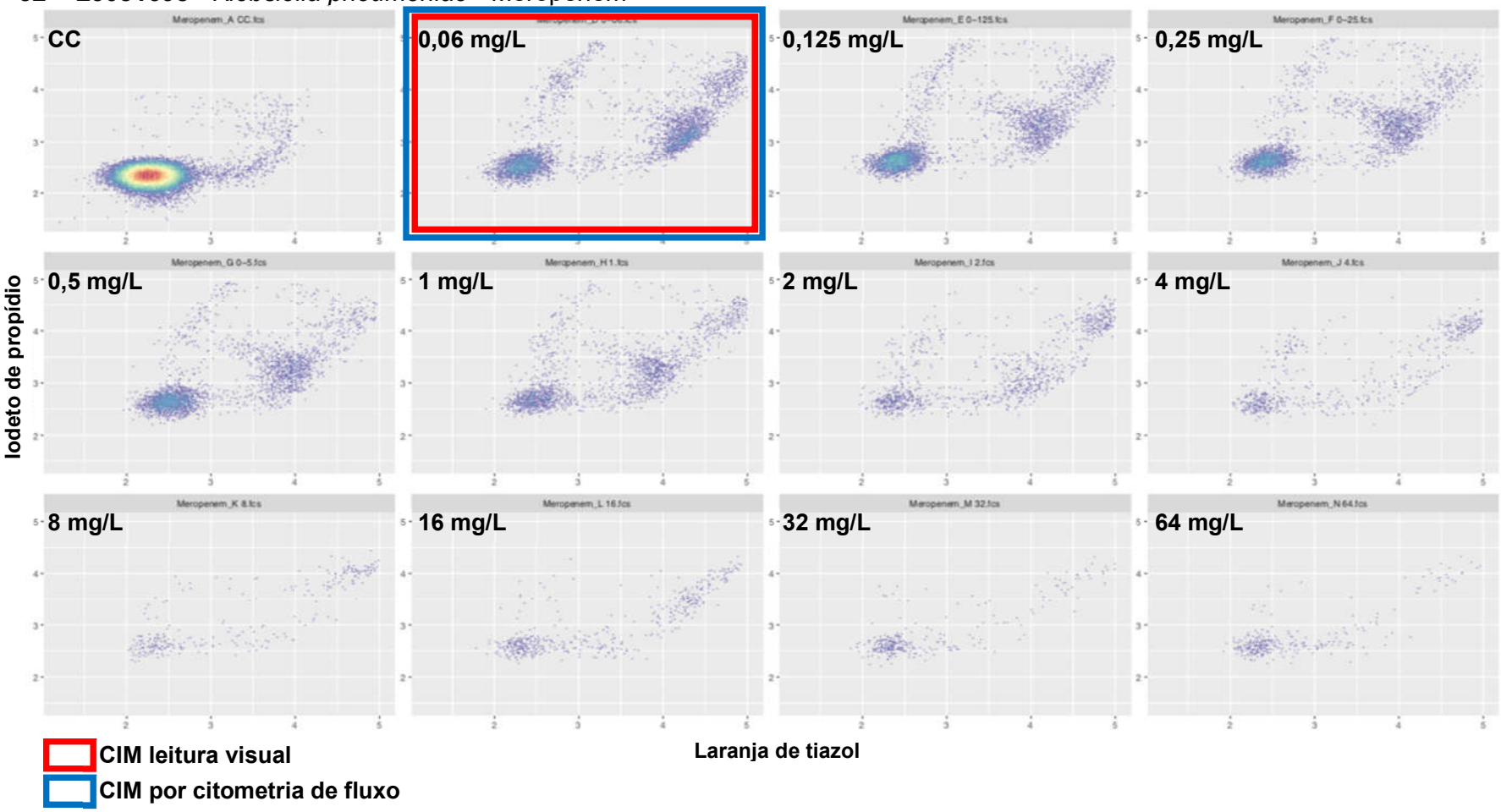
51 – L3080203 - *Escherichia coli* - Polimixina



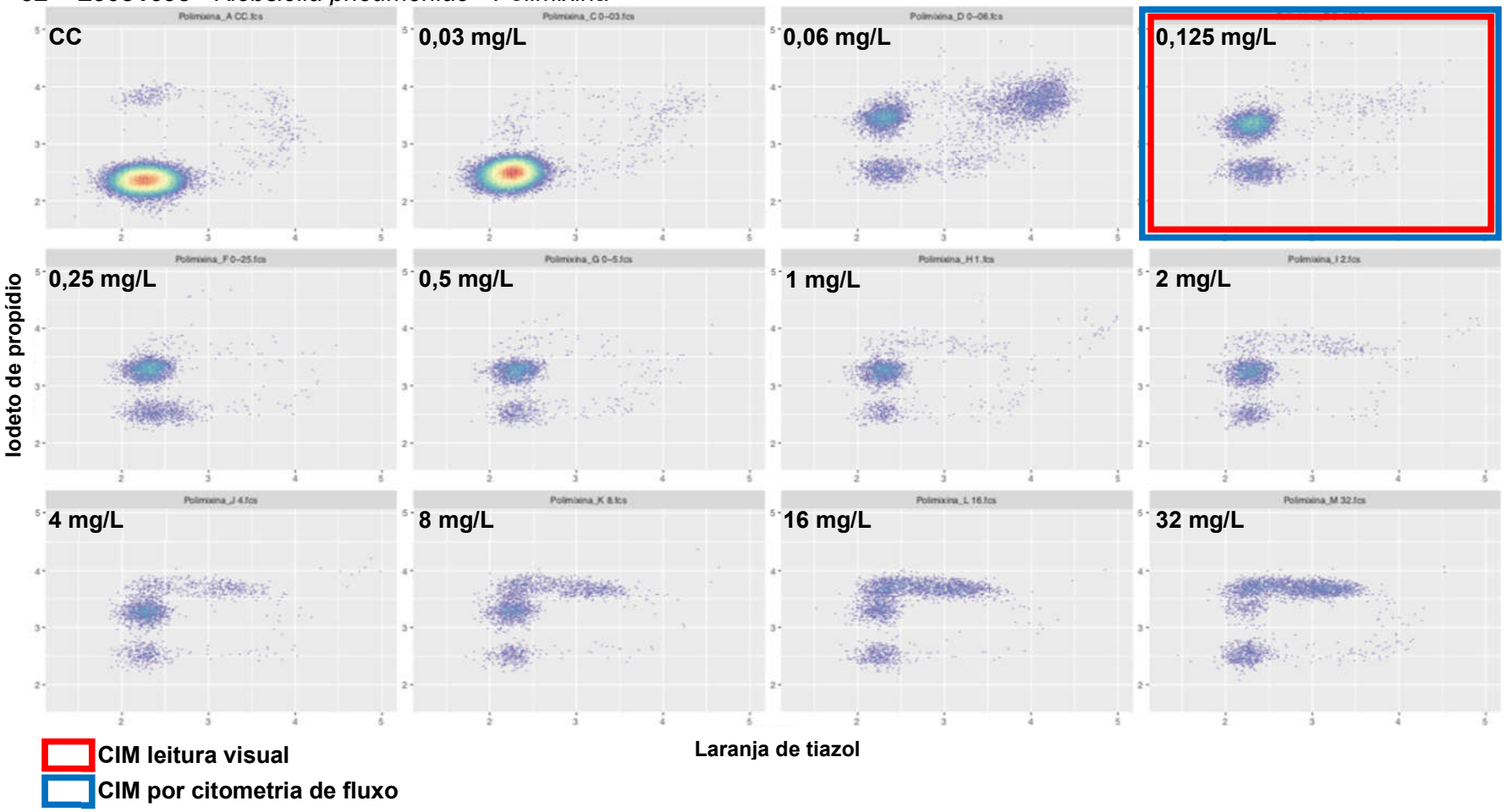
52 – L3081698 - *Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



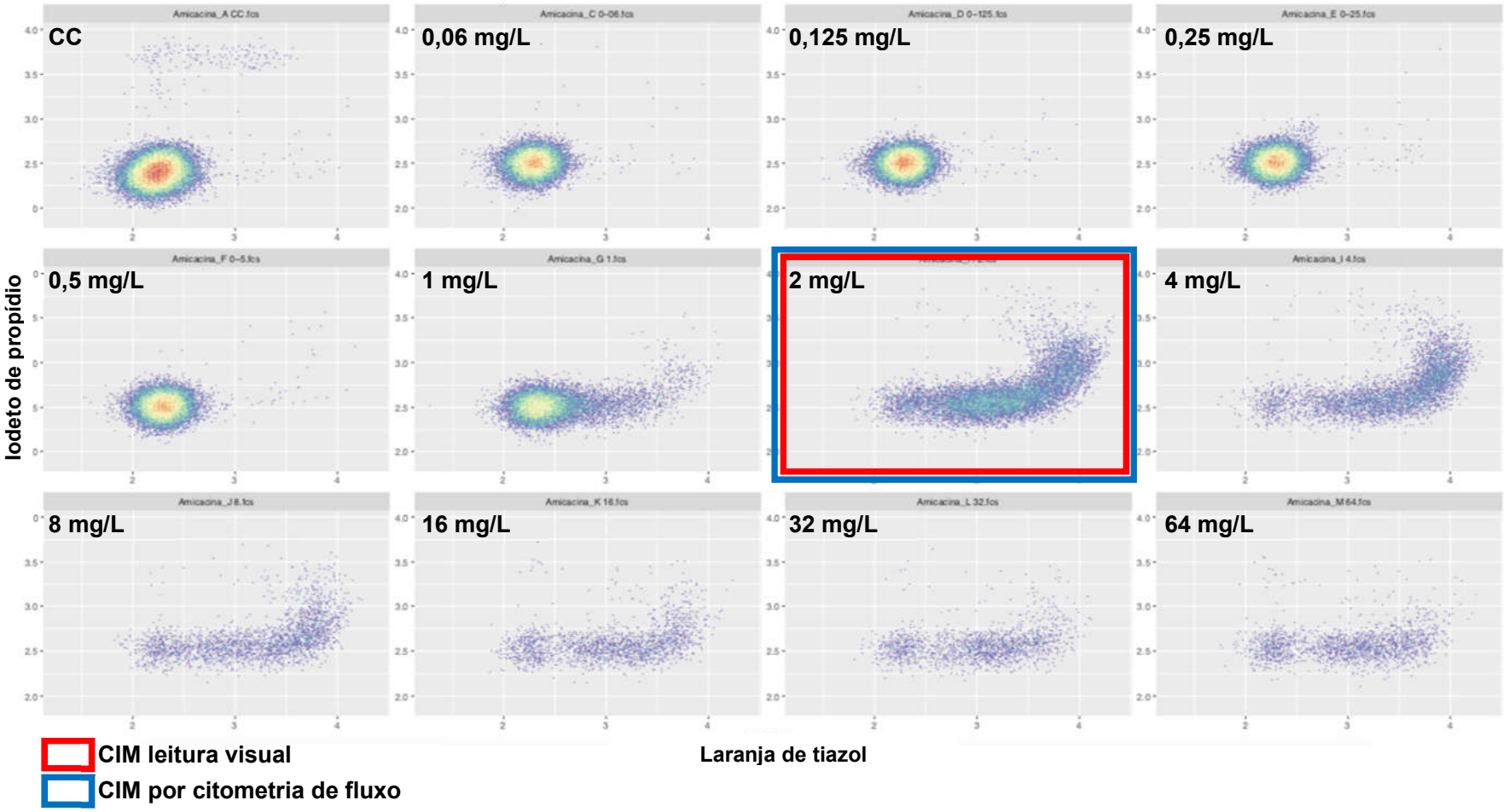
52 – L3081698 - *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



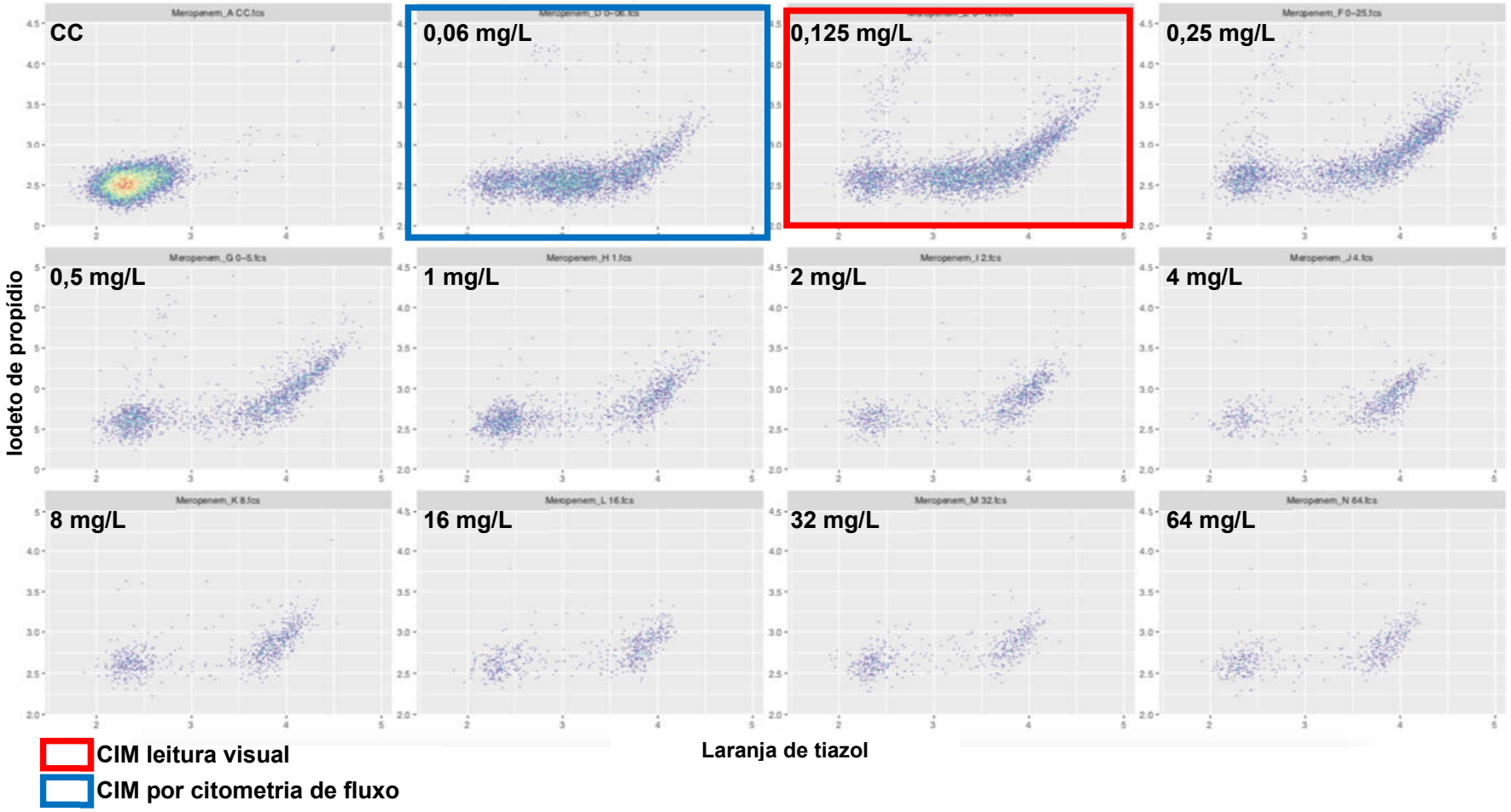
52 – L3081698 - *Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



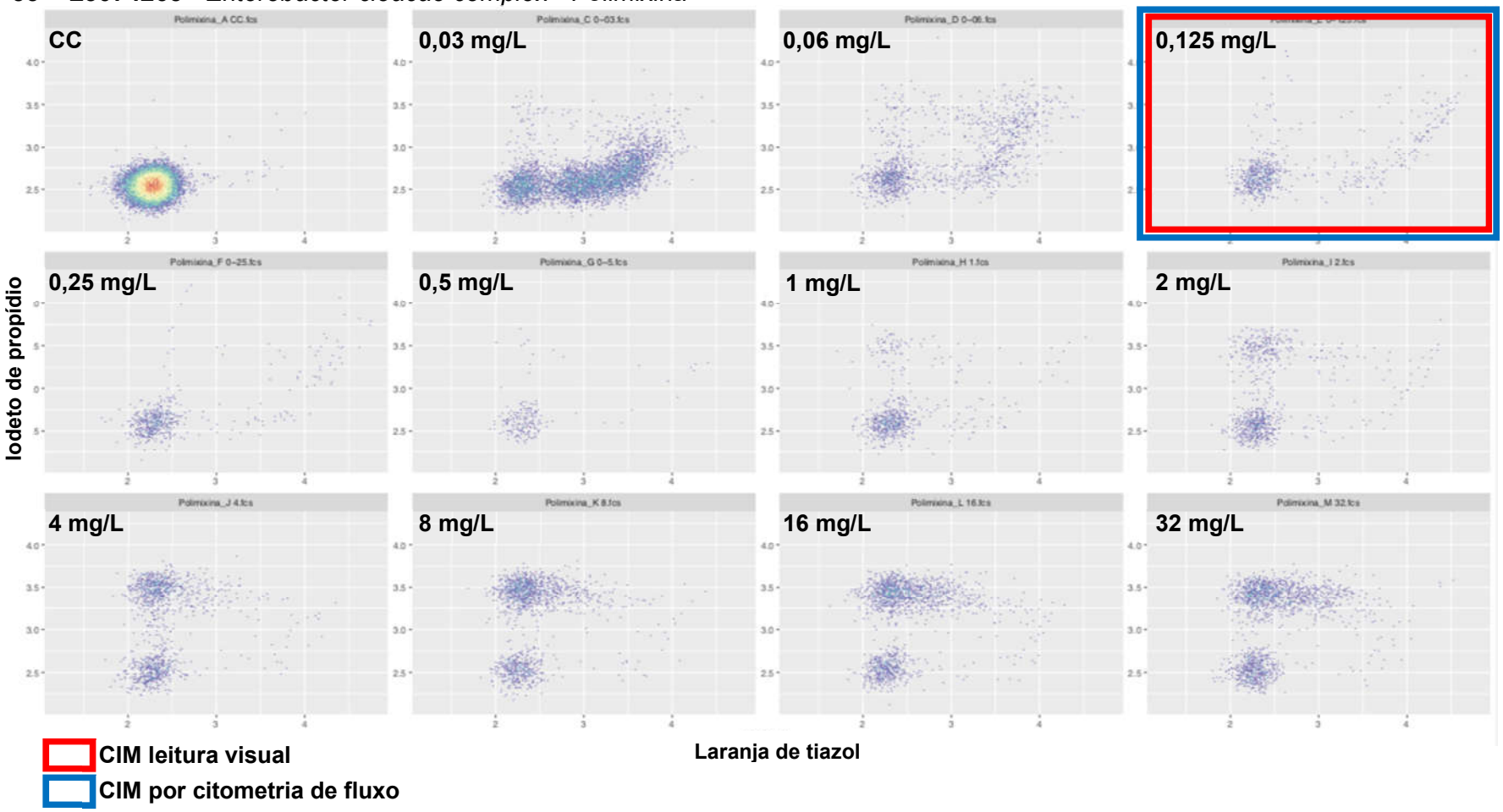
53 – L3074265 - *Enterobacter cloacae complex* - Amicacina



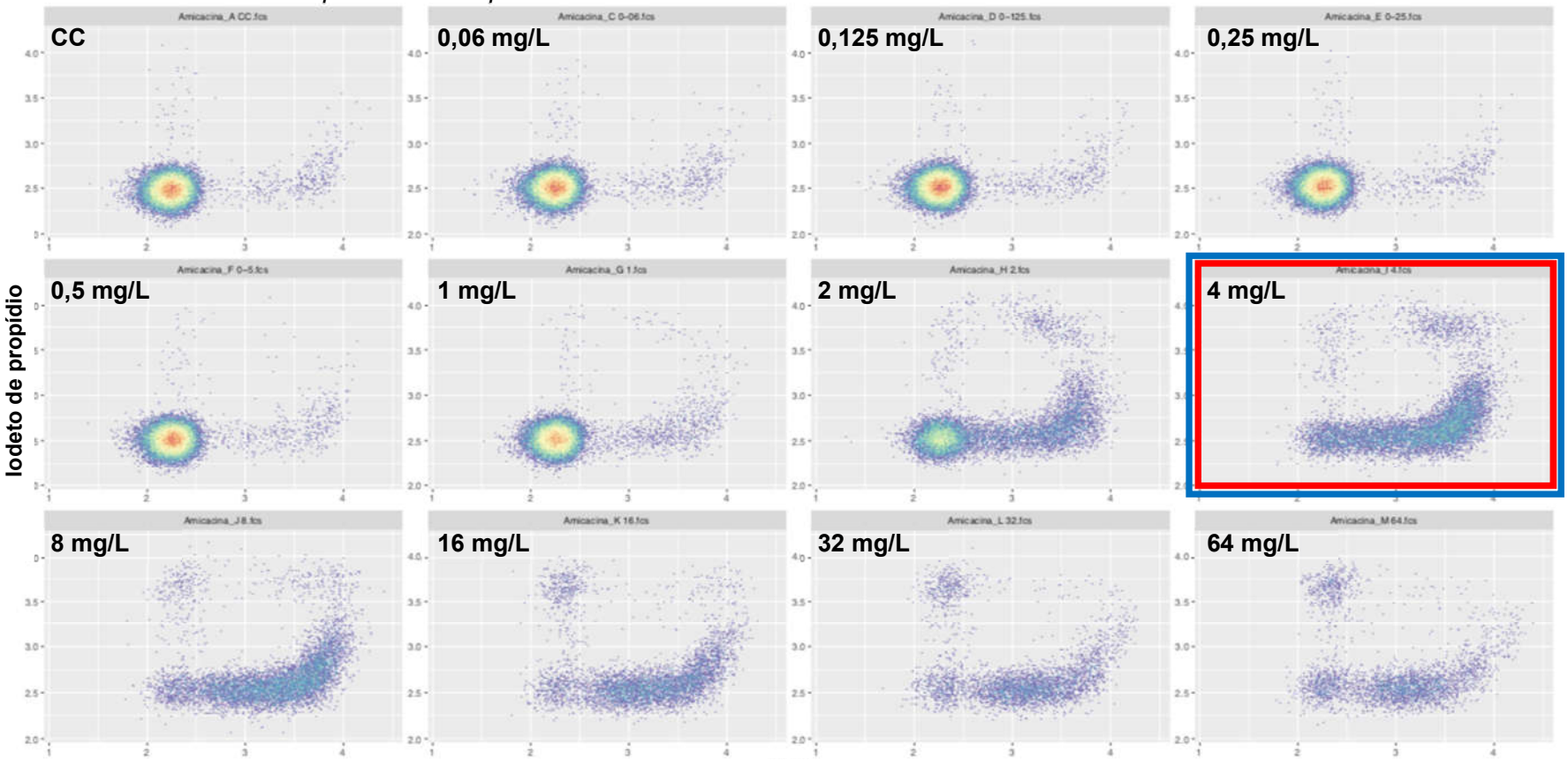
53 – L3074265 - *Enterobacter cloacae complex* - Meropenem



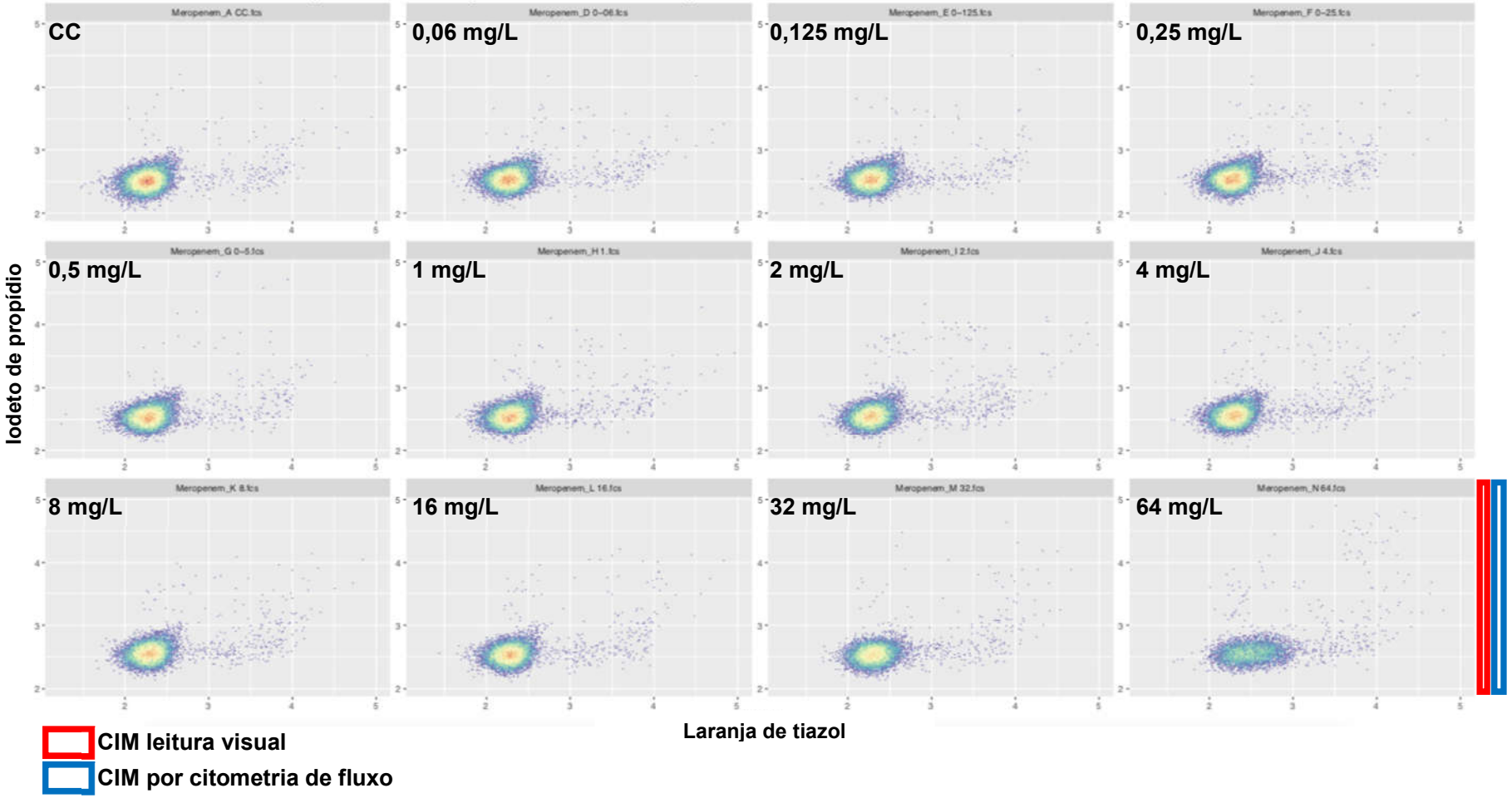
53 – L3074265 - *Enterobacter cloacae complex* - Polimixina



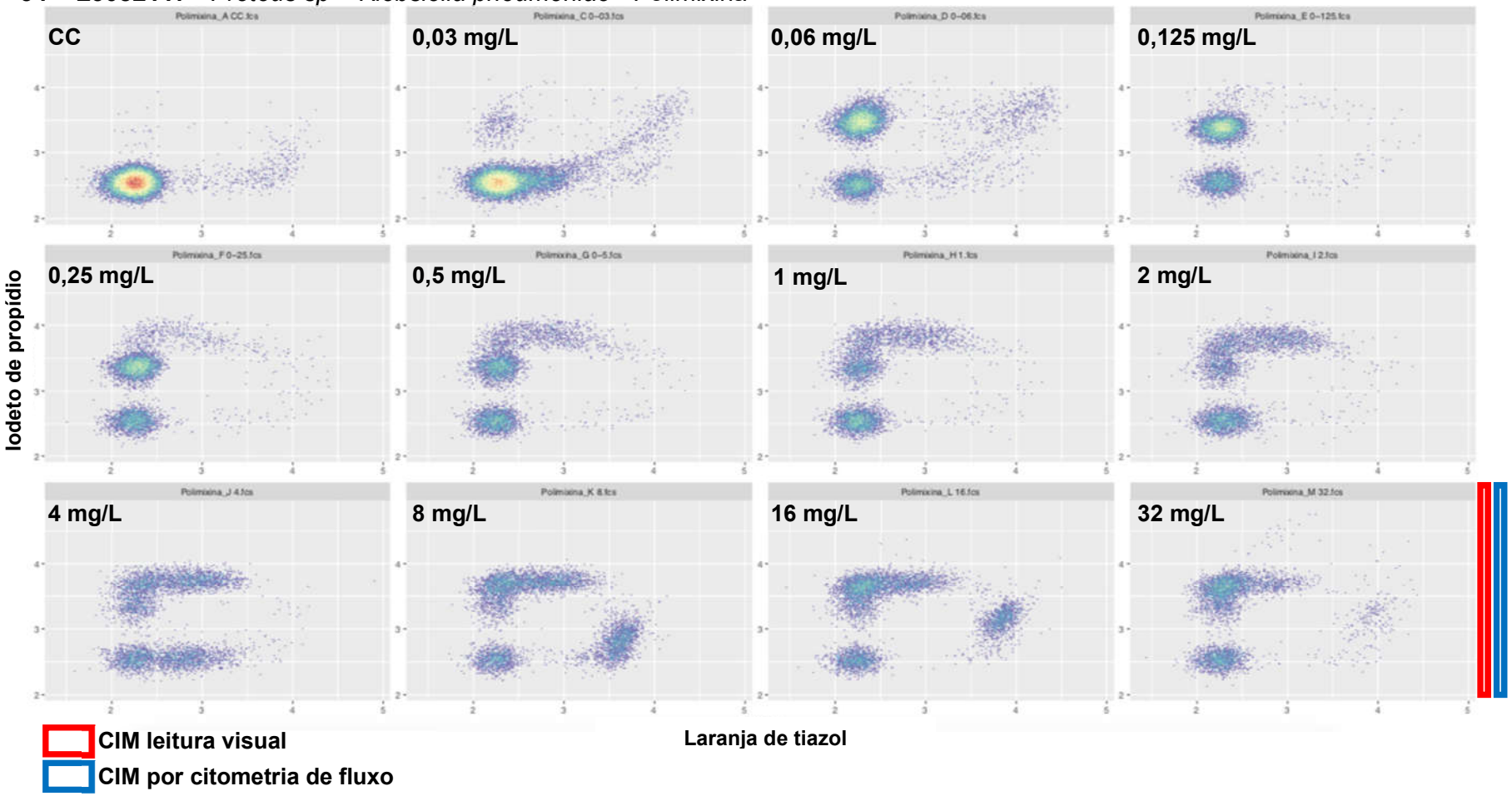
54 – L3082117 - *Proteus sp + Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



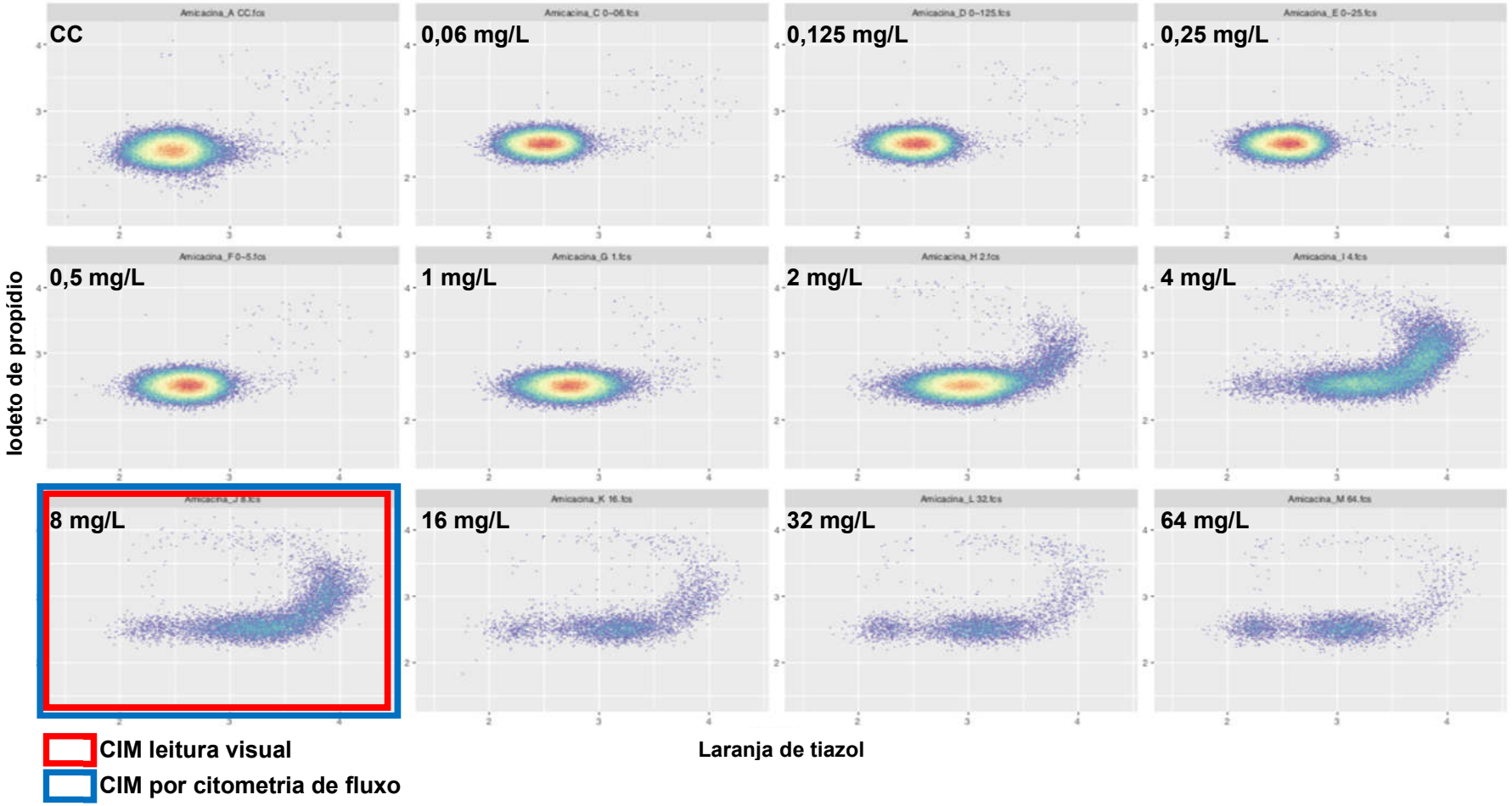
54 – L3082117 - *Proteus sp + Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



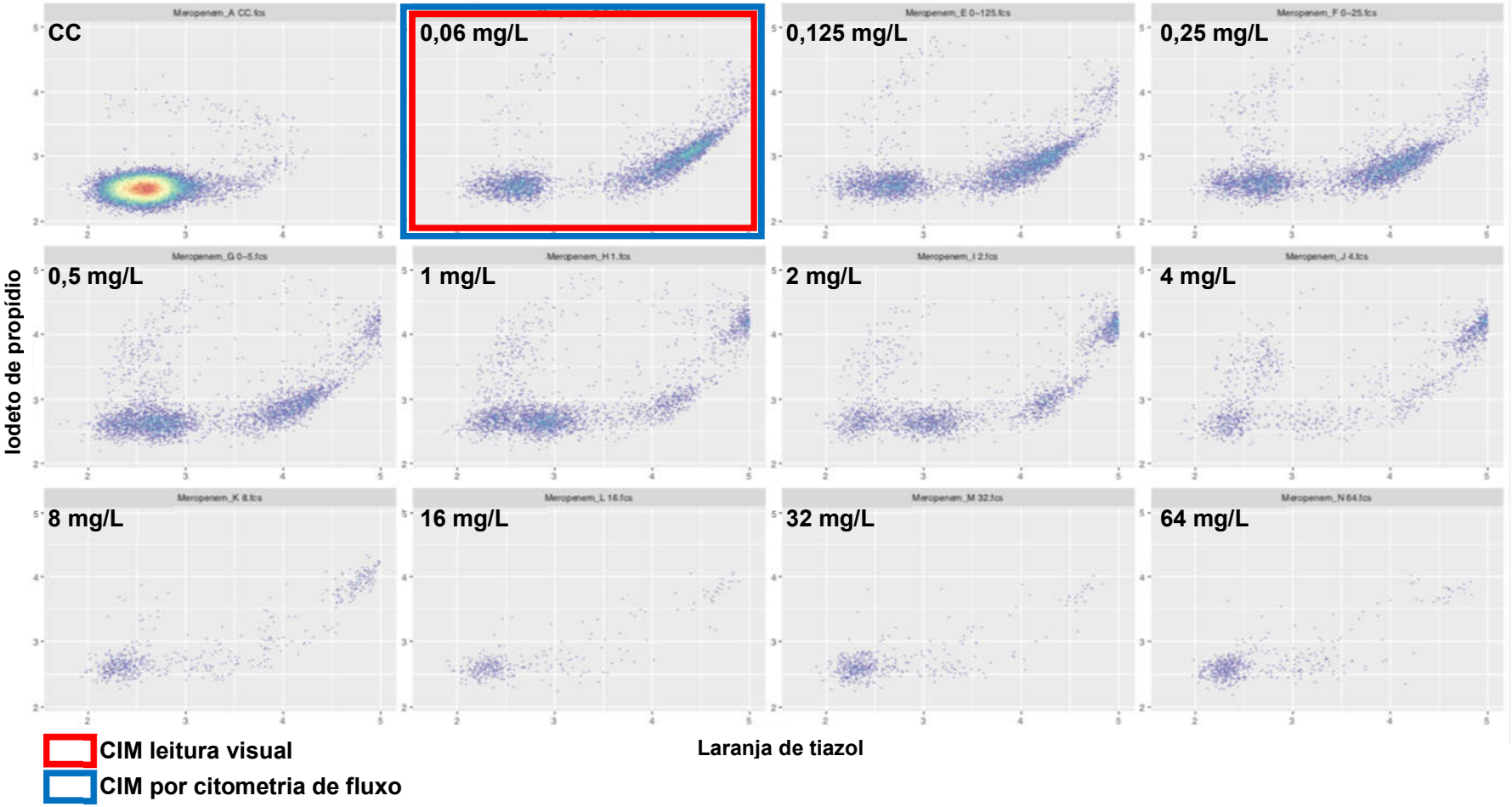
54 – L3082117 - *Proteus sp + Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



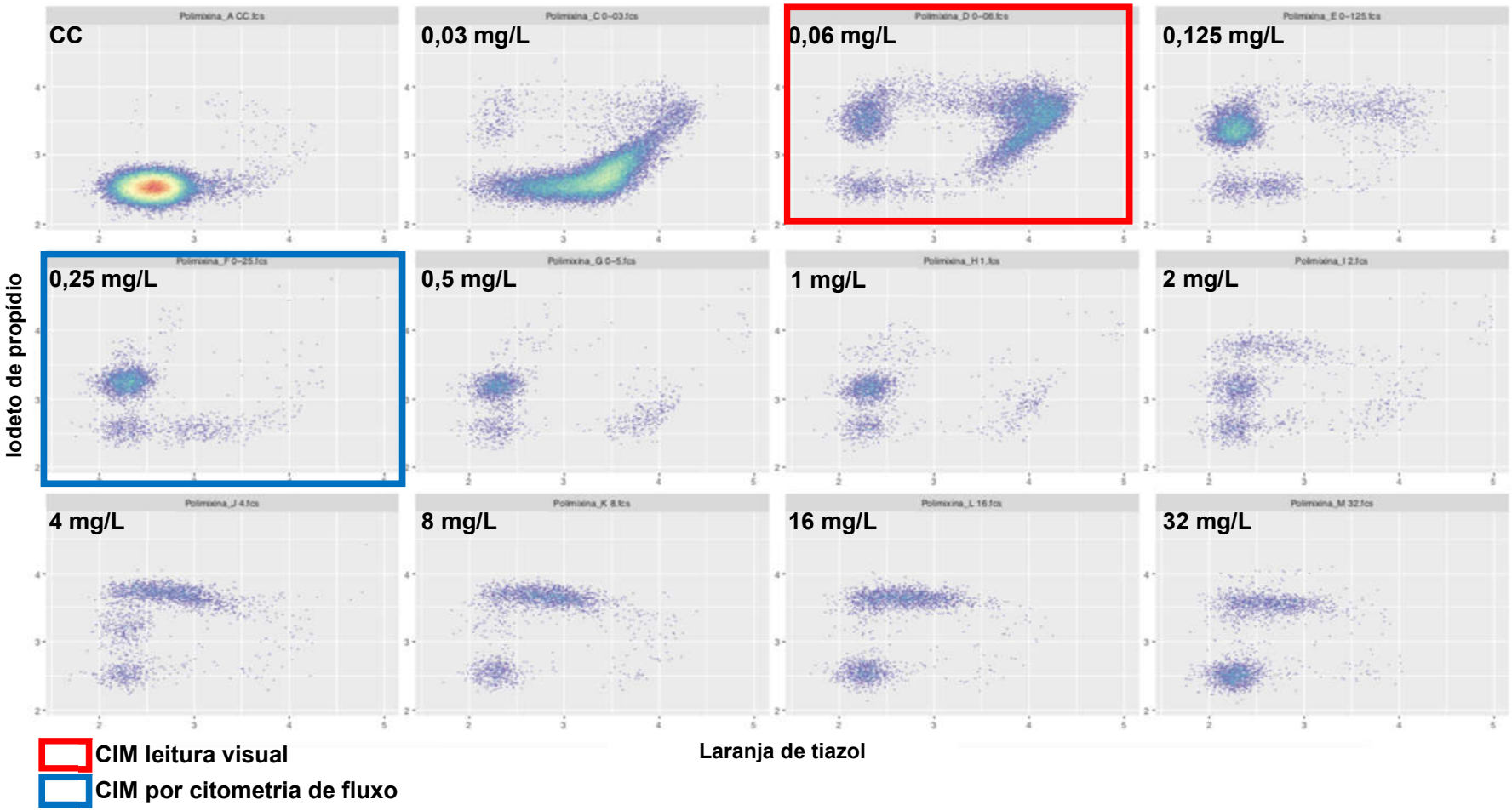
55 – L3081574 - *Escherichia coli* - Amicacina



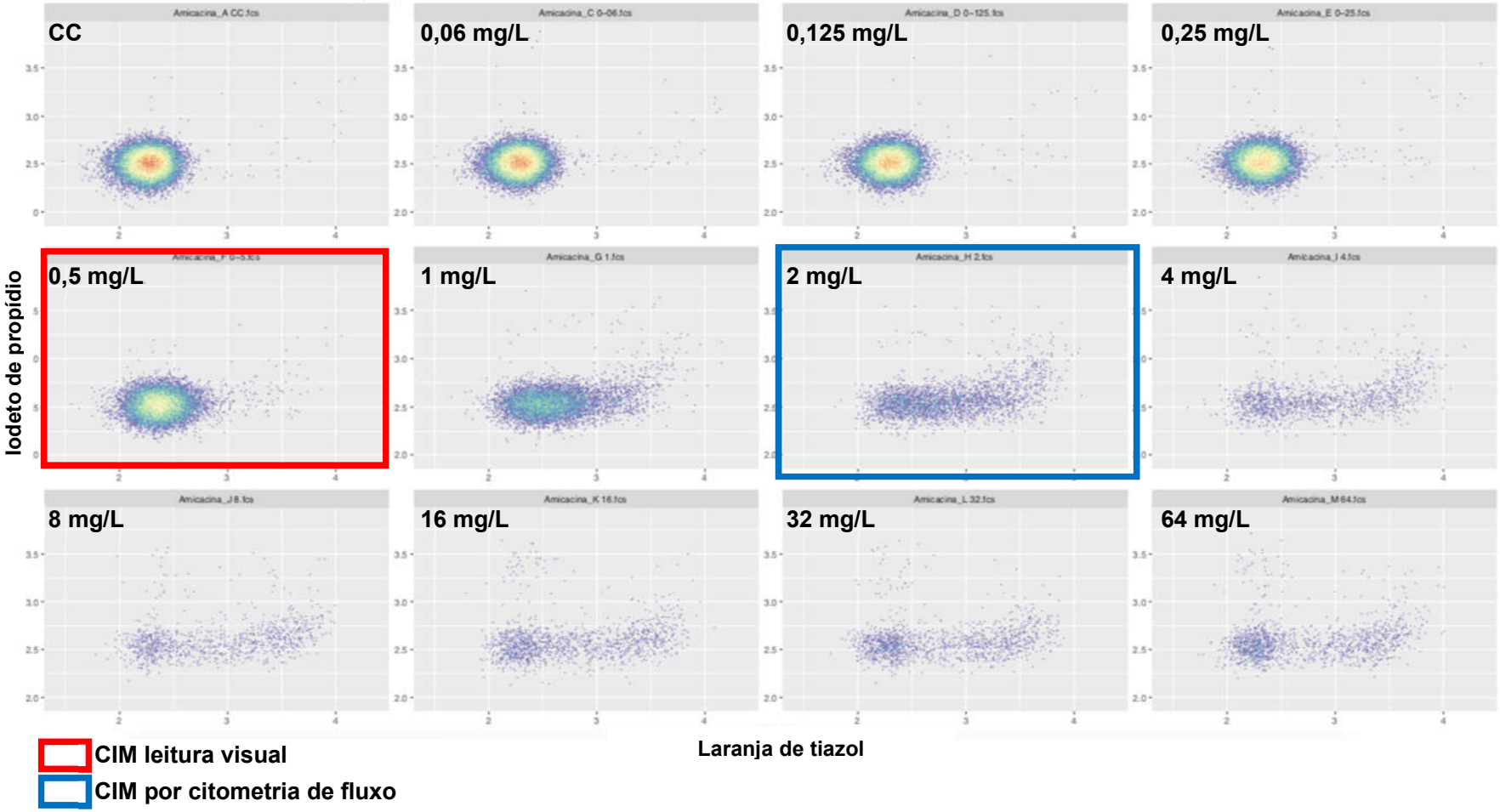
55 – L3081574 - *Escherichia coli* - Meropenem



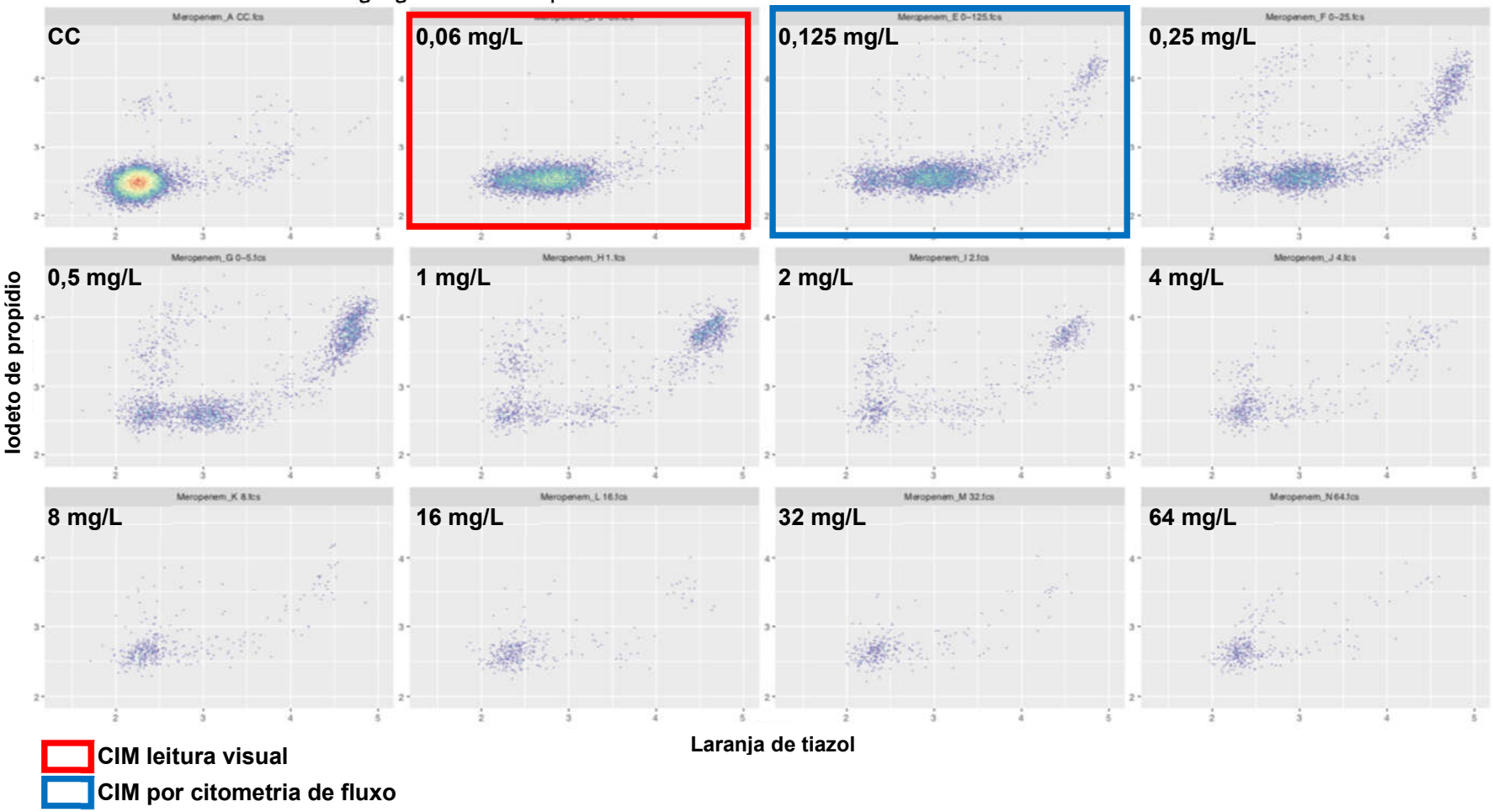
55 – L3081574 - *Escherichia coli* - Polimixina



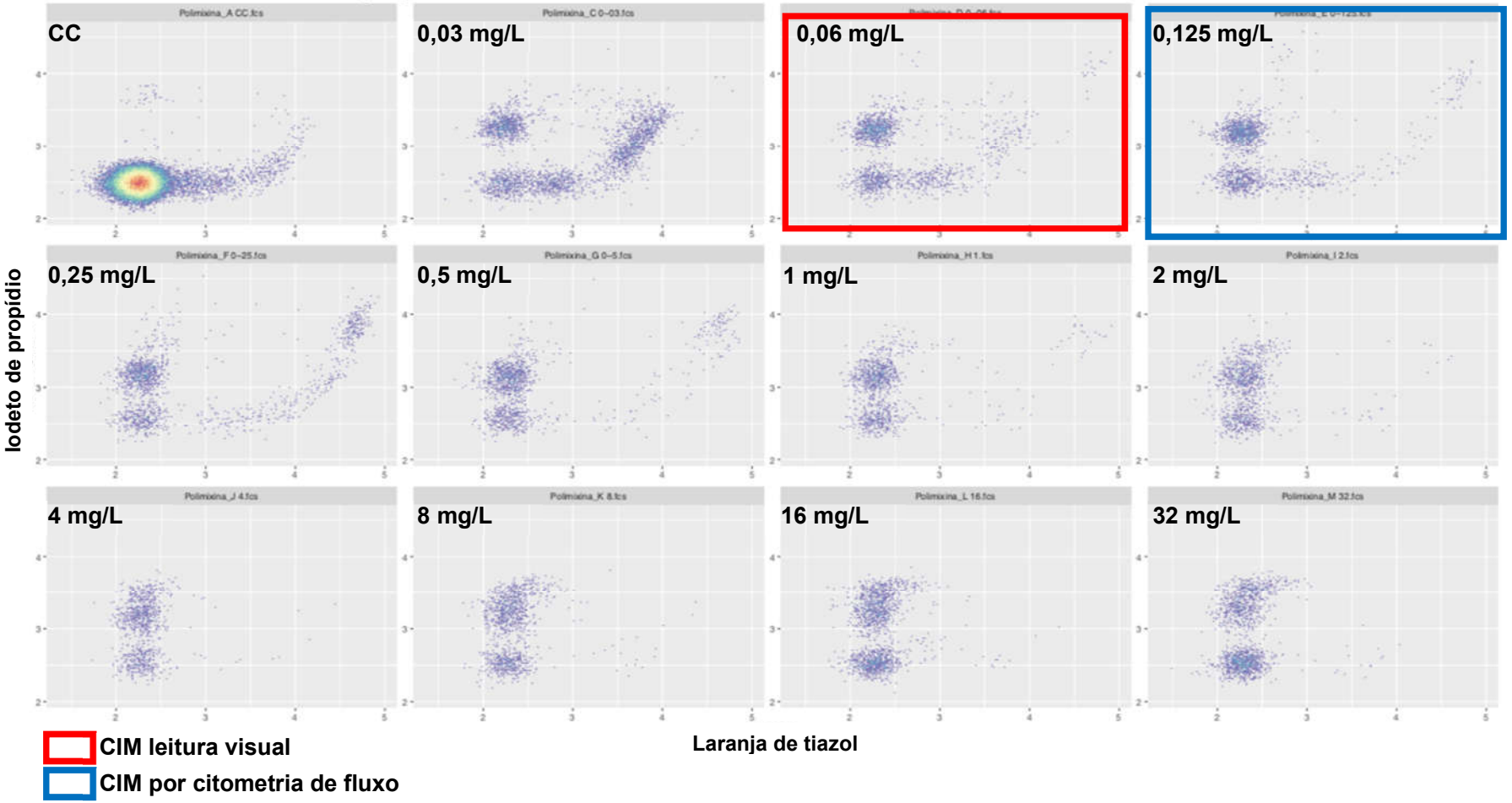
56 – L3091305 - *Pluralibacter gergoviae* - Amicacina



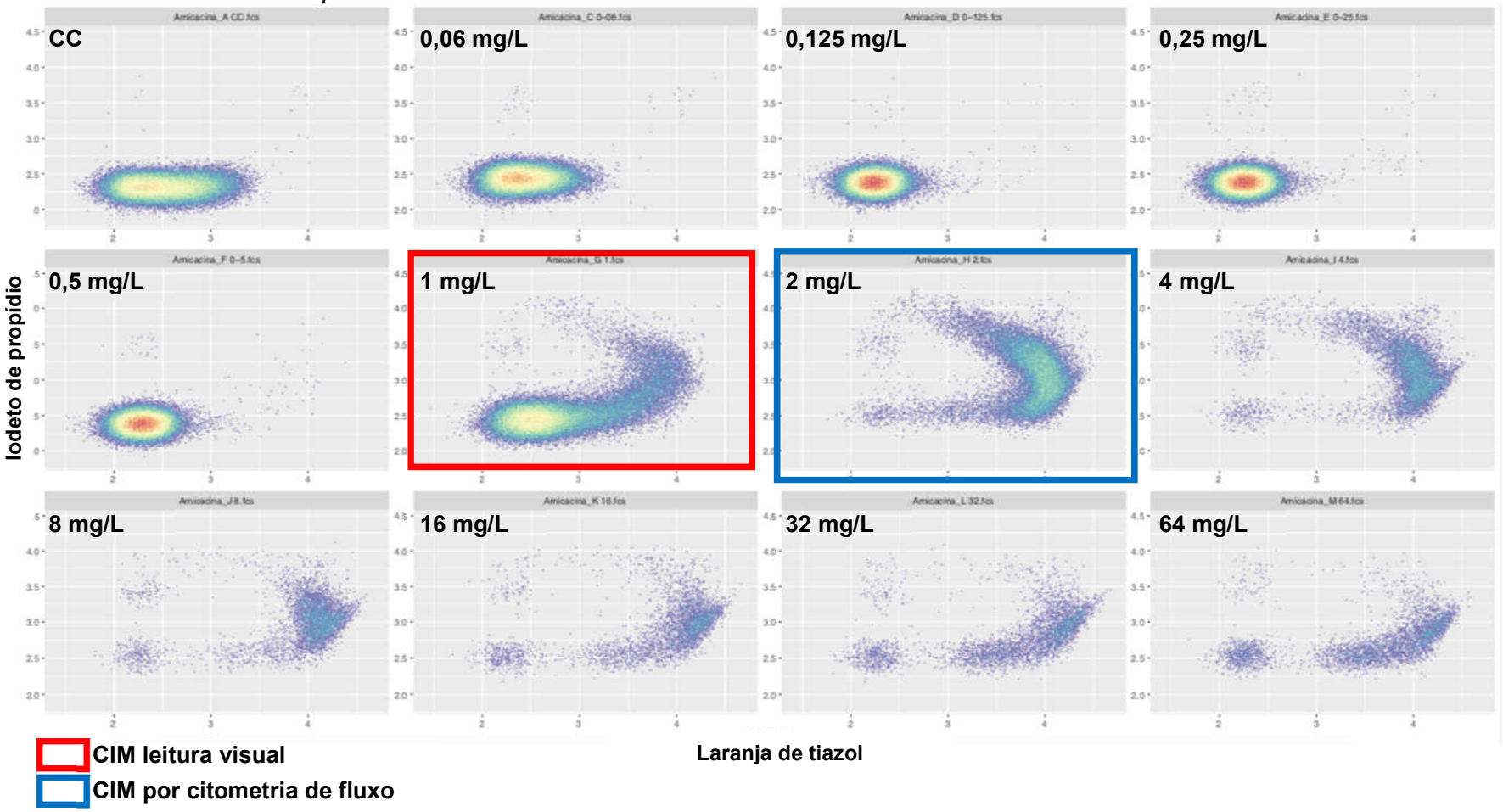
56 – L3091305 - *Pluralibacter gergoviae* - Meropenem



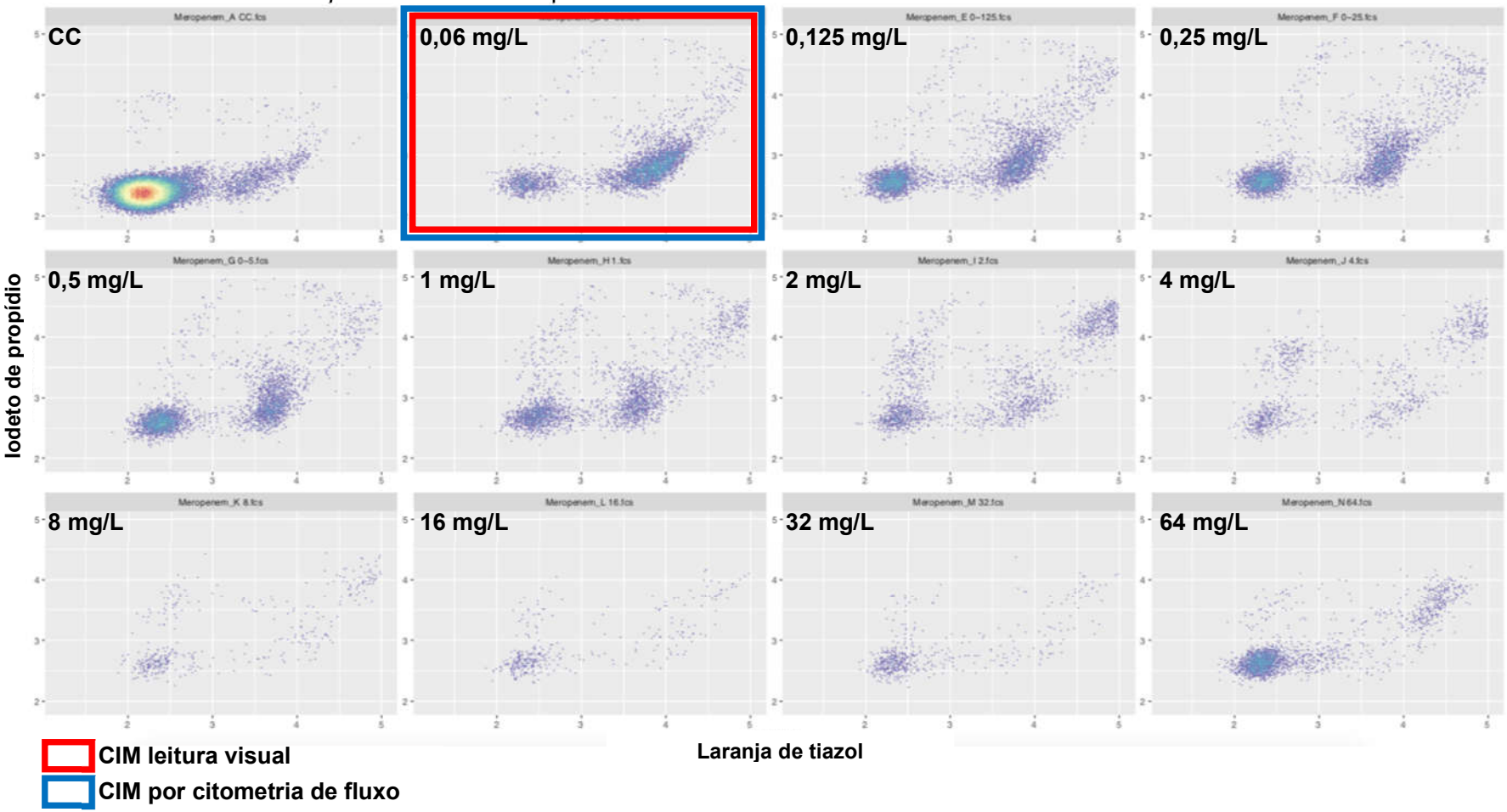
56 – L3091305 - *Pluralibacter gergoviae* - Polimixina



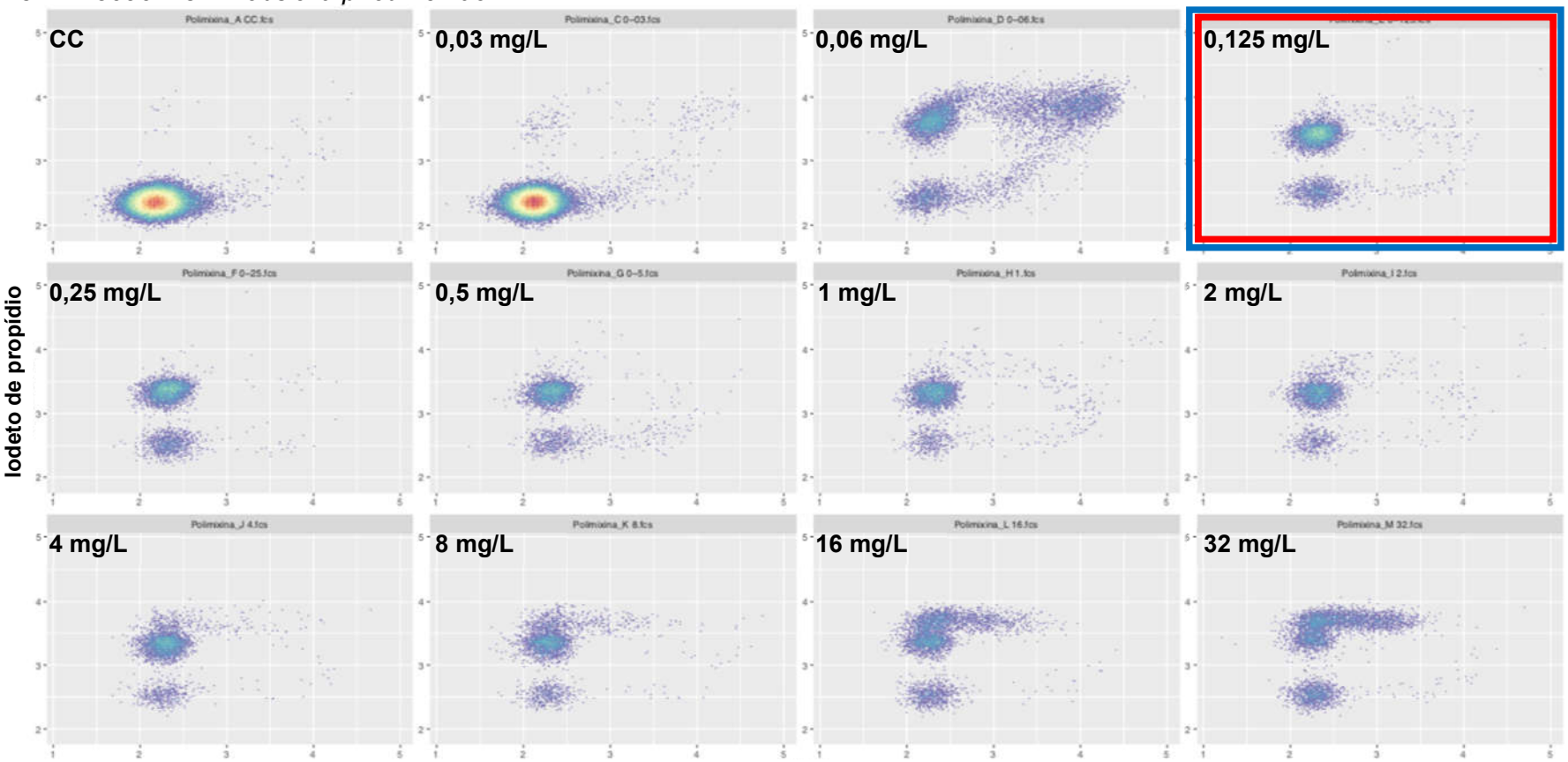
57 – L3090118 - *Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



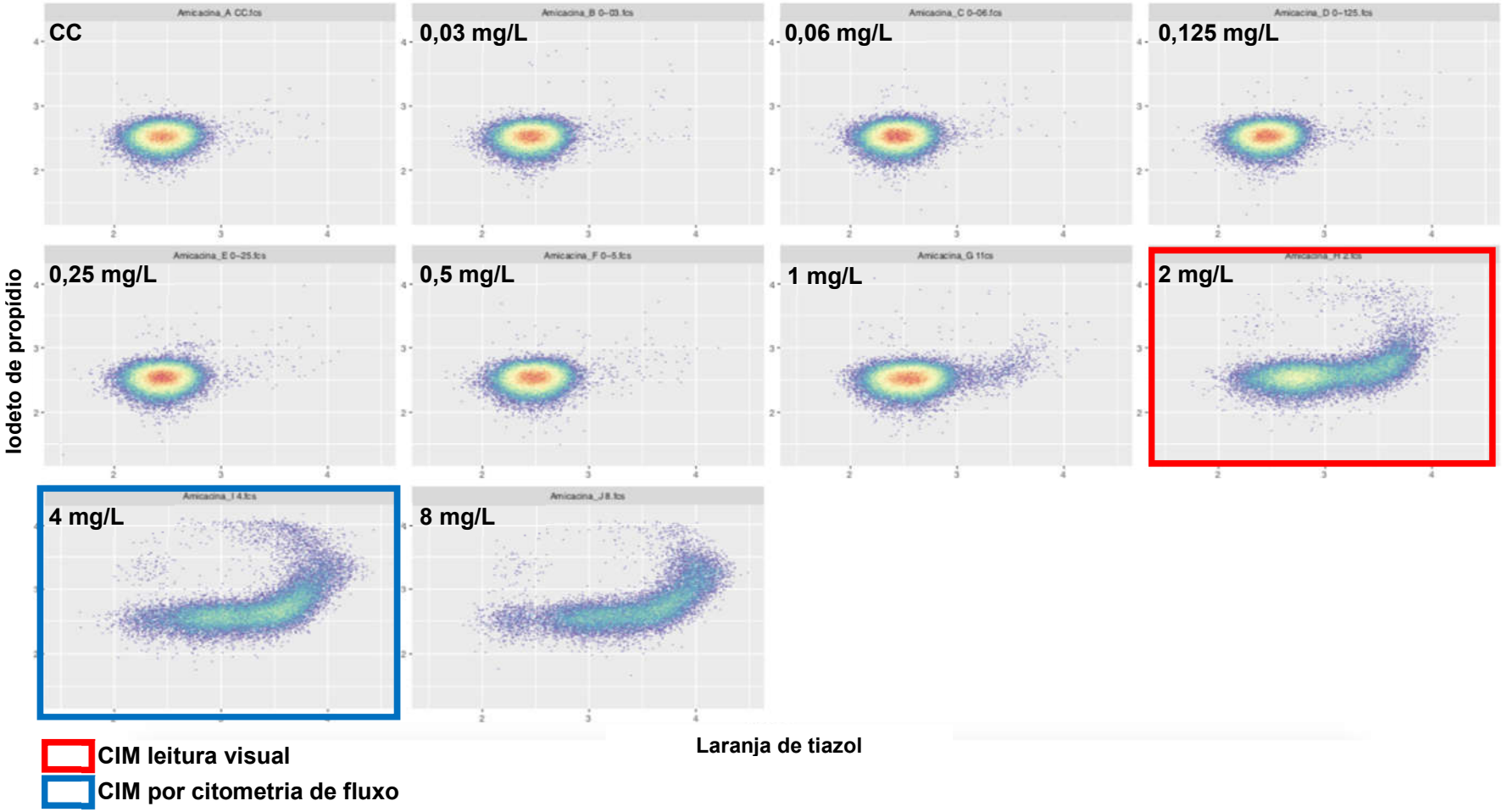
57 – L3090118 - *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



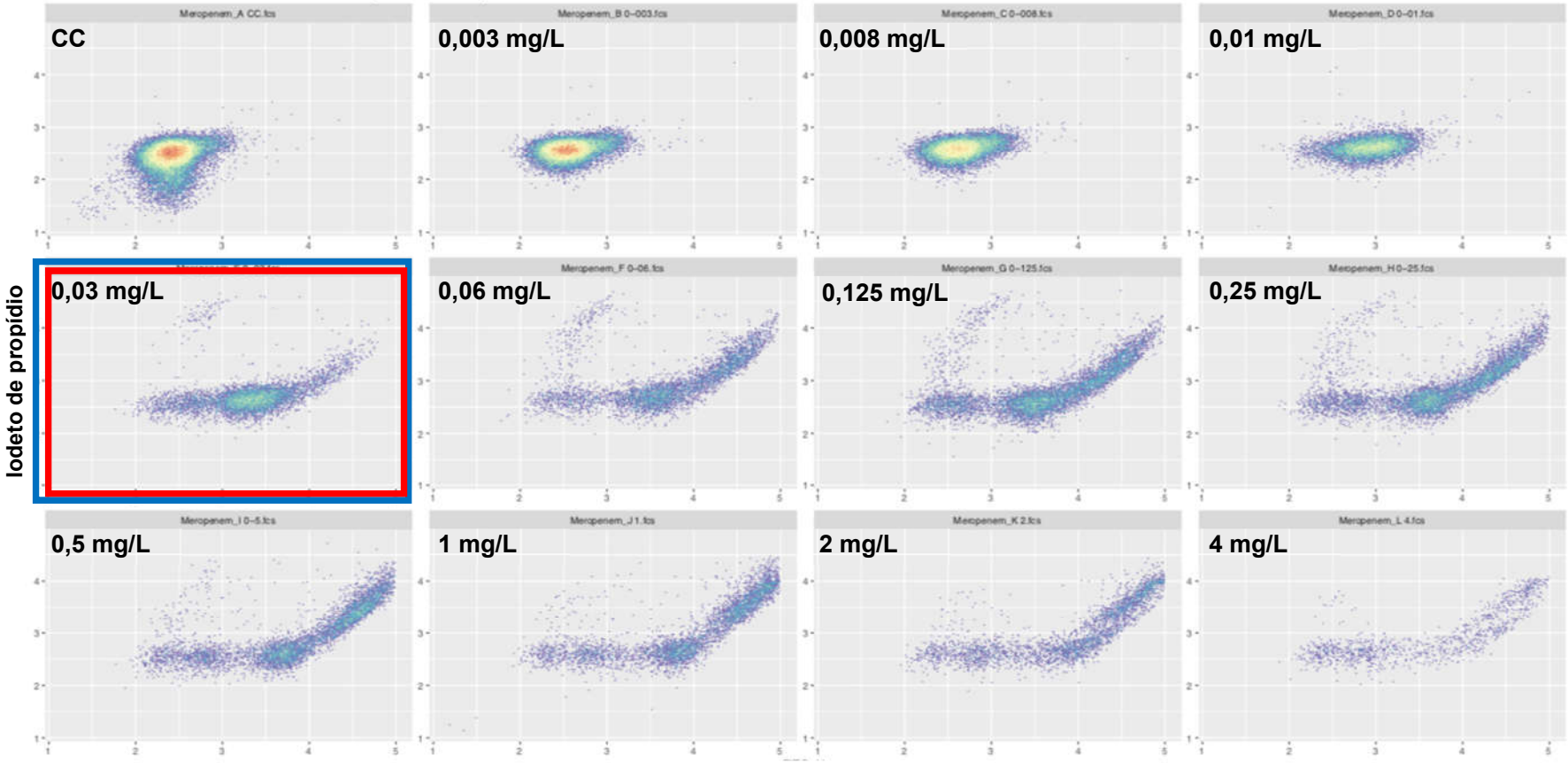
57 – L3090118 - *Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



T1 – K9270147 - *Salmonella sp.* - Amicacina



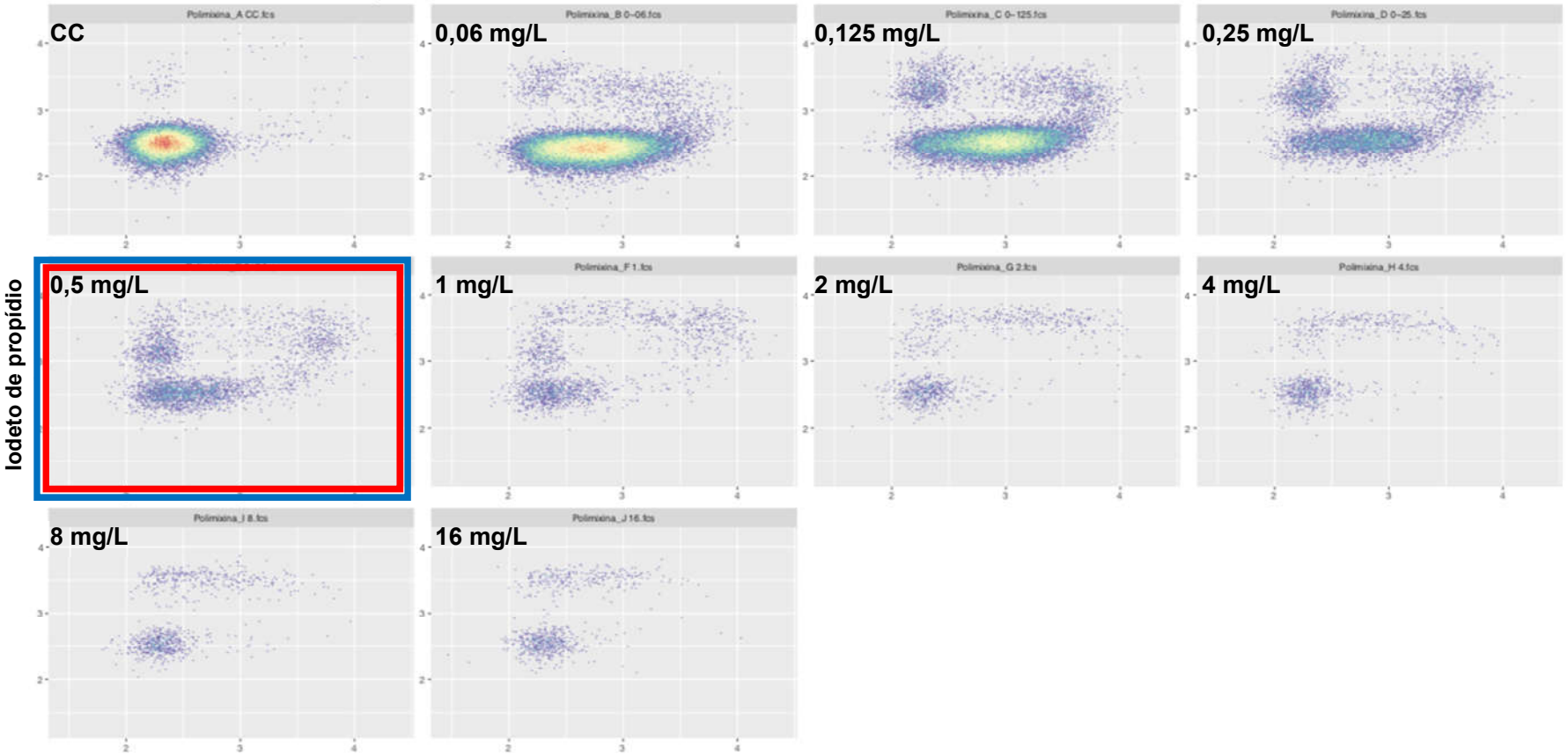
T1 – K9270147 - *Salmonella sp.* - Meropenem



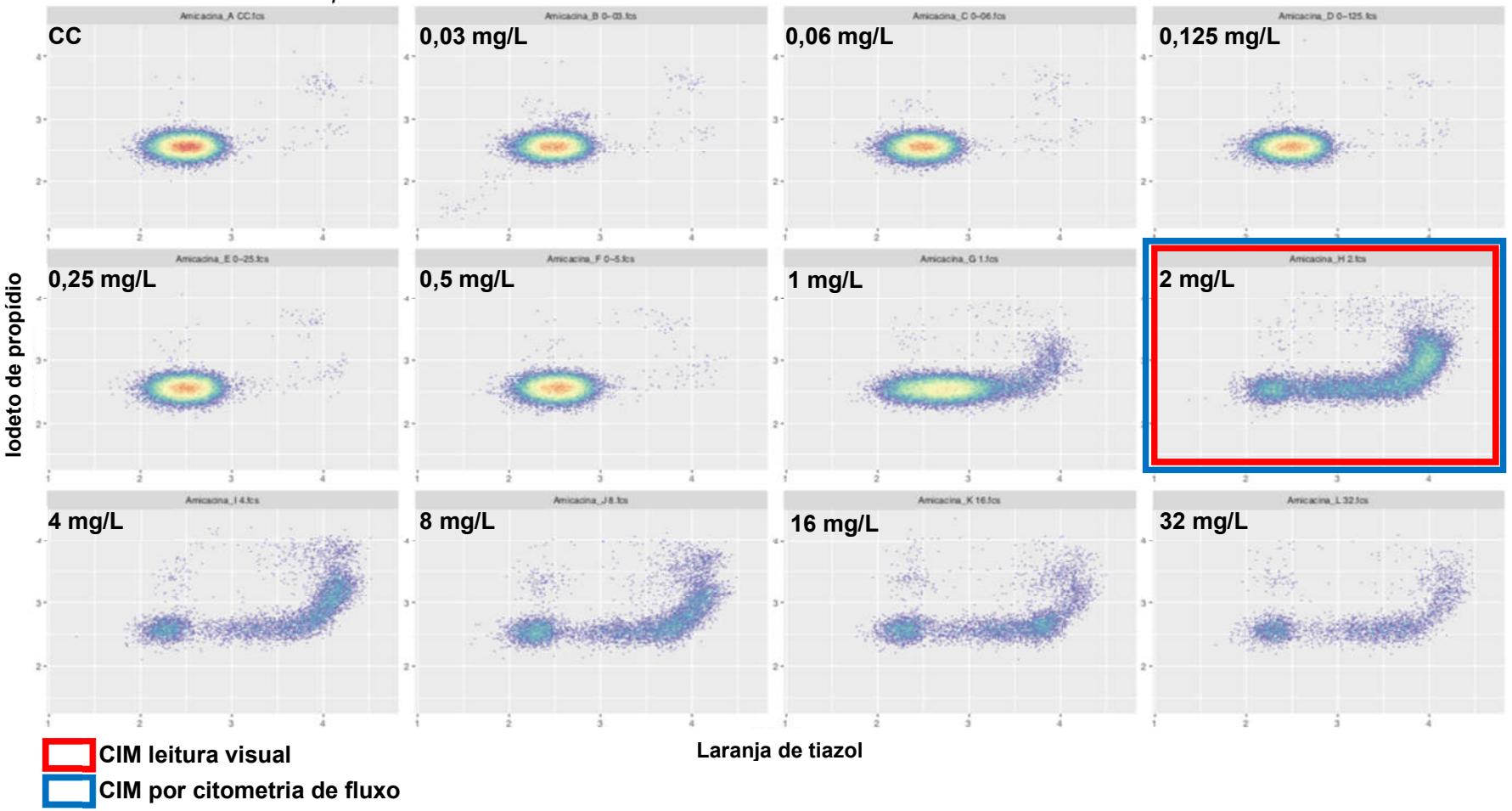
CIM leitura visual

CIM por citometria de fluxo

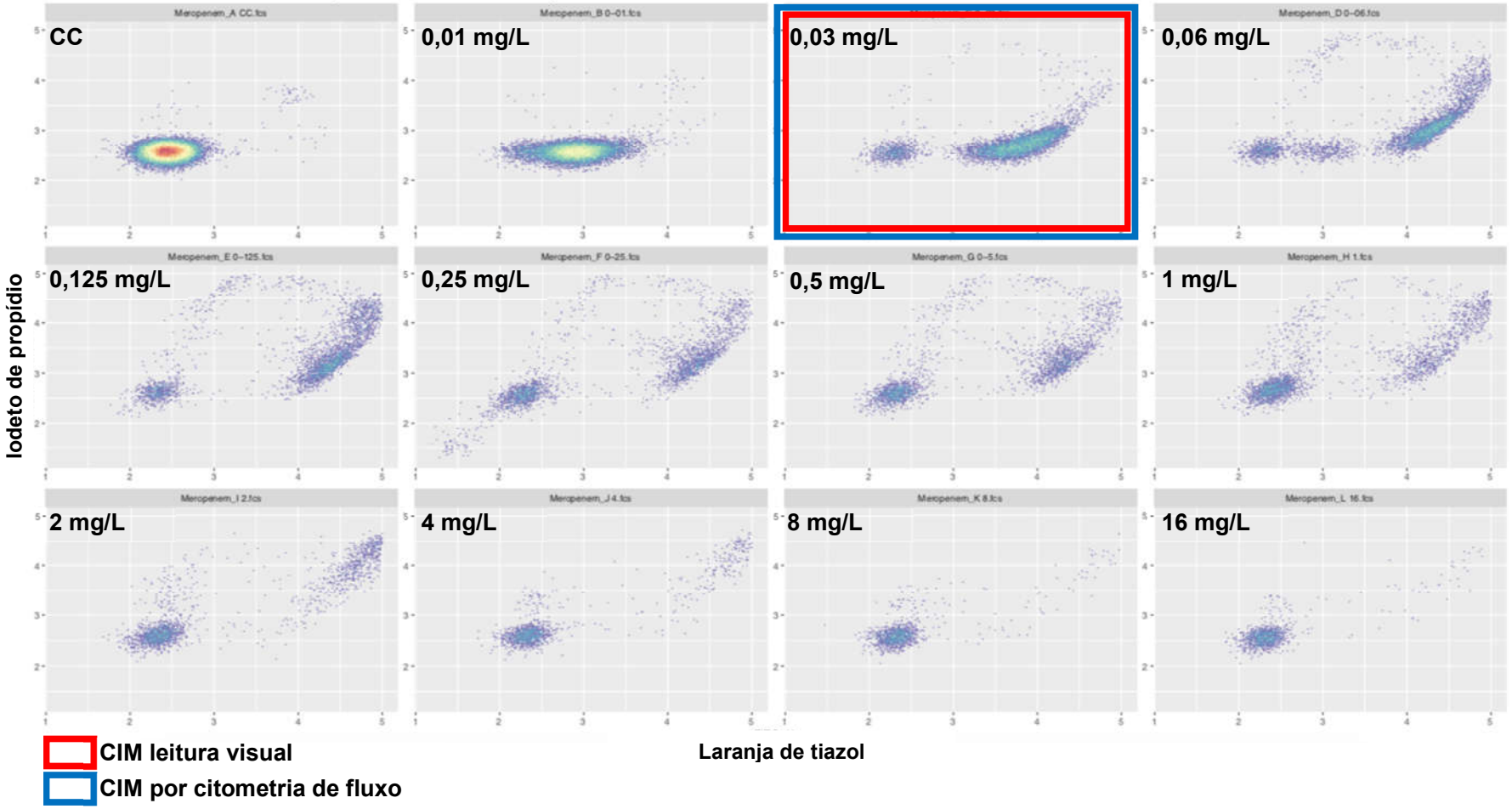
T1 – K9270147 - *Salmonella sp.* - Polimixina



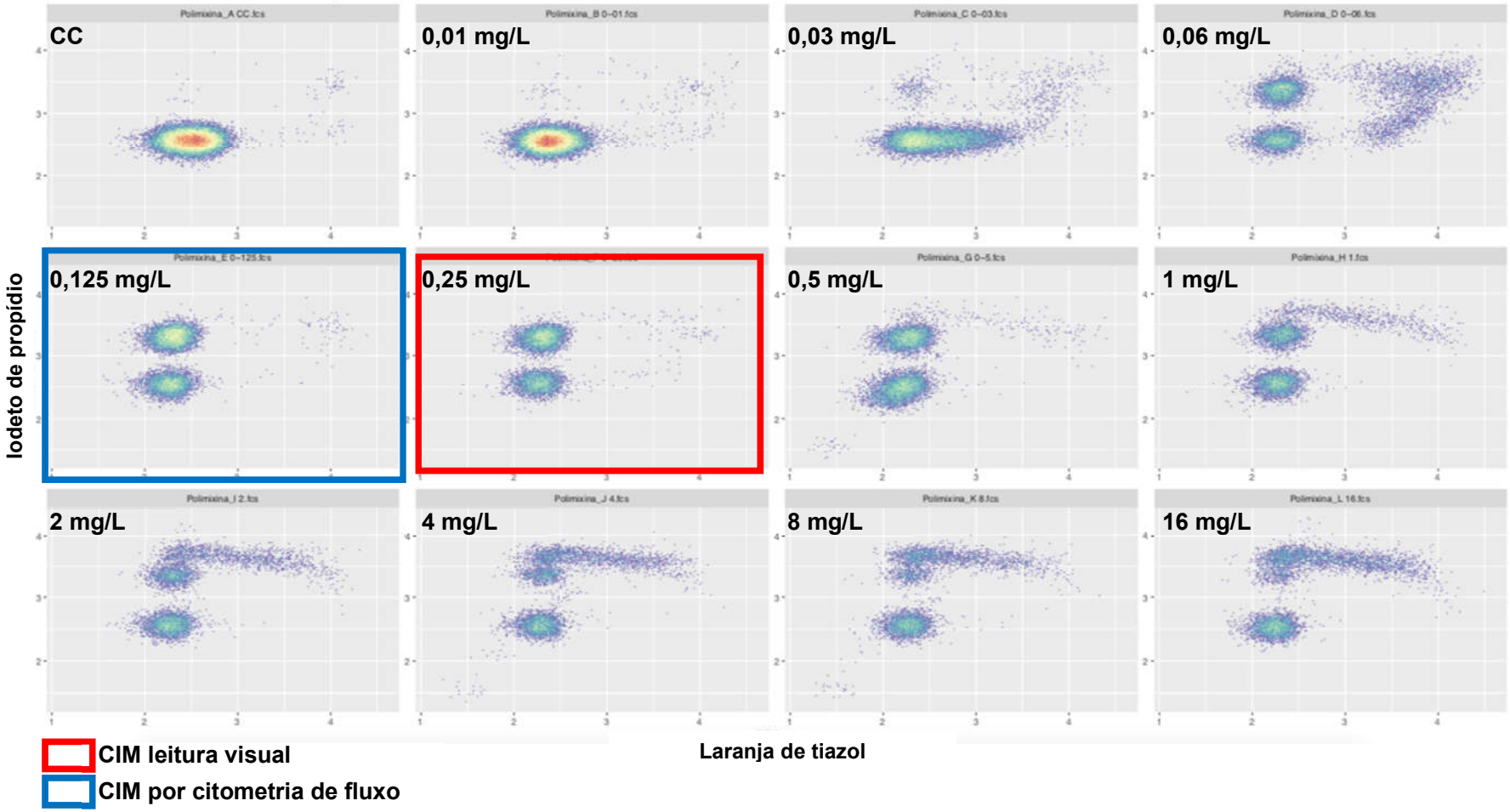
T2 – L0122031 - *Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



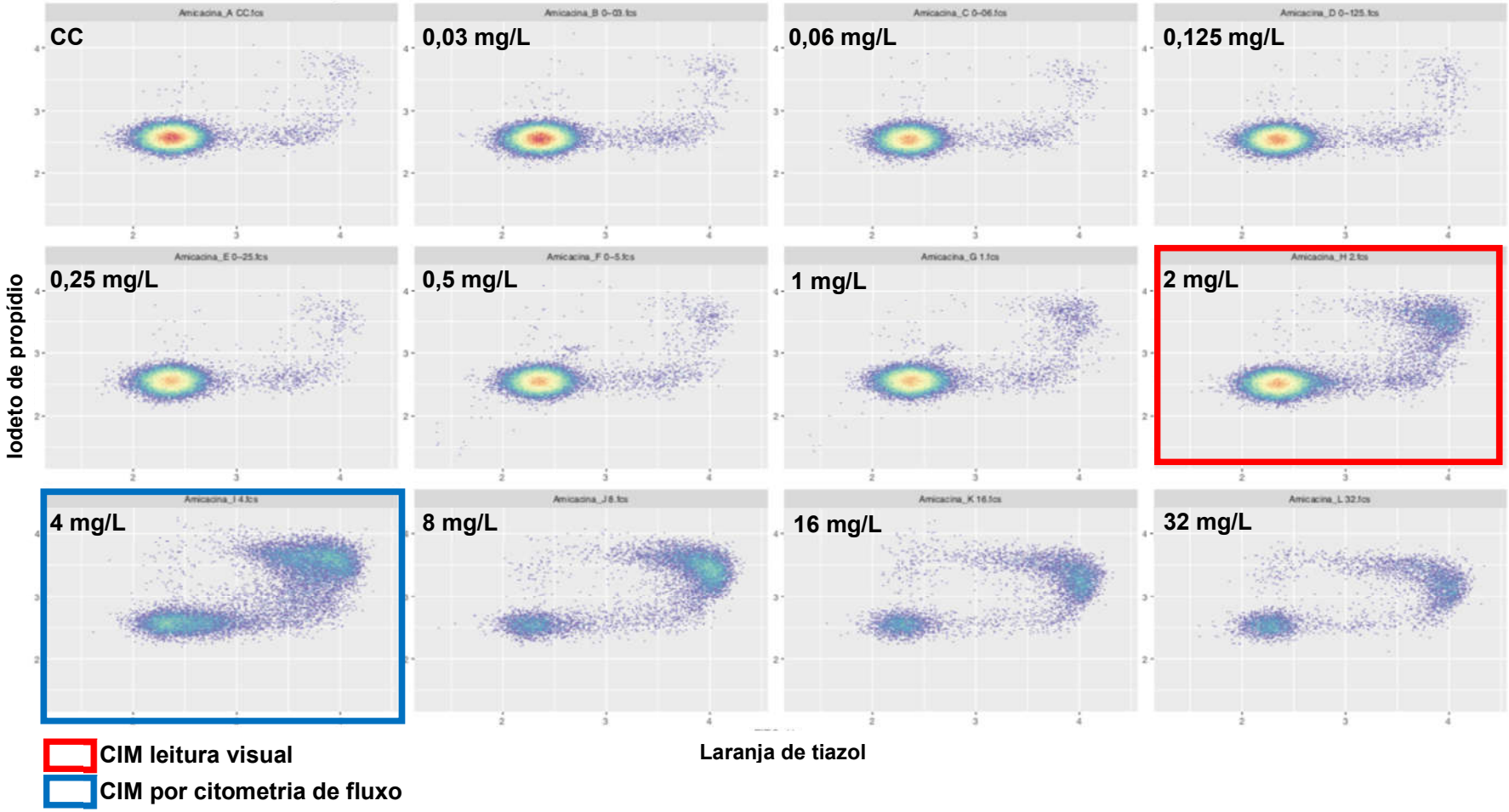
T2 – L0122031 - *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



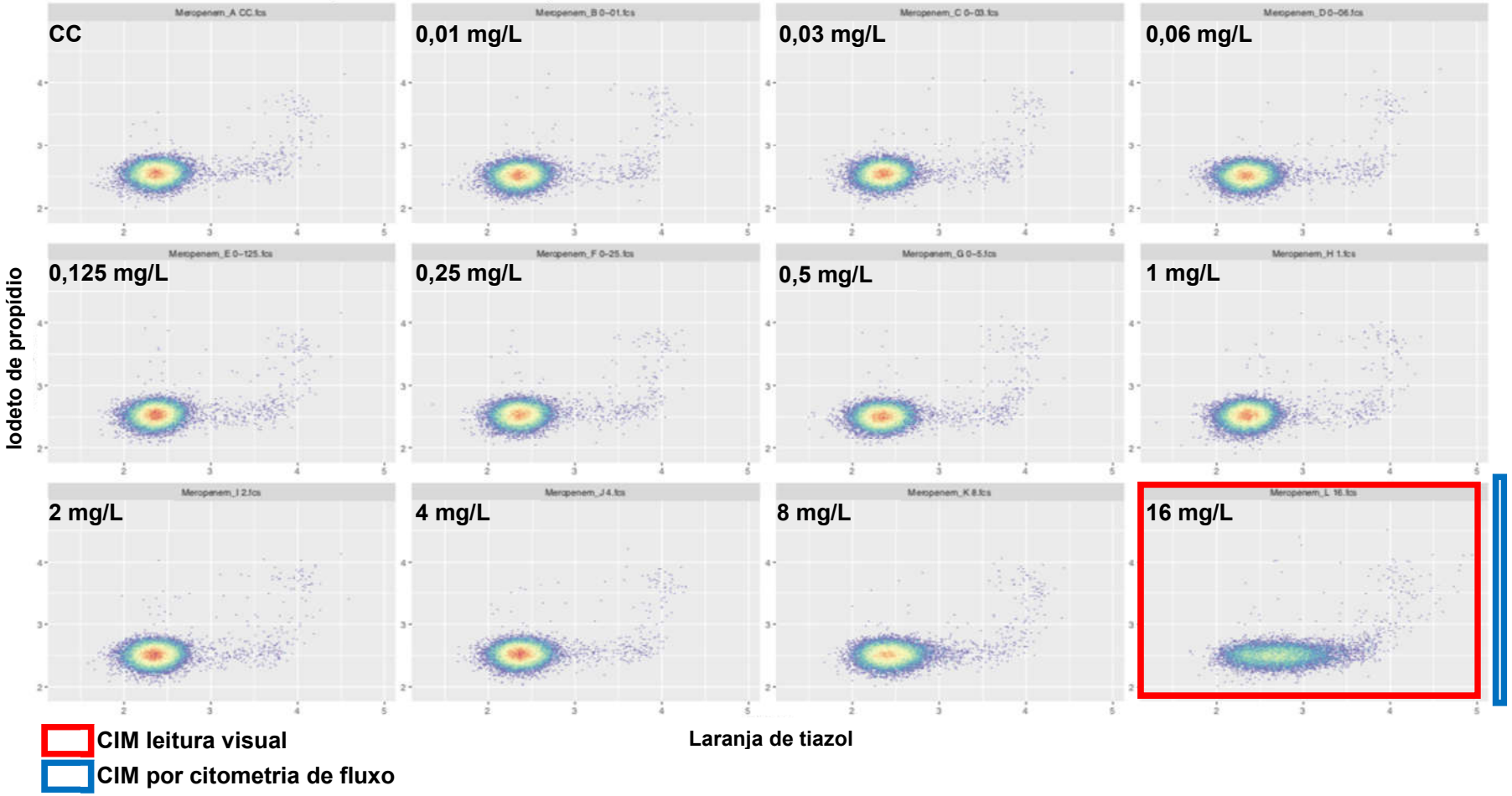
T2 – L0122031 - *Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



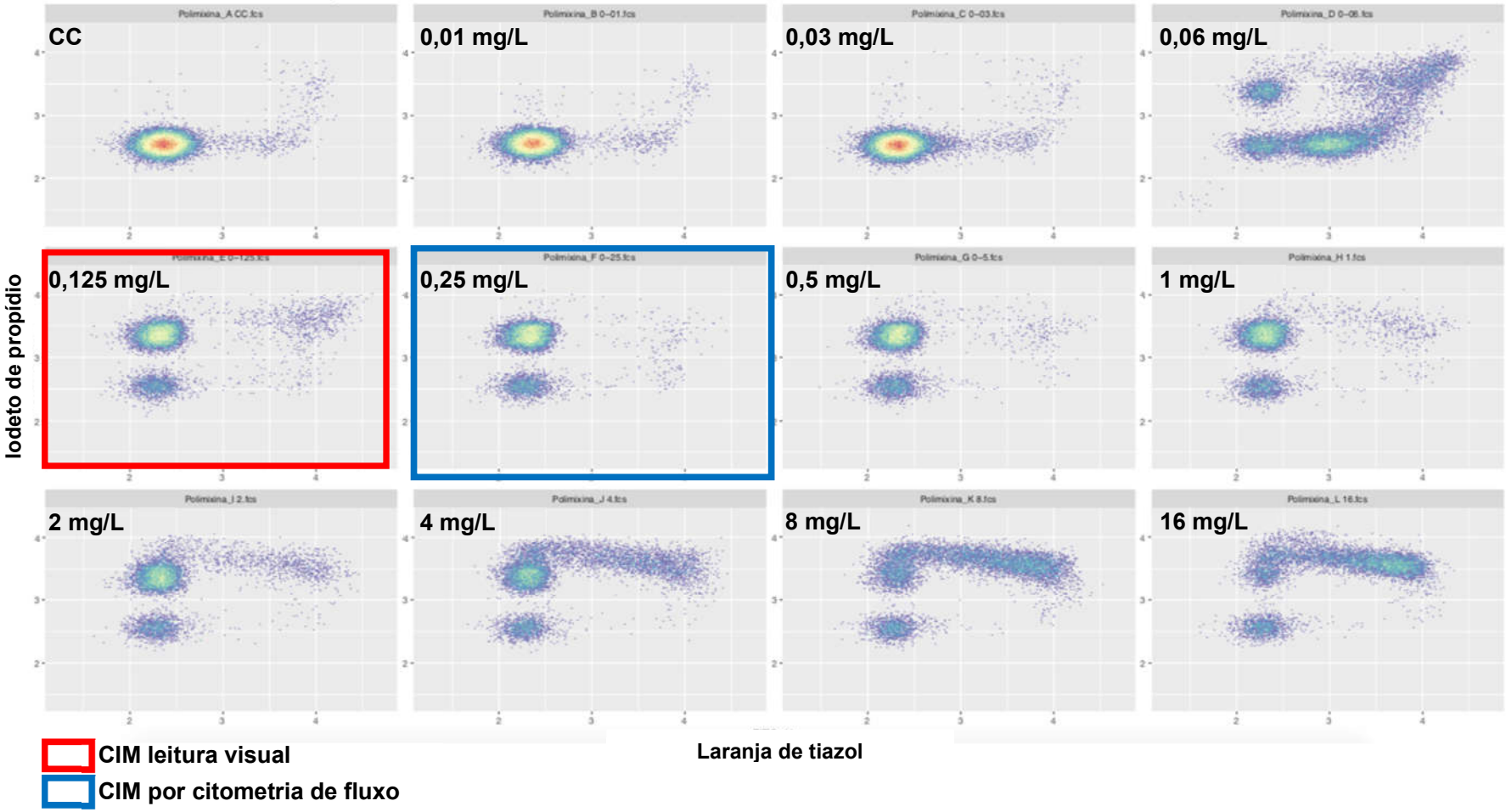
T3 – L0123398 - *Klebsiella pneumoniae* - Amicacina



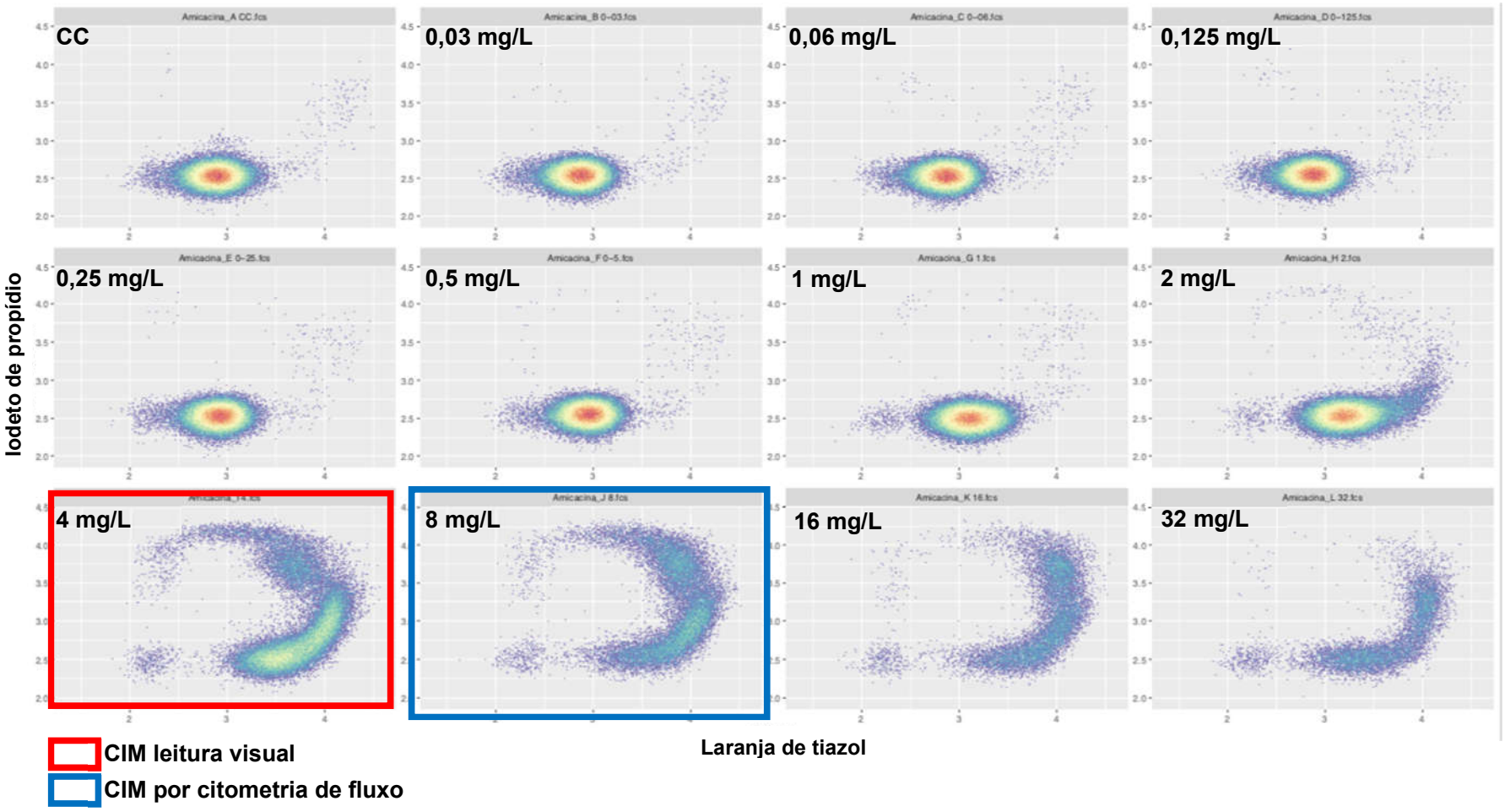
T3 – L0123398 - *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem



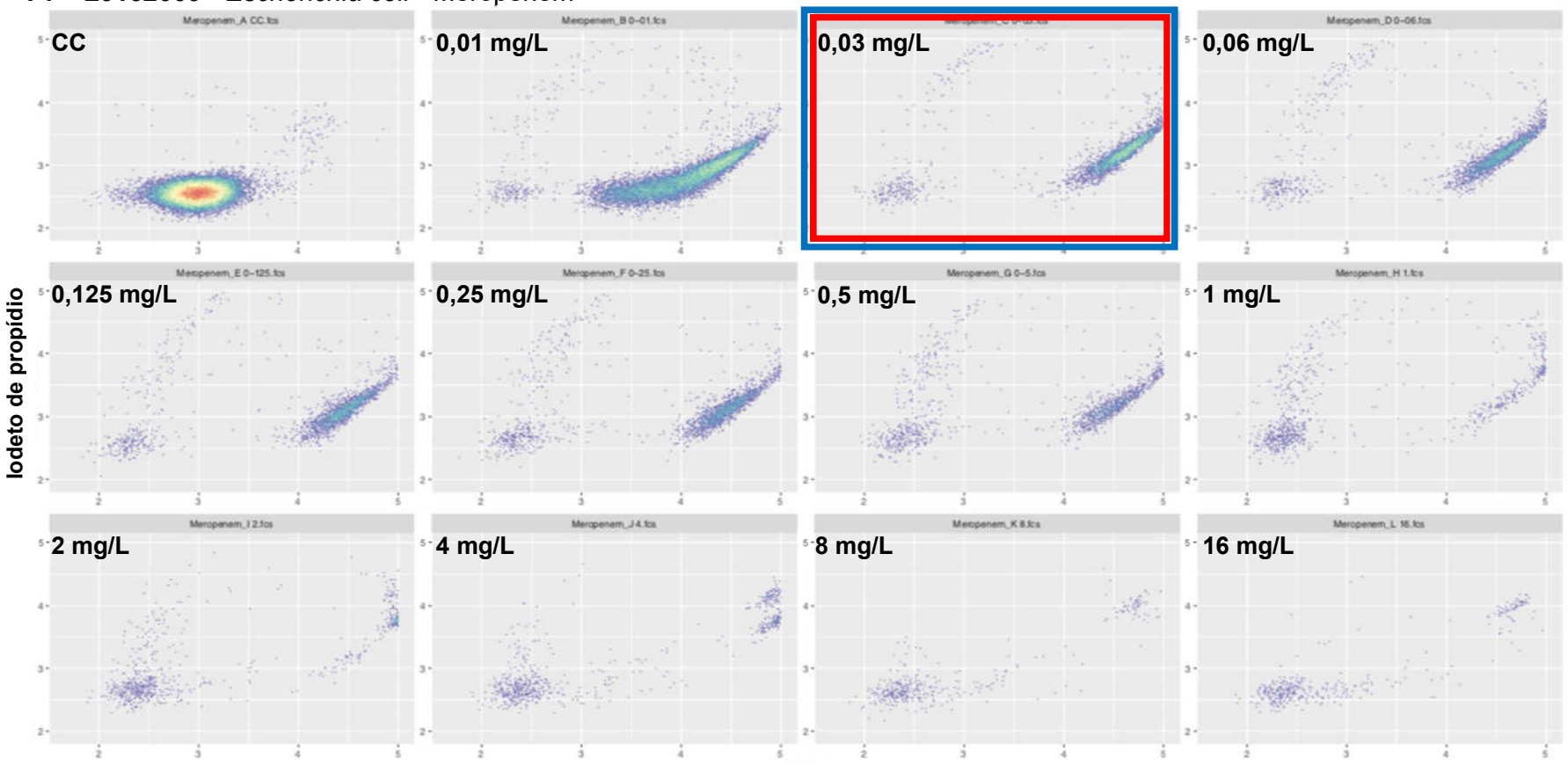
T3 – L0123398 - *Klebsiella pneumoniae* - Polimixina



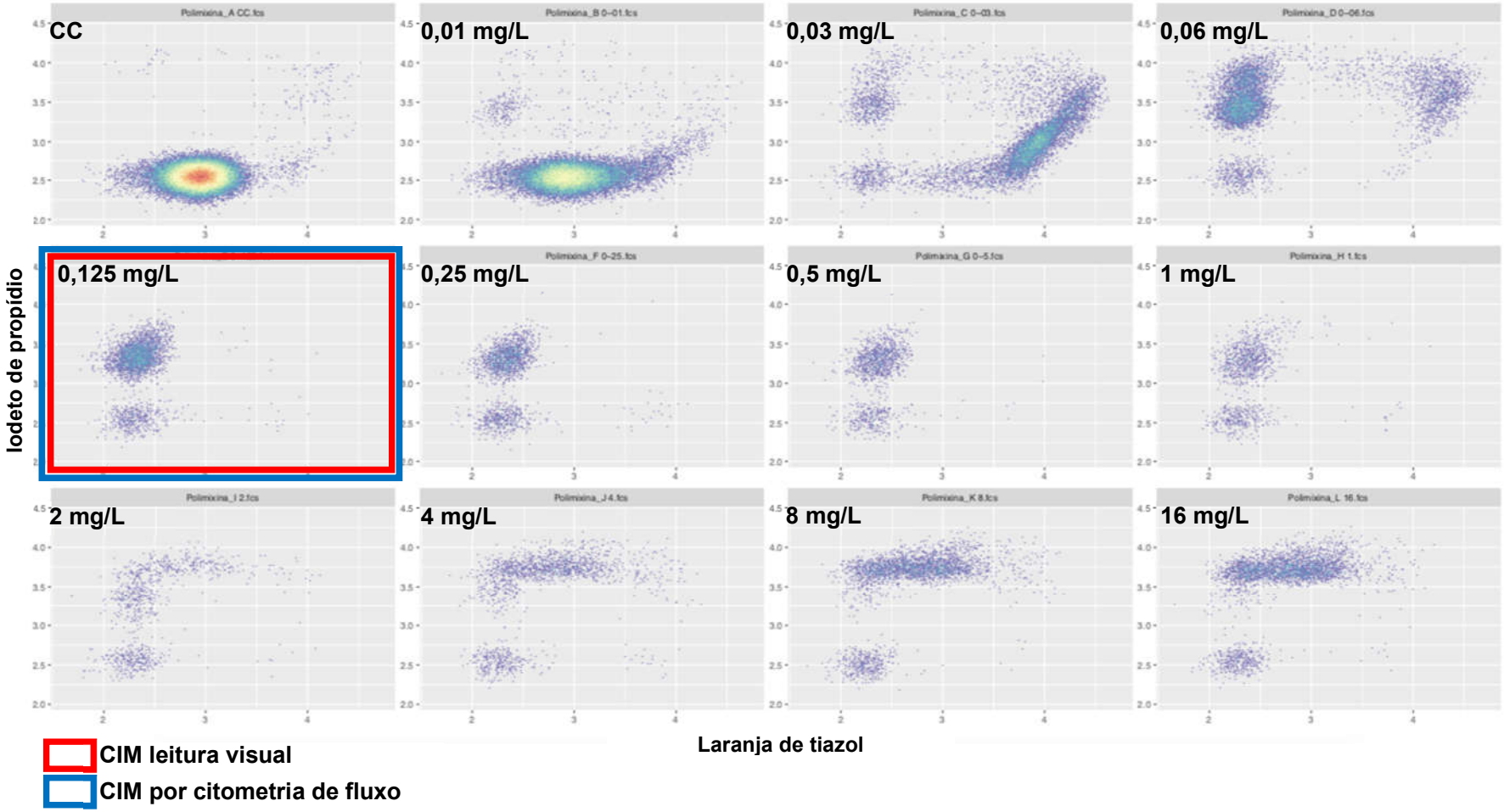
T4 – L0162009 - *Escherichia coli* - Amicacina



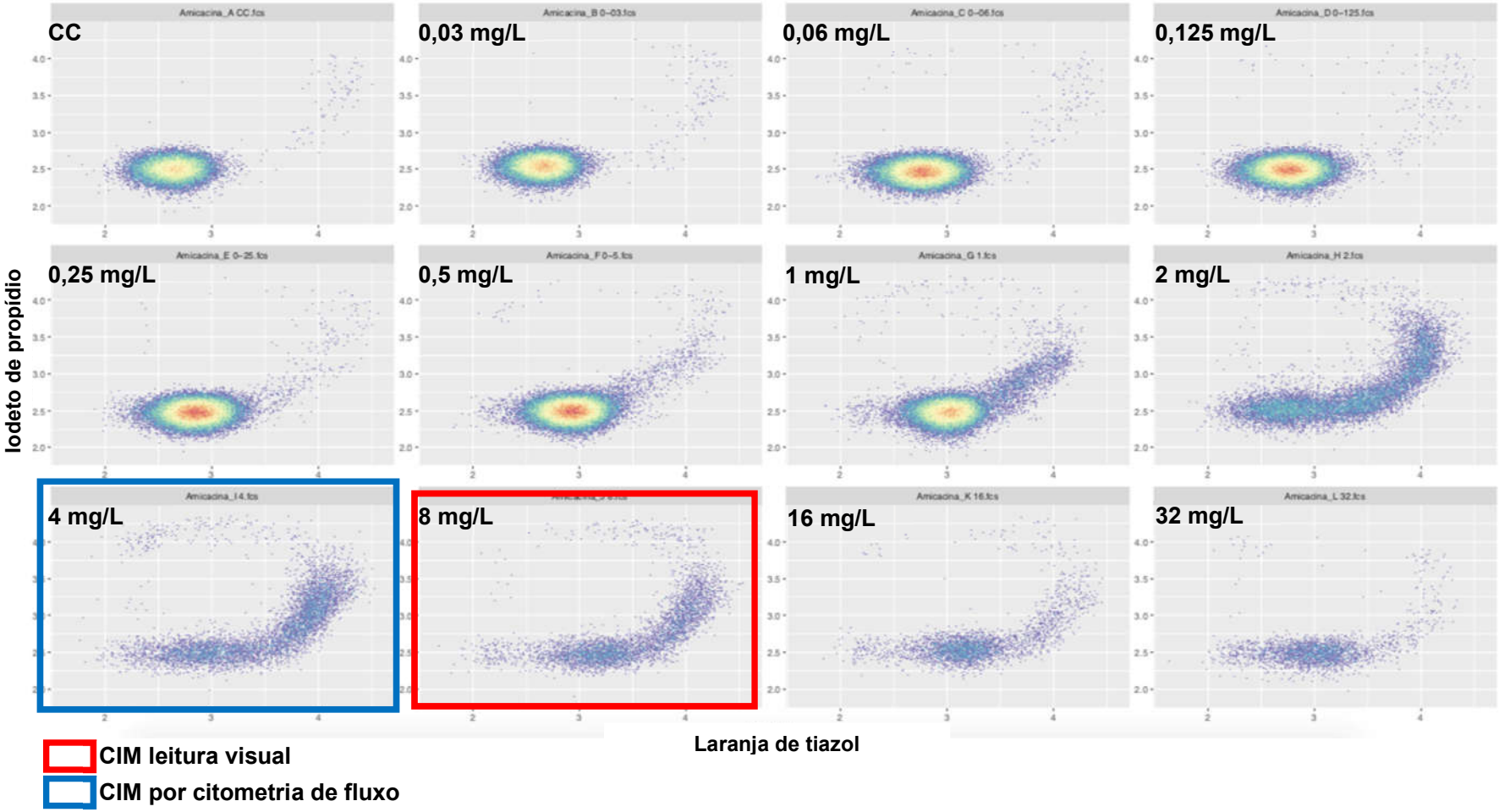
T4 – L0162009 - *Escherichia coli* - Meropenem



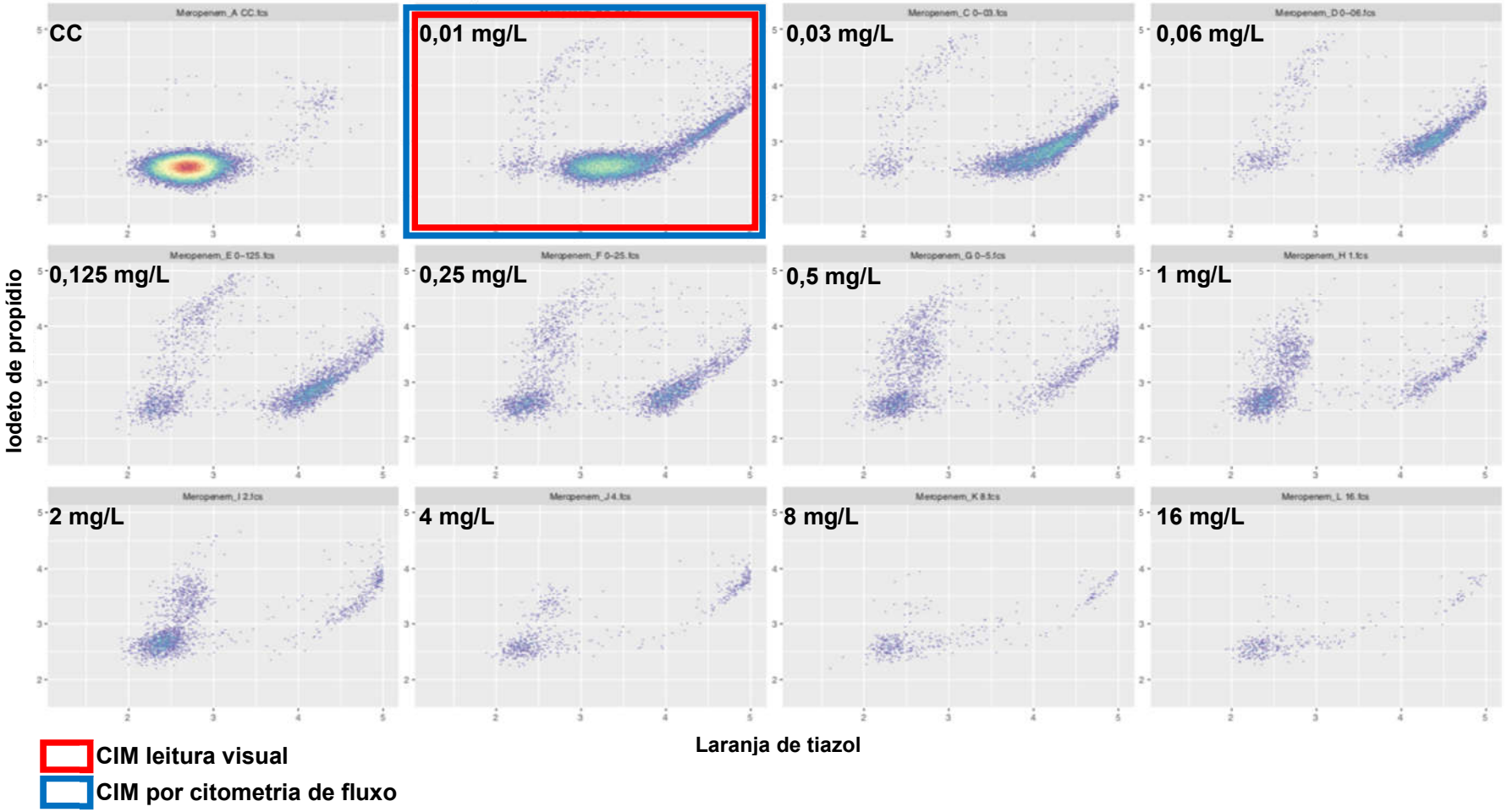
T4 – L0162009 - *Escherichia coli* - Polimixina



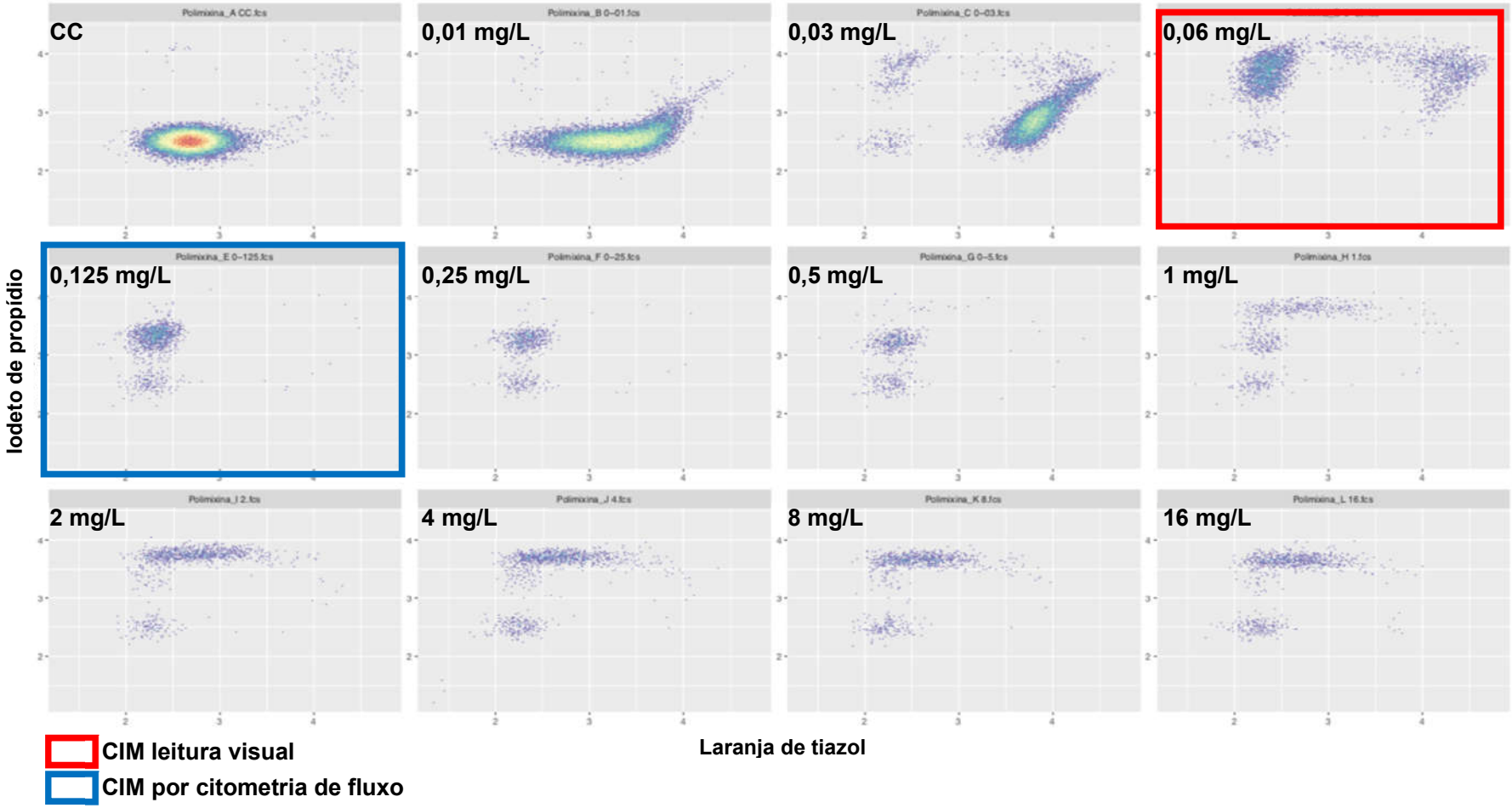
T5 – L0161705 - *Escherichia coli* - Amicacina



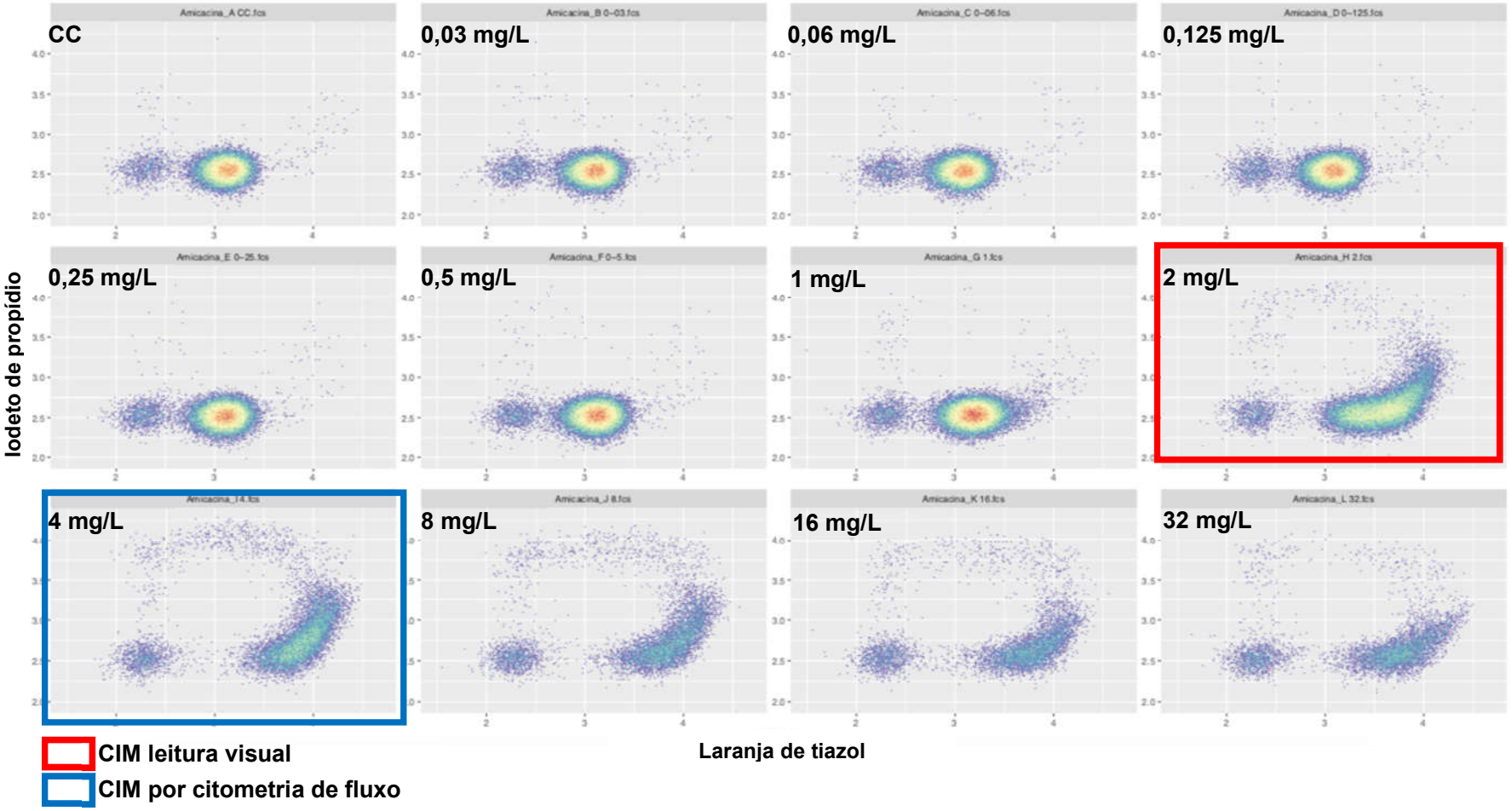
T5 – L0161705 - *Escherichia coli* - Meropenem



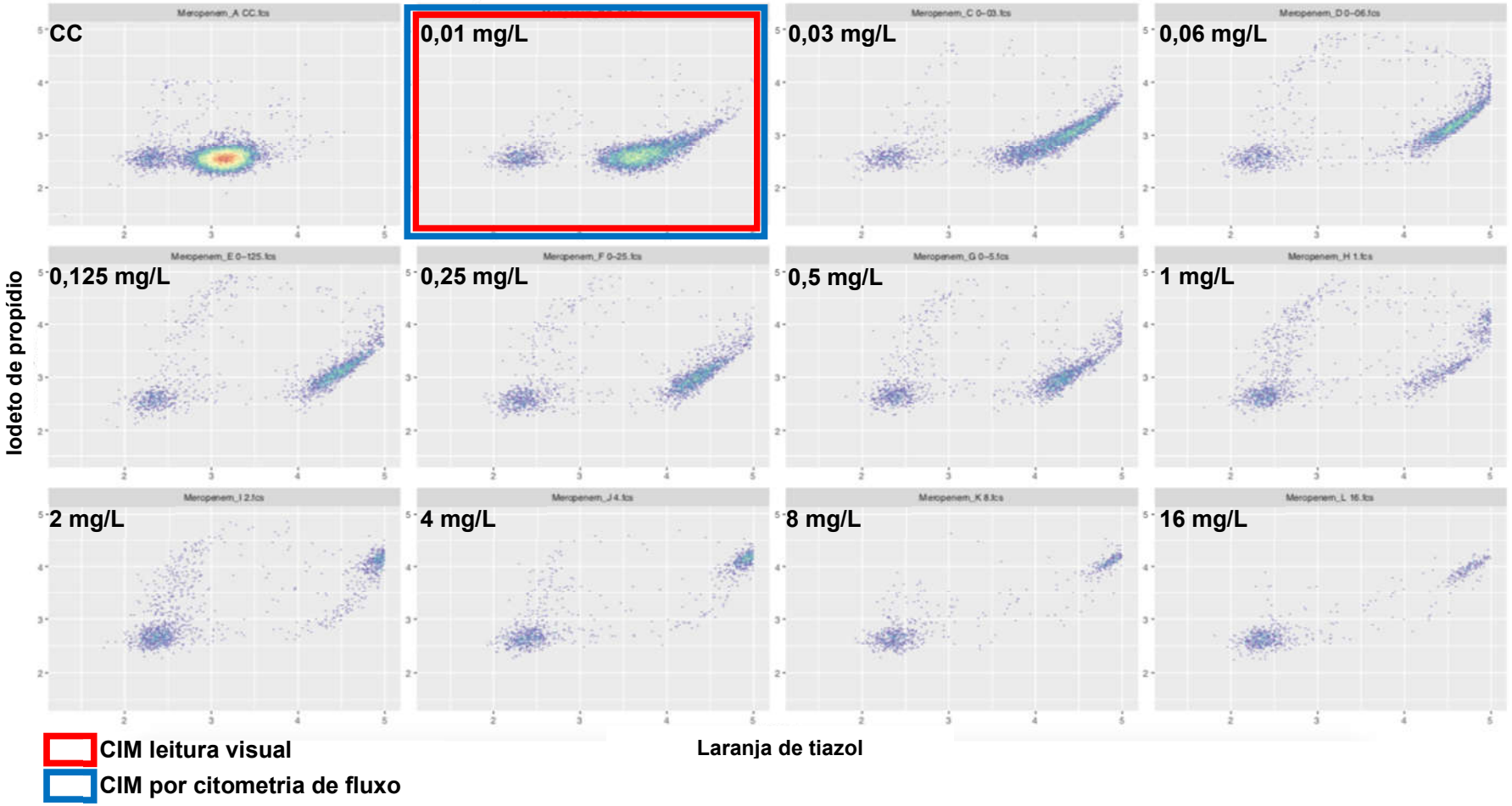
T5 – L0161705 - *Escherichia coli* - Polimixina



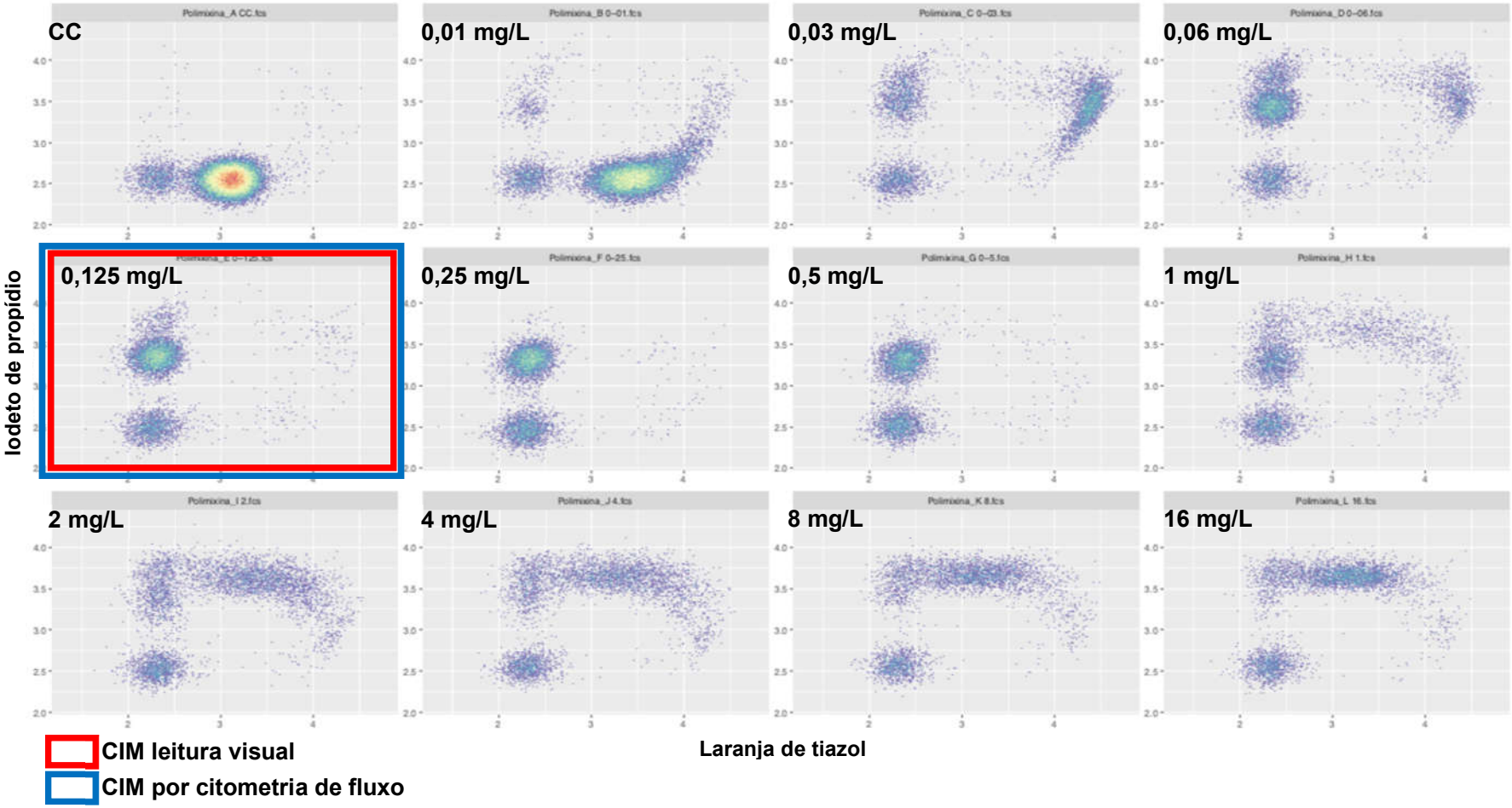
T6 – L0174970 - *Escherichia coli* - Amicacina



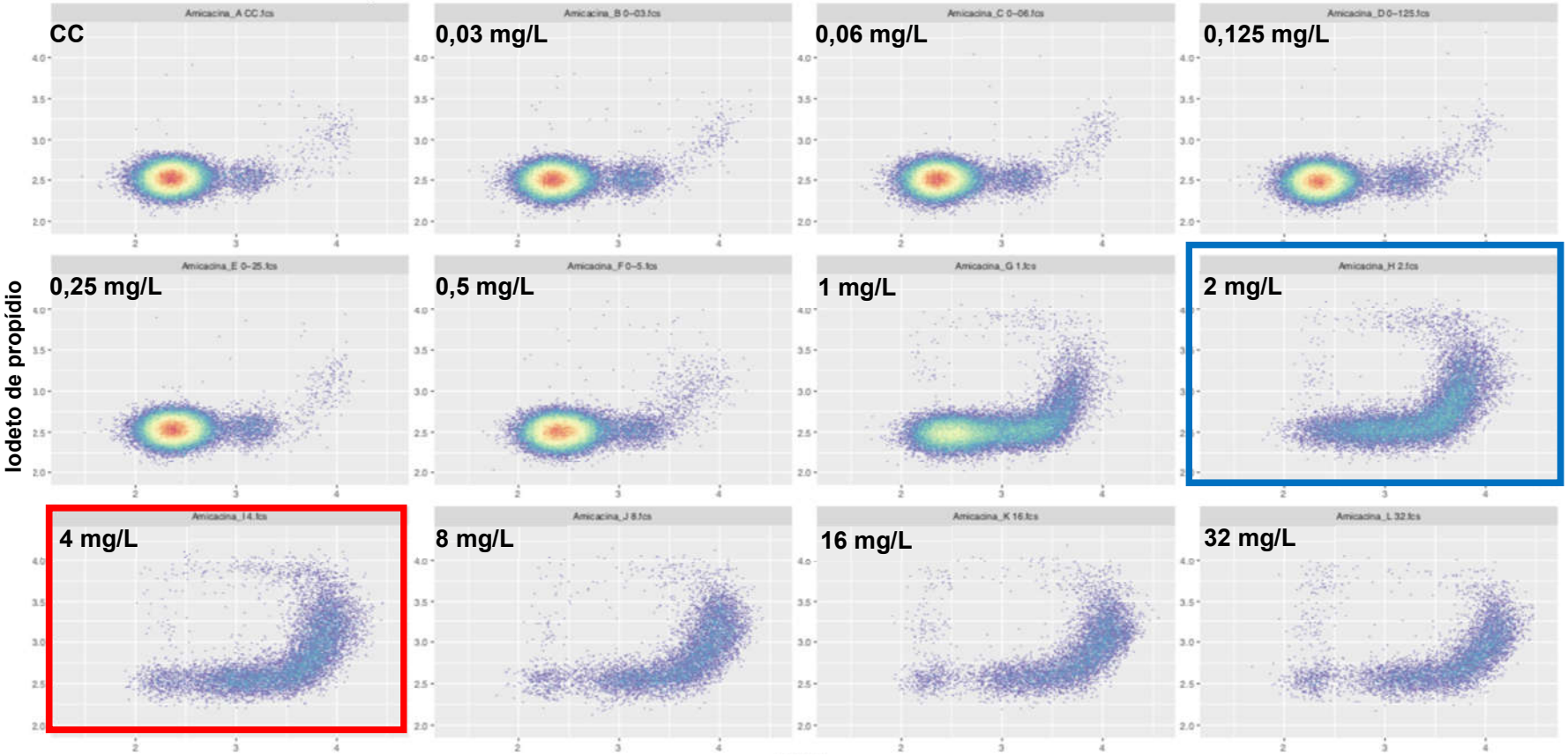
T6 – L0174970 - *Escherichia coli* - Meropenem



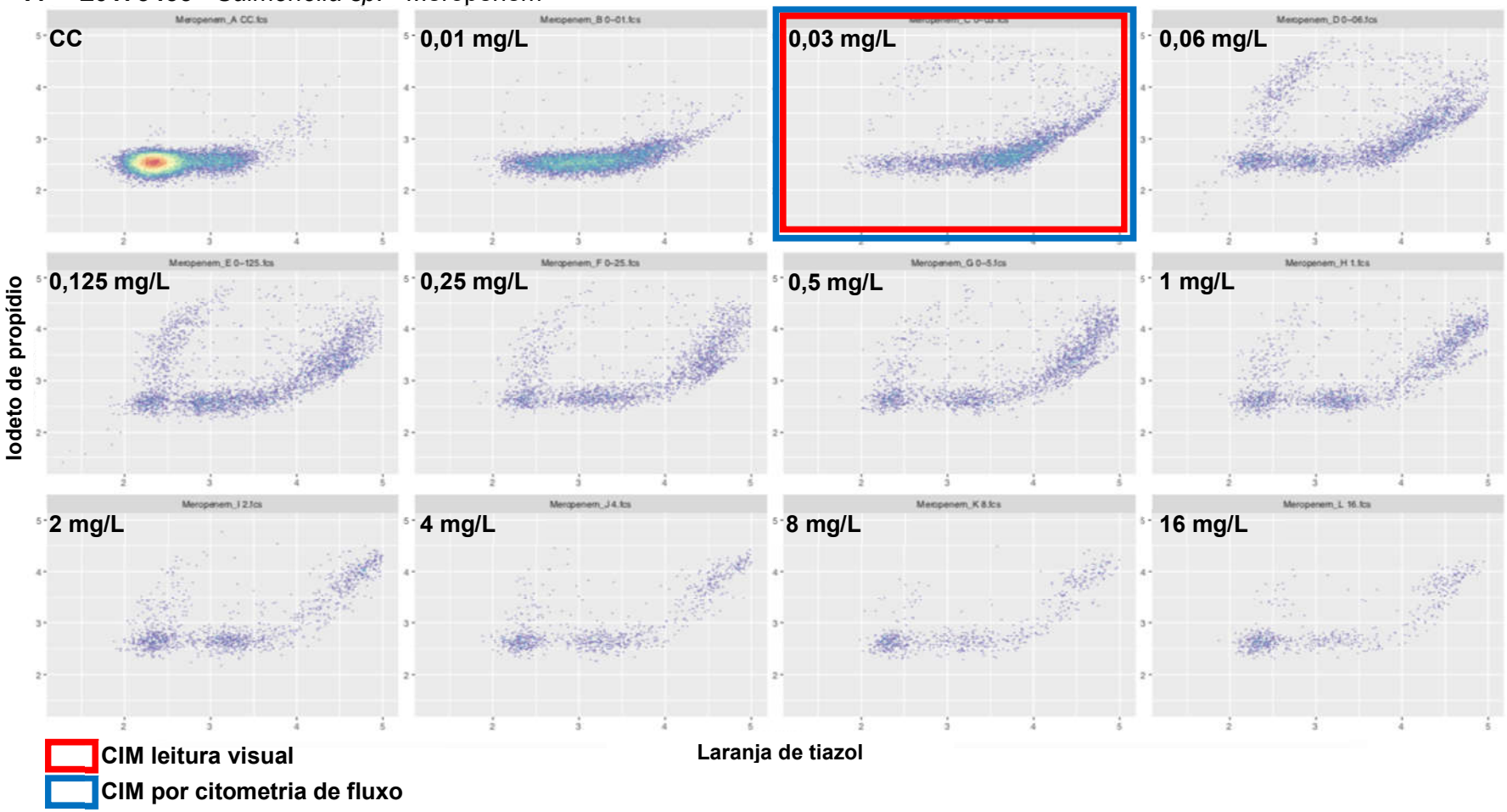
T6 – L0174970 - *Escherichia coli* - Polimixina



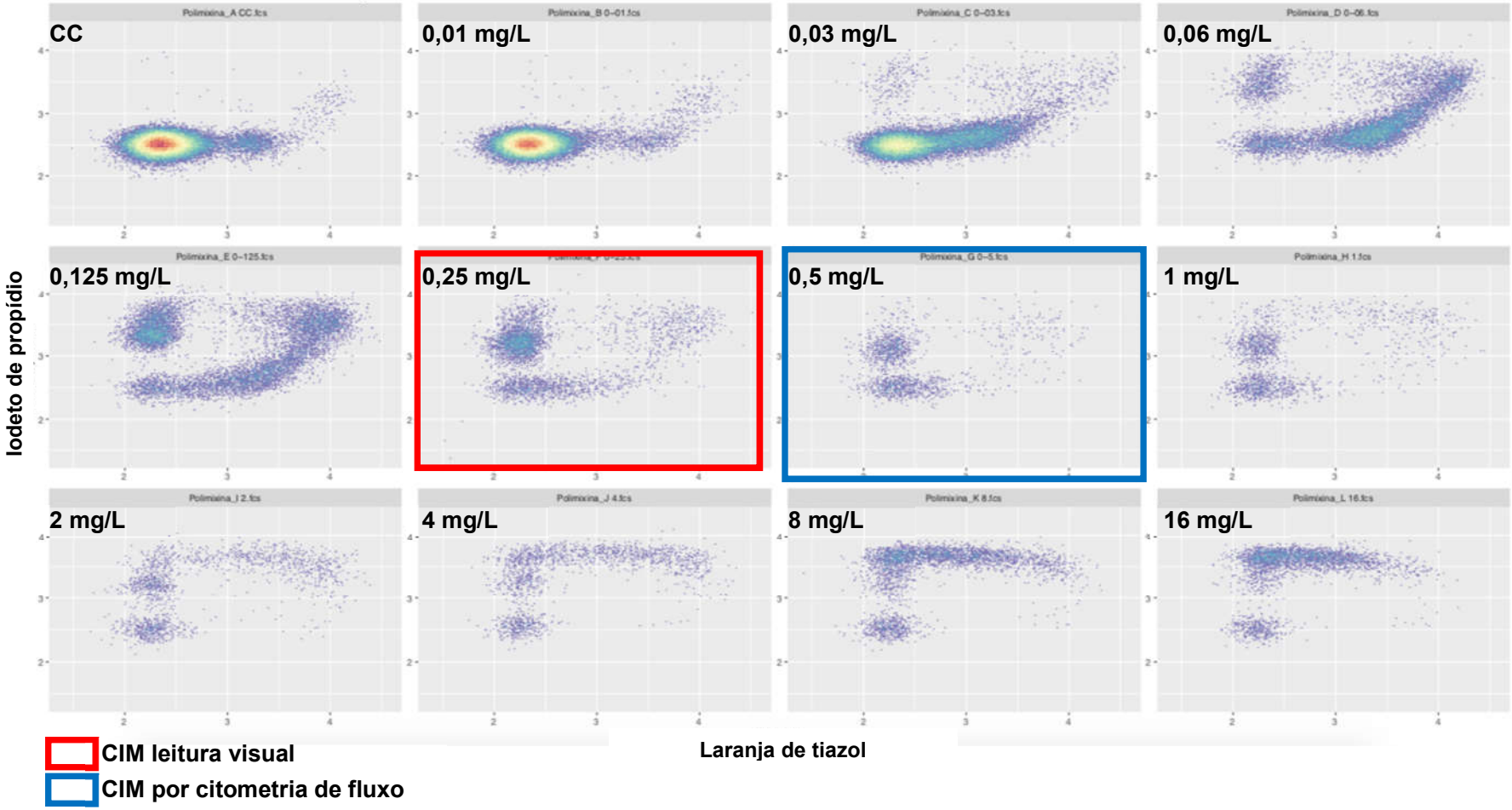
T7 – L0173433 - *Salmonella sp.* - Amicacina



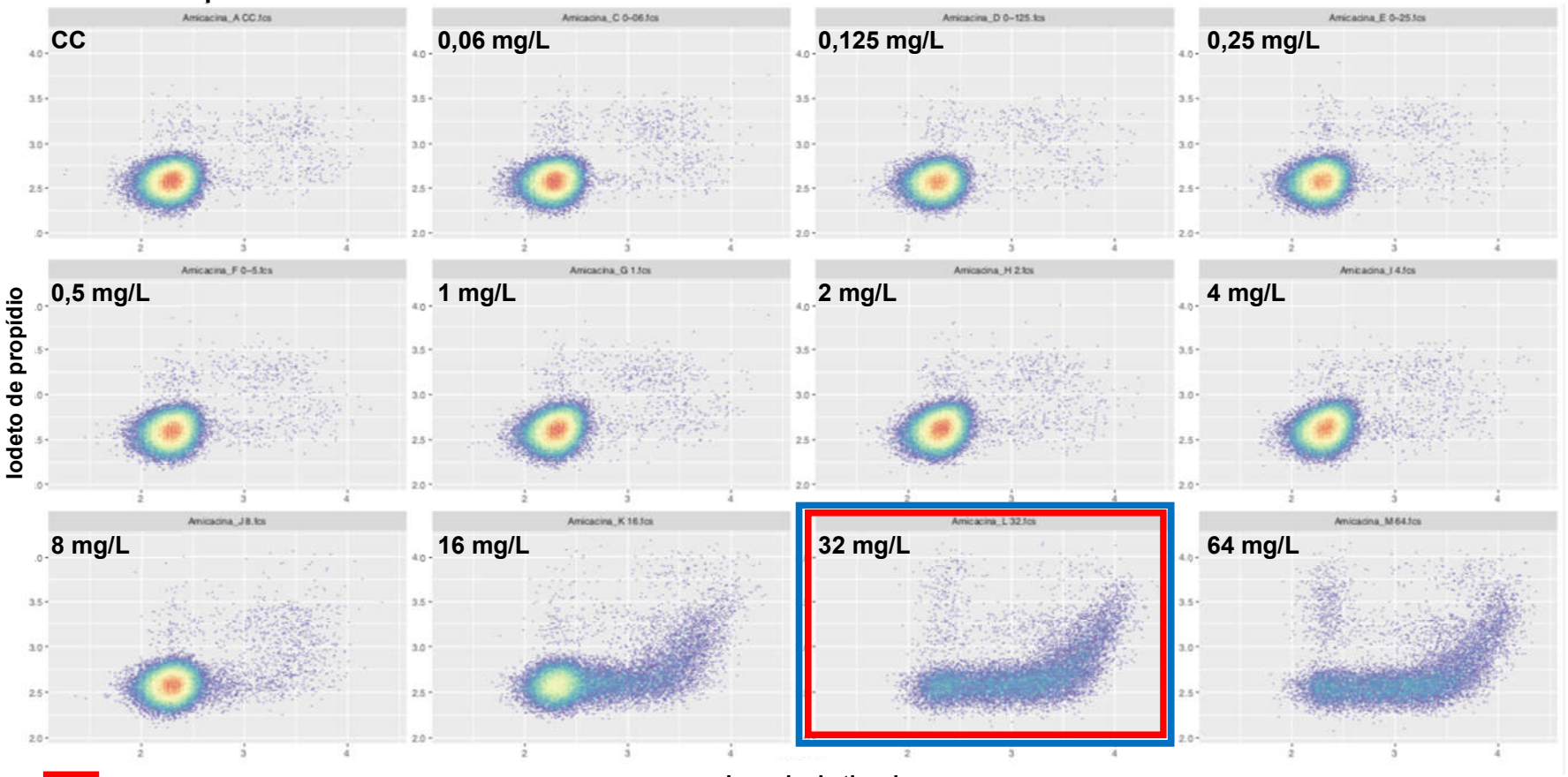
T7 – L0173433 - *Salmonella sp.* - Meropenem



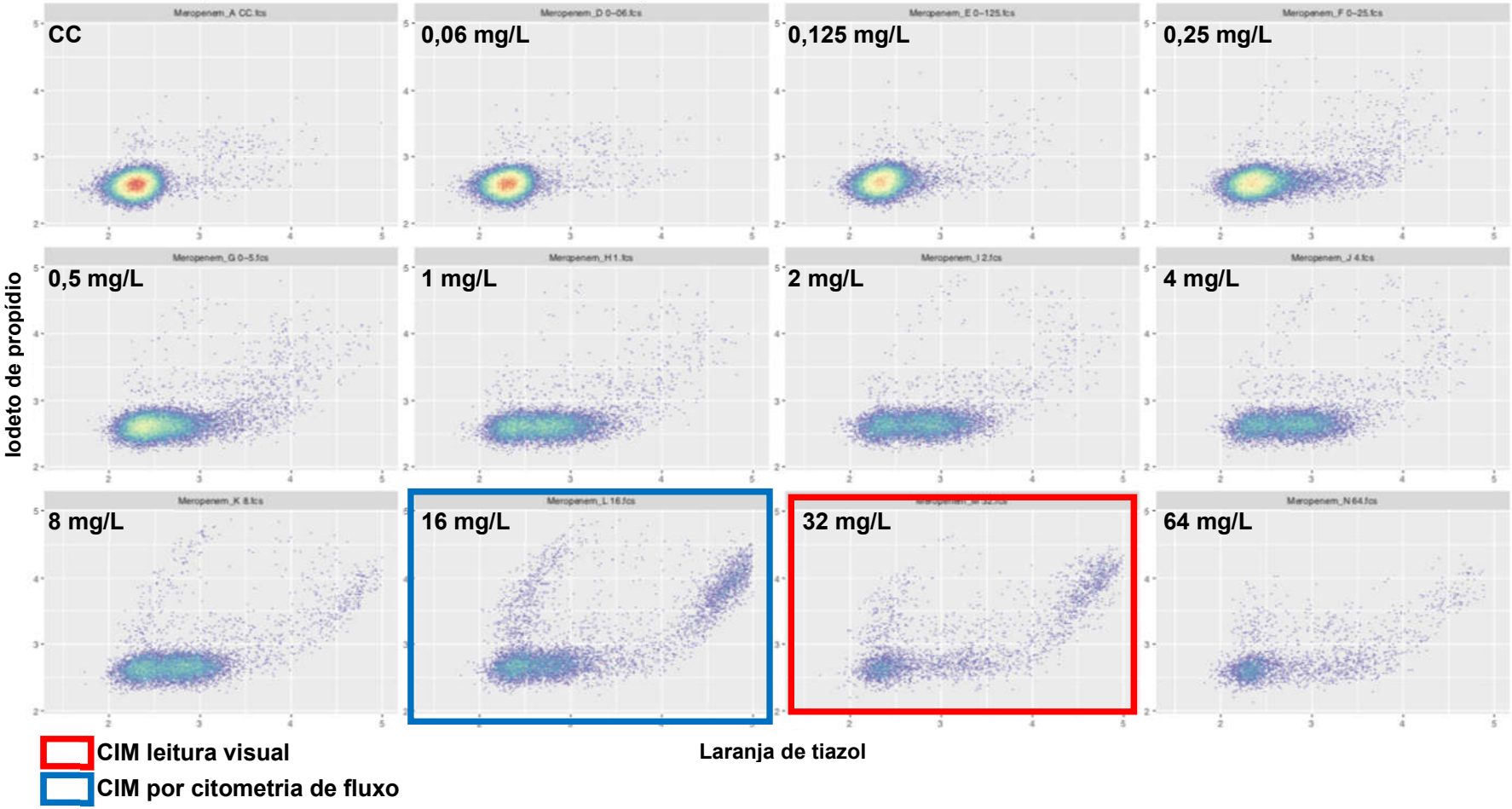
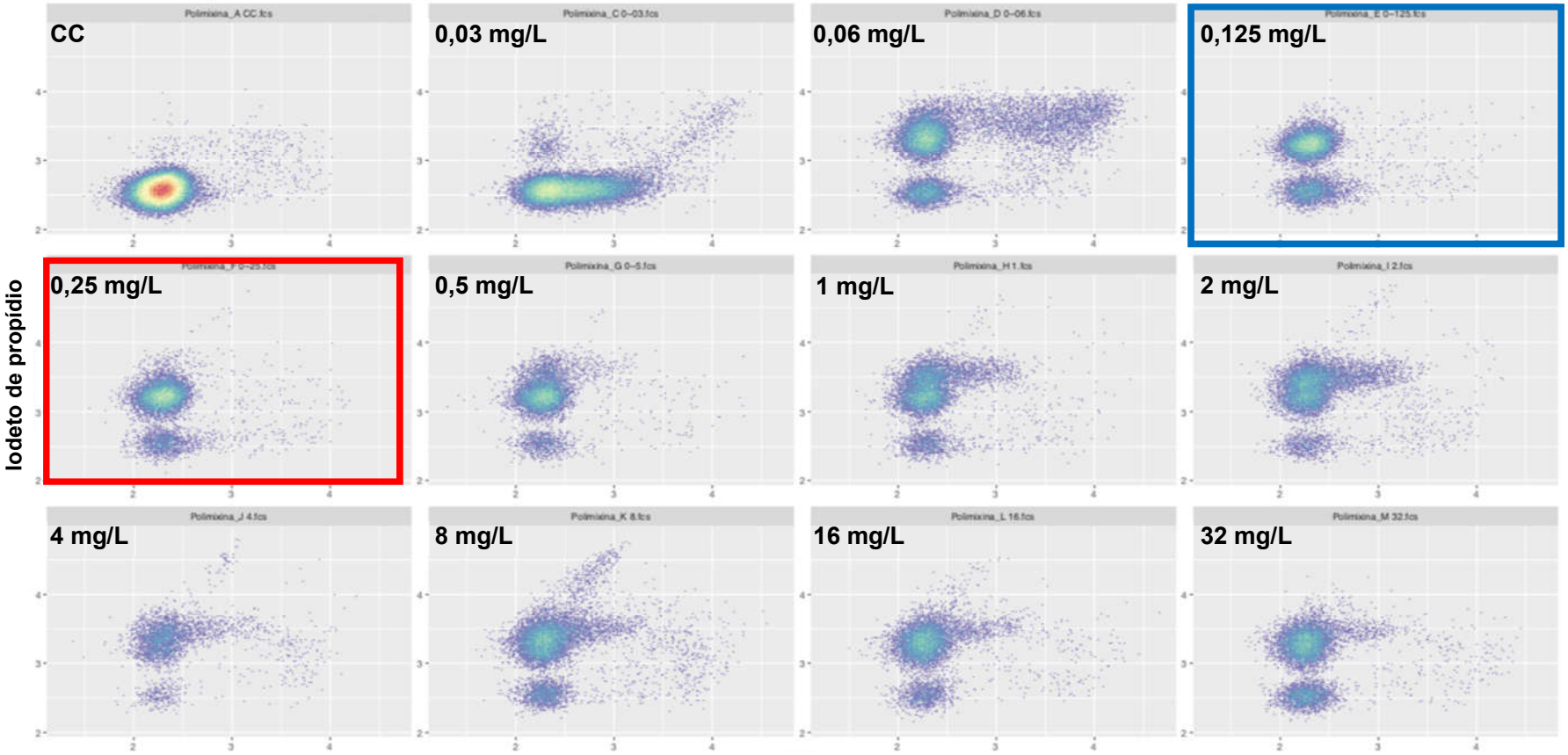
T7 – L0173433 - *Salmonella sp.* - Polimixina



58 – Klebsiella pneumoniae ATCC-BAA 1705 - Amicacina



58 – Klebsiella pneumoniae ATCC-BAA 1705 - Meropenem



58 – Klebsiella pneumoniae ATCC-BAA 1705 - Polimixina