

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA NA
DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eduarda Bassi Anziliero

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

**CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA NA DETERMINAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA**

Eduarda Bassi Anziliero

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA NA DETERMINAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA**

Elaborada por
Eduarda Bassi Anziliero

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Luiz Carlos Kreutz, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**

Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF

Letícia Trevisan Gressler, Dra., IF-Farroupilha

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho não seria possível sem o apoio e colaboração de inúmeras pessoas. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que eu pudesse concluir esse importante trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz, pelos ensinamentos e disponibilidade. Obrigada pela oportunidade de crescimento e por ter acreditado e confiado em mim desde o início deste projeto.

Ao Prof. Dr. Rafael Frandoloso, pela colaboração inestimável no desenho do delineamento experimental.

A Dra Letícia Trevisan Gressler, pelas contribuições científicas, pelo carinho e pela amizade.

Agradeço ao colega e mestrando João Antônio Guizzo, que colaborou com as análises no citômetro de fluxo e de forma generosa fez contribuições fundamentais. Agradeço também aos demais colegas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia Avançada pela amizade e pelas preciosas ajudas, sem o suporte de vocês não teria sido possível o desenvolvimento desse projeto. Muito obrigada!

Aos meus amigos, meus verdadeiros amigos, que me incentivaram, apoiaram e compreenderam a minha ausência em alguns momentos.

A empresa que trabalho, que flexibilizou meus horários para que pudesse cumprir todas as atividades com êxito.

A minha família, pelo apoio incondicional, por estarem sempre ao meu lado prestando todo o suporte para meu crescimento pessoal e profissional. O que conquistei até hoje não seria possível sem vocês. Muito obrigada. Amo vocês!

Ao meu esposo, Deniz, pelo amor, carinho e companheirismo. Obrigada pelo incansável aporte emocional e científico e por me fazer acreditar que posso mais do que imagino. Você é meu porto seguro e minha fonte de inspiração.

EPIGRAFE

Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar onde quer.

Confúcio

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3. CAPÍTULO 1	17
Resumo	18
1. Introdução	19
2. Materiais e Métodos	20
1.1 Antimicrobianos.....	20
2.2 Preparo das soluções dos antimicrobianos	20
2.3 Isolados e condições de cultivo.....	20
2.4 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos por citometria de fluxo	21
2.5 Contagem bacteriana em placa	21
3. Resultados e Discussão	22
4. Referências Bibliográficas	26
4. CONCLUSÕES.....	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

- Figura 1. Taxa de sobrevivência de *E. coli* (ATCC 25922) exposta à diferentes antimicrobianos (A - E) e analisadas por citometria de fluxo e contagem bacteriana em placas. O percentual de sobrevivência, representado pelas figuras à esquerda, foi avaliado anteriormente a exposição (0h) e após exposição (1h, 2h e 3h) por meio de citometria de fluxo e contagem bacteriana em placas. As figuras a direita representam o scartograma da contagem bacteriana nas amostras por citometria de fluxo. O quadrante inferior esquerdo representa a subpopulação de células viáveis (não marcadas pelo PI), enquanto que o quadrante superior esquerdo representa a subpopulação de células não viáveis (marcadas pelo PI).....30
- Figura 2. Avaliação do crescimento de *E. coli* resistente aos antimicrobianos por meio da técnica de citometria de fluxo e contagem em placas. O número absoluto de bactérias, representado pelas figuras à esquerda, foi determinado anteriormente à exposição (0h) e após a exposição (1h, 2h e 3h). O scartograma apresentado na coluna à esquerda demonstra a contagem bacteriana por citometria de fluxo. O quadrante inferior esquerdo representa a subpopulação de células viáveis (não marcadas pelo PI), enquanto que o quadrante superior esquerdo representa a subpopulação de células não viáveis (marcadas pelo PI).....32

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CF	Citometria de fluxo
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
DiBAC ₄	Bis-(1,3-Dibarbituric acid)-trimethine oxanol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
FITSC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Hora
<i>k</i>	índice de <i>kappa</i>
LB	Luria-Bertani
mg	Miligrama
ml	Mililitro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina fosfatada
PC	Proporções de concordância
Per-CP	Complexo peridinina-clorofila
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Iodeto de propídeo
RA	Resistência antimicrobiana
rpm	Rotação por minuto
SYTO9	Green fluorescent nucleic acid stain
TSA	Teste de susceptibilidade antimicrobiana
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
%	Percentual

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA NA DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Autora: Eduarda Bassi Anziliero

Orientador: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 31 de julho de 2017

A resistência antimicrobiana é uma preocupação constante. Para evitar o surgimento de novas cepas bacterianas multirresistentes é necessário investir em pesquisas e tecnologias de avaliação da atividade antimicrobiana. Diversos métodos laboratoriais estão disponíveis para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, permitindo a escolha terapêutica correta em aproximadamente 20 h após cultura positiva. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas metodologias para avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana, de forma rápida e precisa, irá contribuir para a utilização racional dos fármacos e, conseqüente, redução e/ou controle da resistência bacteriana, e aumento na sobrevida dos pacientes. O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver um protocolo rápido de determinação de susceptibilidade aos antimicrobianos por meio da técnica de citometria de fluxo. Para padronização desse procedimento utilizamos 6 antimicrobianos, uma cepa bacteriana de *Escherichia coli* (ATCC 25922) sensível a todos os antimicrobianos, além de isolados clínicos de *E. coli* resistentes aos mesmos antimicrobianos. Os isolados foram submetidos previamente ao método de disco-difusão para avaliação do perfil de susceptibilidade. As cepas selecionadas foram cultivadas em caldo LB, lavadas e quantificadas por citometria de fluxo. Concentrações padrões dos antimicrobianos foram adicionadas à 10^4 *E.coli* e incubadas por 1, 2 ou 3 h à 37°C. Em seguida, as amostras foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo. A determinação da viabilidade bacteriana baseou-se no conceito de que o marcador de ácido nucléico PI é capaz de penetrar membranas celulares danificadas, marcando o DNA celular e assim, diferenciando as populações viáveis e inviáveis. Para validação da técnica, cada amostra, em seus respectivos tempos de tratamento foram submetidas também a contagem bacteriana por meio de plaqueamento em meio LB, e a taxa de sobrevivência/crescimento foi determinada após incubação à 36°C por 18-24 h. A utilização da técnica de citometria de fluxo permitiu avaliar a susceptibilidade antimicrobiana em poucas horas. Porém ao compararmos a técnica com a contagem em placas, não foi possível estabelecer uma correlação positiva, pois a citometria apresentou um percentual de viabilidade superior ao método tradicional. Isso pode ser explicado pela presença de subpopulações viáveis, porém não cultiváveis, incapazes de formar colônias em ágar. Por outro lado, se considerarmos os isolados resistentes, a citometria de fluxo possibilitou determinar a resistência antimicrobiana com precisão, fator determinante para o sucesso no tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes. A citometria de fluxo pode ser aprimorada como uma alternativa na detecção de cepas multirresistentes.

Palavras-chave: citometria de fluxo, resistência antimicrobiana, teste de susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

FLOW CITOMETRY AS A TOOL TO EVALUATE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

Author: Eduarda Bassi Anziliero

Advisor: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 31 de julho de 2017

Antimicrobial resistance is a relevant matter to public health. Investments on research and new technologies to evaluate antimicrobial activity are much needed to avoid the surge of new multiresistant strains. Several techniques are available to evaluate antimicrobial activity *in vitro* in less than 24 h after a positive isolation, allowing to properly choosing the right antibiotic to be used. In this scenario, the development of new methods to quickly and precisely evaluate the antimicrobial susceptibility profile of bacterial isolates would be invaluable for the rational use of antibiotics and, as a consequence, to reduce or even control the surge of bacterial resistance and to prolong patients' life expectation. Thus, in this study our main goal was to develop a quick protocol to evaluate antimicrobial susceptibility using flow cytometry. We used six antimicrobial drugs, a strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922) susceptible to all antimicrobials, and clinical isolates of *E. coli* resistant to the same antimicrobial drugs. Prior to testing, the susceptibility profile of all isolates was tested by the disc-diffusion method. The isolates were then cultivated in liquid LB, washed and quantitated by flow cytometry. Standard concentration of antimicrobial drugs were added to 10^4 *E. coli* cells and incubated for 1, 2 or 3 h at 37°C. After that, the samples were mixed with propidium iodine (PI) and analyzed by flow cytometry. Viable bacteria were differentiated from unviable in that PI penetrates damaged membranes staining the DNA of death bacteria. As controls to validate this procedure, each bacterial isolate at each indicated time was also collected and seeded on LB agar plate to enumerate the number of viable cells by the classical method and the growing/survival rate was also evaluated in the same samples after incubating for 20h at 36°C. By using flow cytometry we were able estimate antimicrobial susceptibility in few hours. However, it was not possible to set a positive correlation with plaque counting in that we found a higher percentile of viable cells by flow cytometry. This phenomenon might be explained by the presence of viable but non-cultivable bacterial subpopulations unable to form colonies in agar plates. In the other hand, by using flow cytometry and considering the resistant isolates, we were able to define precisely the resistant characteristics of a given isolate, and this is invaluable for treating infection by multidrug resistant isolates. Thus, we conclude that flow cytometry should be optimized and used as an alternative tool to detect multiresistant bacterial isolates.

Key words: flow cytometry, multidrug resistance, antimicrobial, susceptibility.

1. INTRODUÇÃO

Procuram-se novos antibióticos! Entre 1940 e 1962, foram lançadas mais de 20 novas classes de antibióticos. Desde então, apesar dos grandes avanços ocorridos nas últimas décadas, apenas dois novos produtos chegaram ao mercado. Contudo, aproximadamente 20 novos compostos estão em desenvolvimento clínico, sem previsão de disponibilização para a população (1,2). O desenvolvimento destes medicamentos não acompanhou o mesmo compasso do surgimento de cepas bacterianas resistentes. Para conter o avanço da resistência aos antibióticos, particularmente entre bactérias Gram-negativas, segue sendo necessário um grande esforço governamental, sob a forma de financiamento, legislação e fornecimento de incentivos à indústria farmacêutica (1).

A resistência antimicrobiana (RA) vem sendo considerada uma ameaça à saúde pública mundial. A RA é um problema complexo, onde os mecanismos de resistência vêm sendo caracterizados em proporções cada vez maiores, resultando em bactéria multirresistentes, com potenciais de causar um amplo espectro de doenças, tanto em humanos como em animais (3).

As taxas e a gravidade das infecções causadas por bactérias multirresistentes vem se elevando ano após ano, tornando tanto o tratamento, como o prognóstico clínico, cada vez mais preocupantes. A capacidade das bactérias em adaptar-se rapidamente ao mecanismo de ação dos antibióticos, poucos anos após a sua introdução na clínica médica, vem elevando o número de complicações e, conseqüentemente, a mortalidade (4).

As unidades de terapia intensiva (UTIs) de hospitais em todo o mundo, caracterizam-se como o epicentro das infecções bacterianas, uma vez que apresentam um perfil de população extremamente vulnerável, com pacientes críticos, imunossuprimidos e alto número de procedimentos invasivos (5). As infecções que ocorrem nesses pacientes estão associadas a um aumento importante nas taxas de morbidade, mortalidade e oneração com custos ligados à saúde (3). Diversos fatores influenciam a disseminação rápida de agentes patogênicos multirresistentes, seja por meio de novas mutações, na seleção de cepas resistentes e no controle das infecções de forma inadequada (5). Todo esse processo vem dificultando as ações terapêuticas, e se tornando um dos gargalos da saúde global (6).

Nesse contexto, a seleção do antimicrobiano, bem como o regime de tratamento adequado são fundamentais, uma vez que, possibilitam a utilização de terapias racionais, prevenindo o surgimento de novas cepas bacterianas multirresistentes. Atualmente, estima-se que, no mundo, 30% dos pacientes recebam terapia antimicrobiana considerada inadequada.

Estes pacientes, se comparados aos indivíduos onde a terapia medicamentosa é utilizada corretamente, apresentam taxas de mortalidade significativamente superior (7,8).

A RA vem emergindo como um dos problemas de saúde mais significativos do novo milênio e, nesse aspecto, os laboratórios de microbiologia clínica desempenham um papel central na otimização do manejo terapêutico (9). Considerando a condição de risco de morte de um paciente com infecções e suas complicações, incluindo quadros graves de sepse, ou a crescente prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos em ambientes hospitalares, faz-se necessário novas ferramentas de diagnóstico rápidas, automatizadas e que reduzam a interpretação subjetiva dos resultados (9,10).

A detecção rápida de mecanismos de resistência é um desafio para a maioria dos laboratórios, sendo que a identificação errônea tem implicações clínicas importantes tanto para o tratamento como para o controle da infecção (11). A classificação da resistência bacteriana podem ser realizada através de métodos fenotípicos ou genotípicos (12). A resistência é codificada por uma diversidade de genes, muitos dos quais podem ser transferidos entre populações bacterianas. Além do mais, constantemente, novos mecanismos de resistência, genes e/ou vetores de transmissão vêm sendo descritos (6).

Embora avanços tecnológicos possibilitem a identificação do agente causador da infecção bacteriana em poucas horas (13), a escolha da conduta terapêutica adequada só é definida após a determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana, o que geralmente necessita períodos de 18 a 24 horas após cultura positiva (7,8).

Assim, o desenvolvimento e a otimização de novas metodologias que permitam verificar o perfil de susceptibilidade ao antimicrobiano, em um curto espaço de tempo, certamente contribuiria para uma utilização racional destes fármacos. Para tanto, os benefícios potenciais oferecidos pela técnica de citometria de fluxo (CF) quando aplicados na avaliação da susceptibilidade antimicrobiana, vem sendo utilizados de forma experimental em infecções fúngicas e bacterianas (11,14,15). Diferentes autores têm demonstrado que a técnica poderia superar algumas limitações advertidas métodos convencionais, reduzindo os longos períodos de incubação e auxiliando na tomada de decisão em poucas horas (11,14,15). Considerando que o tempo é um fator determinante para o prognóstico das infecções bacterianas, tecnologias e soluções que permitam acelerar o tempo de liberação do perfil de susceptibilidade, bem como a utilização racional dos antimicrobianos, vem ao encontro dos anseios da comunidade científica e da saúde da população.

Além do mais, há uma crescente preocupação na elevada prevalência dos casos de infecções provocados por enterobactérias produtoras de carbapenemases e beta-lactamases de

espectro estendido (ESBL), para as quais as alternativas terapêuticas são restritas, como consequência do grau de resistência promovido por essas enzimas, onde a necessidade da decisão da conduta terapêutica rápida e assertiva é crucial. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de citometria de fluxo como um método auxiliar para determinação da susceptibilidade antimicrobiana.

A presente dissertação compreende, além da introdução, uma revisão de literatura que aborda os temas resistência antimicrobiana e seu impacto sobre a saúde da humanidade; uso de antimicrobianos e novas tecnologias como a citometria de fluxo como uma ferramenta para determinação da susceptibilidade antimicrobiana, e uma pesquisa na qual utilizamos a citometria de fluxo para estimar a resistência bacteriana frente aos seis antimicrobianos estudados. Os resultados encontrados nessa pesquisa estão apresentados no capítulo 1 em forma de artigo científico intitulado “**Citometria de fluxo como ferramenta na determinação da susceptibilidade antimicrobiana**”, que relata os benefícios e limitações oferecidos pela técnica de citometria de fluxo na determinação da susceptibilidade antimicrobiana e será, após tradução para o inglês, submetido ao periódico *Brazilian Journal of Microbiology*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Durante o século XX, as doenças infecciosas foram consideradas a principal causa de mortalidade hospitalar de todo o mundo, levando pacientes à sucumbirem por infecções bacterianas agudas, decorrentes da indisponibilidade e/ou oferta de opções terapêuticas (16). Contudo, o descobrimento dos antibióticos foi um dos maiores feitos da ciência obtido durante o último século, permitindo um grande avanço na expectativa de vida da humanidade, na saúde dos animais e na produção de alimentos (4,16–18).

Desde o descobrimento da penicilina por Fleming em 1929, sua introdução na clínica médica na década de 40 e a introdução de novas moléculas, naturais ou sintéticas nos anos 1970, os antibióticos estão entre as maiores descobertas da medicina. Os antibióticos contribuíram significativamente na redução da prevalência de inúmeras doenças infecciosas, no sucesso dos transplantes, nas práticas cirúrgicas, na sobrevivência de neonatos prematuros, em indivíduos imunossuprimidos e conseqüentemente no aumento da expectativa de vida da população (17,19,20).

Os antibióticos são definidos como substâncias de origem natural ou sintética, responsáveis pela morte ou inibição do crescimento microbiano (16). Agem modificando processos metabólicos ou estruturais do microrganismo, atuando na interferência da síntese da parede celular, na replicação do DNA (ácido desoxirribonucleico), na síntese proteica ou alterando a permeabilidade da membrana (16). A eficácia dos antibióticos está diretamente ligada à concentração utilizada no tratamento, bem como na sua disponibilidade no sítio anatômico da infecção. Podem apresentar duas funções distintas: a inibição do crescimento bacteriano, definido como ação bacteriostática, ou a destruição da população bacteriana (ação bactericida), atuando nos processos vitais levando a inativação (morte) do microrganismo alvo (21).

Entretanto, as doenças infecciosas causadas por agentes bacterianos continuam sendo uma preocupação mundial, uma vez que as complicações relacionadas a esse tipo de infecção, incluindo aqui a sepse, afetam milhões de pessoas anualmente, com taxas de mortalidade entre 30 e 50% (10). Além do mais, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a RA é considerada uma ameaça crescente à saúde pública (3). Estudos apontam que o investimento anual em assistência à saúde para o tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes atinge valores superiores a 20 bilhões de dólares em países como os Estados Unidos e de aproximadamente 16 bilhões de euros na Europa (22). Neste sentido, a maioria das cepas de bactérias multirresistentes até então restritas às infecções nosocomiais, vem se

estendendo para aquelas infecções adquiridas na comunidade, em complicações pós-cirúrgicas e em alimentos contaminados (10,23).

A RA pode ser considerada uma consequência natural da adaptação da população bacteriana, em resposta a contínua exposição aos antibióticos (20). A origem deste fenômeno sempre esteve ligada a grande interferência da atividade humana, resultando na geração de mecanismos de resistência ao longo do tempo (24). A literatura científica cita que, em ambientes remotos, onde a ocupação humana ainda é limitada, presumivelmente com baixa exposição aos antibióticos, a aquisição de genes de resistência por parte das bactérias ainda não é detectada (25). Assim, evidências indicam que a resistência bacteriana de forma generalizada é um fenômeno moderno, ligado ao uso indiscriminado de antimicrobianos, atuando como força seletiva para o surgimento de cepas resistentes, bem como transferência horizontal de genes associados a resistência desde os anos 1950 (24,26).

Deste modo, os laboratórios clínicos, especialmente os de microbiologia, desempenham um papel fundamental no suporte da escolha terapêutica adequada. Sua atuação é crucial para o sucesso do tratamento, incluindo etapas que compreendem desde o isolamento e identificação correta do microrganismo até a realização de testes de susceptibilidade antimicrobiana (10).

À vista disso, após o recebimento de uma amostra clínica do paciente (Dia 0), o microbiologista clínico realiza o isolamento do microrganismo envolvido, por meio da inoculação da amostra em meio de cultura. Em seguida, com o crescimento primário do agente (Dia 1), colônias bacterianas são isoladas para a realização de um novo subcultivo (Dia 2). A partir de então, o processo finaliza-se com a realização do teste de susceptibilidade antimicrobiana (Dia 3) (10,27).

Acredita-se que as taxas de mortalidade sejam frequentemente superiores em cerca de 30% dos pacientes que são submetidos a terapias antimicrobianas consideradas inadequadas, se comparados aos indivíduos submetidos a terapia medicamentosa correta (7,8). Contudo, nestes casos, o tempo ainda é um fator determinante para o sucesso do tratamento, se considerarmos que são necessários três dias de trabalho para a escolha da terapia ideal. Nas últimas décadas, novas tecnologias, como a espectrometria de massa e a genômica, vêm permitindo uma significativa redução do tempo de identificação do agente envolvido em infecções clínicas. Ainda assim, se considerarmos os testes de sensibilidade aos antimicrobianos padrões, faz-se necessário um período mínimo de 48 horas até a determinação da opção terapêutica (7,8).

Todavia, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e/ou aprimoradas para atender estas demandas (13). Os benefícios potenciais oferecidos pela técnica de citometria de fluxo aos testes de sensibilidade já foram avaliados experimentalmente para infecções bacterianas e

fúngicas. Até o momento os resultados têm sido promissores, demonstrando que a citometria poderia superar algumas limitações dos métodos convencionais, principalmente encurtando o período entre a execução e a liberação do resultado (11,14,15).

A técnica de citometria de fluxo permite realizar avaliações da função celular, incluindo a capacidade de replicação, atividade metabólica, integridade e potencial de membrana. Além do mais, uma ampla gama de corantes está disponível, os quais permitem corar seletivamente microrganismos viáveis ou mortos, proporcionando a realização de análises multivariadas. É possível, por meio de corantes vitais e a citometria, avaliar o estado fisiológico da célula microbiana após tratamento com os antimicrobianos, identificando subpopulações viáveis, porém não cultiváveis (28,29). A importância da citometria de fluxo na análise e quantificação de células (especialmente bactérias e leveduras) pelas indústrias farmacêuticas, alimentícia, de bebidas ou em sistemas ambientais e hídricos também vem sendo estudada (28).

O princípio utilizado na citometria baseia-se no bombeamento das células em suspensão por um fluxo único, que em seguida é interceptado e estimulado por um ou mais feixes de laser, permitindo que a dispersão da luz gerada e os sinais de fluorescência sejam capturados e interpretados pelo sistema óptico do equipamento (11). Resultados promissores também vêm sendo obtidos em relação a detecção de ESBL. Faria-Ramos e colaboradores (2012), demonstram que por meio da técnica de CF é possível identificar em apenas duas horas aquelas bactérias que produzem essas enzimas, que conferem resistência a todas as cefalosporinas e monobatans, importantes classes farmacológicas disponíveis na terapêutica de bactérias Gram-negativas.

Considerando que o tempo é um fator determinante para o prognóstico das infecções bacterianas, tecnologias e soluções que permitam acelerar o tempo de liberação do perfil de susceptibilidade, impactam positivamente na aplicação correta e racional dos antimicrobianos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de citometria de fluxo como um método auxiliar para determinação da susceptibilidade antimicrobiana.

3. CAPÍTULO 1

Citometria de fluxo como ferramenta na determinação da susceptibilidade antimicrobiana

Eduarda Bassi Anziliero¹, João Antônio Guizzo¹, Leticia Trevisan Gressler², Deniz Anziliero³, Rafael Frandoloso¹, Luiz Carlos Kreutz^{1*}

(Artigo submetido ao periódico *Brazilian Journal of Microbiology* – 2017)

¹ Laboratório de Imunologia e Microbiologia Avançada, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

² Instituto Federal Farroupilha, IF-Farroupilha, Frederico Westphalen, RS, Brasil

³ IMED, Passo Fundo, RS, Brasil

*Autor correspondente: Luiz Carlos Kreutz, Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Campus I, Bairro São José. CEP 99052-100 – Passo Fundo, RS, Brasil. Telefone +55 54 3316 8444; Fax +55 54 3316 8163. E-mail: lckreutz@upf.br

Resumo

As infecções bacterianas e suas complicações afetam mais de um milhão de pessoas anualmente, com taxas de mortalidade atingindo entre 30 a 50%. A identificação do microrganismo envolvido e a determinação do antimicrobiano ideal para o tratamento é um processo laborioso, complexo e lento. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo rápido para determinar o perfil de susceptibilidade/resistência antimicrobiana através da técnica de citometria de fluxo, utilizando uma cepa padrão de *E. coli* e diferentes antimicrobianos. Paralelamente, fez-se contagens em placas para avaliação da sobrevivência bacteriana. A citometria de fluxo permitiu determinar a susceptibilidade antimicrobiana mediante análise da viabilidade celular baseada na incorporação do Iodeto de Propídeo. A citometria de fluxo revelou taxa de sobrevivência bacteriana superior a contagem em placas. Esses resultados podem ser explicados pela existência de diferentes subpopulações bacterianas que ainda apresentam-se viáveis porém não cultiváveis. Por outro lado, se considerarmos apenas os isolados resistentes, a citometria de fluxo possibilitou determinar a resistência antimicrobiana em poucas horas, fator determinante para o sucesso no tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes. A citometria de fluxo pode ser aprimorada como uma alternativa na detecção de cepas multirresistentes.

Palavras-chave: citometria de fluxo, resistência antimicrobiana, teste de susceptibilidade antimicrobiana.

1. Introdução

Os antibióticos contribuem significativamente para a redução da prevalência de inúmeras doenças infecciosas, no sucesso dos transplantes, nas práticas cirúrgicas, na sobrevivência de neonatos prematuros, em indivíduos imunossuprimidos e, conseqüentemente, no aumento da expectativa de vida da população¹⁻³.

Contudo, a resistência antimicrobiana (RA) é considerada uma ameaça crescente à saúde pública mundial⁴. A geração de mecanismos de resistência vem ocorrendo ao longo dos tempos, resultado da adaptação da população bacteriana, conseqüência de uma contínua exposição aos antibióticos tanto na clínica médica, como na produção de alimentos⁵⁻⁷. A RA também pode ser considerada um fenômeno moderno, relacionado a utilização disseminada de antibióticos na população humana e na produção animal. Todo esse processo vem atuando como a principal força seletiva para o surgimento de novos mecanismos de resistência e a conseqüente disseminação de novas cepas resistentes^{8,9}.

As conseqüências previsíveis deste processo para a saúde pública passam pela elevação das taxas de morbidade, prolongamento no tempo de hospitalização, elevação dos riscos de complicações e, invariavelmente, elevadas taxas de mortalidade. O impacto econômico deste problema inclui desde a baixa produtividade do trabalhador, a ineficiência na produção de alimentos até a significativa elevação nos custos ligados ao diagnóstico e tratamento¹⁰. Neste processo complexo, os laboratórios clínicos de microbiologia desempenham um papel fundamental no suporte da escolha terapêutica adequada, atuando de forma crucial para o sucesso do tratamento, através do isolamento e identificação correta do microrganismo patogênico envolvido até a realização do teste de susceptibilidade antimicrobiana¹¹. Nesse contexto, se considerarmos que são necessários três dias de trabalho entre a identificação do microrganismo envolvido e a determinação do antimicrobiano ideal, o quesito “tempo” pode ser considerado crucial para a saúde pública global.

Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e/ou aprimoradas para atender estas demandas. Nesta perspectiva, os benefícios potenciais oferecidos pela técnica de citometria de fluxo (CF) aos testes de susceptibilidade antimicrobiana vem sendo avaliados experimentalmente para infecções bacterianas e fúngicas. Até o momento, os resultados são promissores, demonstrando que a CF poderia superar algumas limitações dos métodos convencionais, principalmente encurtando o período entre a execução e a liberação do resultado¹²⁻¹⁴. A CF permite avaliar a função celular, incluindo capacidade de replicação, atividade metabólica, integridade e potencial de membrana. Na atividade antimicrobiana, permite ainda,

avaliar o estado fisiológico da célula após tratamento com os antimicrobianos, identificando subpopulações viáveis, porém não cultiváveis, e que não são detectadas pelas técnicas convencionais^{15,16}.

Neste estudo, avaliamos a técnica de citometria de fluxo como um método auxiliar para determinação da susceptibilidade antimicrobiana. Nós descobrimos que a citometria pode ser útil na determinação precoce de cepas resistentes e, com isso, aumentar o índice de acertos e a rapidez na escolha da terapêutica, principalmente nos casos em que as decisões pelos princípios ativos são urgentes.

2. Materiais e Métodos

2.1 Antimicrobianos

Foram utilizados antimicrobianos das classes das Fluorquinolonas (Enrofloxacina), Tetraciclina (Oxitetraciclina), Aminoglicosídeos (Gentamicina), β -lactâmicos (Cefalexina e Ampicilina) e Sulfonamida associada à diaminopirimidina (Sulfametoxazol/trimetoprim). Todos os agentes antimicrobianos (pó puro) foram comprados da Sigma-Aldrich, exceto a cefalexina (Aurobindo) e a gentamicina, solução padrão líquida obtida da Gibco.

2.2 Preparo das soluções dos antimicrobianos

As concentrações de trabalho foram obtidas das concentrações descritas na literatura (*Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI, 2013*) a constar: ampicilina 10 $\mu\text{g/ml}$, cefalexina 30 $\mu\text{g/ml}$, enrofloxacina 5 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 10 $\mu\text{g/ml}$, sulfametoxazol/trimetoprim 23,75/1,25 $\mu\text{g/ml}$ e tetraciclina 30 $\mu\text{g/ml}$. As soluções de estoque foram preparadas diluindo-se o soluto em 1 ml de água ultrapura (exceto Enrofloxacina e Sulfametoxazol/trimetoprim – solúveis em etanol). Após a solubilização, os compostos foram filtrados em membrana estéril de 0,22 μm (Sterile[®]) e diluídos em meio de cultura Luria-Bertani (LB, Sigma-Aldrich).

2.3 Isolados e condições de cultivo

Foram utilizados isolados clínicos humanos de *Escherichia coli* que apresentaram perfil de resistência frente às classes dos antimicrobianos descritas acima, previamente identificados em um laboratório clínico comercial. Os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) por disco-difusão, conforme preconizado na literatura (CLSI, 2014)¹⁷ e mantidos em meio de congelamento a -80°C até a utilização.

Uma cepa padrão de *E. coli* (ATCC 25922, Newprov), sensível a todas as classes de antibióticos estudadas, também foi utilizada na padronização da técnica.

2.4 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos por citometria de fluxo

Foi realizado um cultivo dos isolados clínicos e da cepa padrão de *E. coli* em ágar sólido LB durante 18-24 horas, à 37°C. Posteriormente, do cultivo primário, colônias foram selecionadas e inoculadas em 20 ml de meio LB líquido, incubado à 37°C, sob agitação (200 rpm). Ao atingir a fase exponencial tardia, densidade óptica de 0,5 (600nm), os inóculos bacterianos foram lavados três vezes com solução salina fosfatada estéril (PBS, pH 7,2), através de sucessivas centrifugações à 4°C, durante 10 minutos, à 4000 rpm. Os pellets bacterianos foram ressuspensos em 1 ml de PBS e submetidos a contagem bacteriana total pela técnica de citometria de fluxo.

A partir da quantificação por citometria (número de bactérias por μ l), alíquotas em duplicata contendo 10^4 bactérias/ml de meio LB líquido foram expostas aos antimicrobianos e incubadas à 37°C, sob agitação (200 rpm). Após o período de incubação (1h, 2h, 3h), as suspensões de trabalho foram então centrifugadas e lavadas três vezes com PBS à 4°C, durante 5 minutos, à 4500 rpm. Os pellets bacterianos foram ressuspensos em 200 μ l de PBS e expostos a 5 μ l do fluorocromo iodeto de propídeo (PI, 1mg/ml, Sigma-Aldrich), mantidos por 10 minutos, à 21°C, protegidos da luz. As bactérias foram então submetidas à avaliação da viabilidade celular por citometria (“FACSVerse” Becton Dickinson – EUA), através da aquisição de 10.000 células para cada amostra. Na aquisição das amostras utilizou-se um painel de duas cores: FITSC e Per-CP para o fluorocromo PI. A determinação da viabilidade bacteriana baseou-se no conceito de que o marcador de ácido nucléico PI é capaz de penetrar membranas celulares danificadas, marcando o DNA celular e assim, diferenciando as populações viáveis e inviáveis. Também foi estabelecido um ponto de corte baseado no controle de células viáveis obtidos da contagem bacteriana inicial, eliminando ruídos e fluorescências inespecíficas.

Como controle do fluorocromo, foi utilizado um isolado tratado à 70°C por 30 minutos e, em seguida, exposto ao PI (controle positivo, todas as células inviáveis) e um isolado sem tratamento e exposto ao PI (controle negativo, células viáveis).

2.5 Contagem bacteriana em placa

A avaliação da sobrevivência da população bacteriana após a exposição aos antimicrobianos foi realizada pelo método clássico de contagem bacteriana em placas. As

suspensões de trabalho contendo o antimicrobiano e 10^4 bactérias/ml de meio LB líquido, diluídas de forma seriada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), foram inoculadas em placas com meio de cultivo LB, e incubadas à 37°C por 18-24 horas. Para cada isolado bacteriano e antimicrobiano foram utilizados controles positivos (isolados não tratados) e controles negativos (somente meio de cultivo LB).

3. Resultados e Discussão

As infecções microbianas são uma ameaça constante à saúde humana e animal. O uso indiscriminado de antimicrobianos na clínica médica, agricultura e pecuária estão entre os principais fatores que levam à resistência antimicrobiana^{2,5}. Neste ponto, a prevenção e o tratamento das infecções de forma rápida e eficaz são primordiais, uma vez que, o uso excessivo dos antimicrobianos, quando não baseado em evidências científicas, leva a um processo seletivo de microrganismos resistentes, aumentando significativamente as taxas de morbidade e mortalidade em hospitais no mundo todo^{4,18,19}. Conseqüentemente, é cada vez mais importante a utilização correta e eficiente das ferramentas de avaliação da susceptibilidade antimicrobiana, bem como o desenvolvimento e aprimoramento de novos agentes antimicrobianos.

As principais técnicas utilizadas para avaliar a viabilidade bacteriana baseiam-se em métodos indiretos, que avaliam o estado fisiológico das células, sem qualquer indicação da real capacidade das bactérias em crescer e se multiplicar^{20,21}. Portanto, torna-se necessário metodologias que permitam a marcação do material genético da célula, ou que avaliem o potencial de membrana, indicadores de oxidação-redução ou sistema de genes repórteres²⁰.

A integridade da membrana celular é um critério utilizado na distinção entre células vivas e mortas. Células viáveis, por natureza, apresentam as membranas intactas ou impermeáveis, impedindo a entrada de corantes. Em contrapartida, células inviáveis, apresentam as membranas permeabilizadas ou rompidas, permitindo assim a entrada destas moléculas²². Entretanto, podem ocorrer outras situações onde as células continuam com sua membrana íntegra mas não se apresentam metabolicamente ativas. Além disso, há casos em que as células apresentam alterações na integridade da membrana, como nos casos de ambientes nutricionais extremos e/ou durante o crescimento exponencial. E, nestes casos, tanto o ambiente externo como o status fisiológico da célula influenciam na determinação da viabilidade celular^{15,16,23}.

A técnica de citometria de fluxo proporciona grandes possibilidades de quantificação bacteriana, principalmente quando associada com a utilização de fluorocromos que

seletivamente penetram células viáveis ou inviáveis¹⁶. O iodeto de propídio (PI), por exemplo, é um corante que penetra somente em células com membranas danificadas e se intercala ao material genético celular (DNA e RNA), tornando a célula fluorescente.. No entanto, o PI pode se acumular em algumas espécies de bactérias ou em células bacterianas intactas durante a fase de crescimento exponencial^{20,23}.

Por outro lado, o fluorocromo SYTO9 (green fluorescent nucleic acid stain), frequentemente utilizado na marcação de proteínas totais, quando usado isoladamente, marca todas as bactérias, incluindo as que apresentam membranas intactas (impermeáveis), bem como naquelas danificadas (permeáveis)²⁰. Assim, a associação de mais de um fluorocromo, como o SYTO9 e PI permite um ganho significativo na eficácia da técnica de citometria de fluxo para a determinação da viabilidade celular. Neste caso, o PI age impedindo a ação do SYTO9, penetrando assim, somente nas membranas danificadas, enquanto que o SYTO9 marca as bactérias com membrana íntegra, permitindo uma melhor diferenciação entre as populações^{16,18,20}.

Neste trabalho, utilizamos a técnica de citometria de fluxo como uma alternativa na determinação da susceptibilidade antimicrobiana. A viabilidade bacteriana foi analisada utilizando apenas o corante PI, permitindo a segregação das populações celulares viáveis e inviáveis. Optamos pela utilização do PI uma vez que, se comparados aos outros compostos disponíveis, este se encontra disponível na grande maioria dos laboratórios. Além do mais, apresenta melhor custo-benefício, considerando que estamos propondo uma ferramenta alternativa para ser utilizada como suporte nos laboratórios de microbiologia. Nosso ensaio consiste em mensurar, em tempo real, a intensidade de fluorescência obtida pela exposição de isolados de *E. coli* susceptíveis e resistentes às diferentes classes de agentes antimicrobianos e, posteriormente, coradas com PI. Assim, células tratadas com o antimicrobiano foram analisadas por meio da alteração na integridade da membrana celular, utilizando-se como parâmetro o aumento da intensidade de fluorescência promovido pela absorção de PI.

Para padronização da técnica, utilizamos uma cepa padrão de *E. coli* (ATCC 25922), sensível a todos antimicrobianos testados. Os resultados da avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos por citometria de fluxo foi monitorado em paralelo pela taxa de sobrevivência bacteriana, utilizando o método clássico de contagem em placas (figura 1).

Das seis classes de antimicrobianos avaliados neste trabalho, foi possível a determinação da susceptibilidade antimicrobiana para a maioria (5/6) dos fármacos mais utilizados na clínica médica. Com exceção da cefalexina, foi possível determinar a viabilidade celular e sobrevivência bacteriana em apenas uma hora após a exposição aos fármacos.

Ao compararmos com as técnicas tradicionais comumente utilizadas na microbiologia clínica para a determinação da susceptibilidade antimicrobiana, a citometria de fluxo apresenta-se como uma alternativa relativamente rápida, o que permitirá qualificar a tomada de decisão da escolha do antimicrobiano por parte dos médicos, conseqüentemente reduzindo as taxas de morbidade e mortalidade, bem como a resistência.

O controle positivo do fluorocromo realizado após tratamento térmico do isolado bacteriano (permeabilização da membrana) e exposição ao PI, apresentou 98,43% de marcação, indicando perfeito funcionamento do fluorocromo utilizado no estudo. Na contagem bacteriana em placas, o controle negativo (meio de cultivo LB) não apresentou crescimento bacteriano, garantindo a ausência de contaminação dos meios utilizados. O controle positivo (isolados bacterianos não tratados com antimicrobianos), apresentou crescimento bacteriano, assegurando a viabilidade da cultura celular utilizada nos experimentos.

Em se tratando de células susceptíveis aos antimicrobianos, a citometria de fluxo, no formato em que foi utilizada neste estudo, não substitui as ferramentas tradicionais já utilizadas há décadas. Este fato pode ser observado pelos valores de sobrevivência obtidos após o tratamento com os antimicrobianos (Figura 1). Em uma hora de exposição das células bacterianas aos antimicrobianos estudados detectamos, por meio da citometria de fluxo, uma taxa de sobrevivência bacteriana entre 30 a 50%. Em contraste, quando as mesmas amostras foram avaliadas através da contagem em placas, observamos um percentual de viabilidade muito pequeno. Além disso, utilizando a citometria de fluxo foi possível detectar um percentual significativo de células viáveis mesmo após 3 horas de exposição aos antimicrobianos. No entanto, ao se avaliar alíquotas destas mesmas células por meio da contagem bacteriana em placas, não foi possível detectar células cultiváveis (Figura 1).

Estes dados indicam que a utilização de apenas um composto para a marcação celular não é suficiente para considerar a citometria como uma técnica sensível, sendo necessário a utilização de outros fluorocromo, bem como períodos de incubação maiores¹². No presente estudo, utilizamos apenas o PI, tendo em vista que nossa hipótese inicial foi de que a utilização de apenas um marcador poderia ser suficiente para a metodologia proposta. De qualquer forma, com os resultados obtidos neste estudo, está clara a necessidade de utilização de marcadores fluorocromo alternativos, com outros mecanismos de ação, como exemplo do SYTO9 (impermeabilidade de membrana), do DiBAC4 (potencial de membrana), SYBR green e acridine orange^{16,18}.

Como o objetivo do nosso trabalho não foi avaliar a concordância entre os métodos em estudo, não realizamos os cálculos das proporções de concordância (PC) e índice de *kappa* (*k*).

Contudo, ao compararmos a técnica de citometria de fluxo com a contagem bacteriana em placas, é possível observar que as mesmas não possuem correlação, ou seja, a citometria de fluxo detecta uma viabilidade celular superior à contagem em placas. Isso se dá pelo fato de que existem subpopulações bacterianas viáveis, porém não cultiváveis, incapazes de formar colônias em placas de ágar. A confirmação da inibição do crescimento depende tanto das taxas de crescimento de cada isolado/espécie, como do antimicrobiano testado, pois há diferenças de comportamento entre cepas para o mesmo tratamento. Entretanto, o conhecimento sobre a capacidade de proliferação das células lesadas quando retornadas a um ambiente favorável ainda está em debate¹⁶. Além do mais, se observarmos a Figura 1, podemos verificar que a viabilidade determinada pela técnica de contagem em placas apresenta uma redução constante na taxa de sobrevivência em relação ao tempo. No caso da citometria de fluxo, esta constante nas taxas de sobrevivência está presente, ainda que com índices maiores, apenas para a gentamicina, enrofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim.

A citometria de fluxo não permitiu avaliar as células bacterianas após a exposição a cefalexina. Acredita-se que, durante um tratamento antimicrobiano, a ausência na detecção de uma população bacteriana pode estar relacionada ao fato de que células submetidas à lise severa apresentam uma alteração nas cadeias de ácidos nucleicos, impedindo que o fluorocromo intercale as fitas, classificadas como população de "células fantasmas", ou seja, células que se aglomeraram e/ou formaram cadeias entrelaçadas reduzindo a eficácia da coloração¹⁶. Nossos resultados também sugerem que o marcador utilizado (PI) não é capaz de marcar células tratadas com cefalexina, indicando que há necessidade de utilização de outro fluorocromo, como o DiBAC₄ para a marcação de bactérias tratadas com antimicrobianos da classe das cefalosporinas¹⁴. Outro fator importante poderia estar relacionado a atividade clínica do fármaco ser mais efetiva para cocos Gram-positivos do que bacilos Gram-negativos, bactérias alvo desse estudo^{24,25}.

Contudo, ao analisarmos os isolados clínicos de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos, observamos que a citometria de fluxo apresenta resultados promissores como alternativa às técnicas tradicionais. Na citometria de fluxo observamos uma taxa de viabilidade celular superior a 90% nos três períodos avaliados (Figura 2). Como esperado, quando submetidos a contagem bacteriana em placas, os isolados apresentaram um crescimento exponencial, partindo de 1×10^4 até 5×10^5 células.

A Figura 2 demonstra que a técnica de citometria de fluxo apresenta uma constante nos índices de sobrevivência bacteriana em relação ao tempo. Ao compararmos com a técnica tradicional de cultivo em placa, constatamos que a citometria de fluxo foi eficiente na

determinação da sobrevivência dos isolados tratados com 5 antimicrobianos testados, com exceção da cefalexina, conforme descrito anteriormente. Contudo, se levarmos em consideração a facilidade e o curto tempo de execução proporcionado pela citometria de fluxo, podemos inferir que a metodologia pode ser uma alternativa viável para a determinação de isolados resistentes nos laboratórios clínicos. Ao ponderarmos que o conhecimento sobre a resistência bacteriana na clínica médica hospitalar é fundamental, uma técnica que possibilite esse diagnóstico de forma rápida é crucial na sobrevivência dos pacientes com infecções por microrganismos multirresistentes, bem como nas medidas de controle de infecção relacionadas a assistência na saúde.

Por fim, com os resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que, para a citometria de fluxo ser ofertada como uma alternativa às técnicas tradicionais de determinação da susceptibilidade antimicrobiana, é necessário aprimorar o protocolo utilizado neste estudo. Neste caso, ajustes pontuais e a utilização de mais de um marcador, como o SYTO9, são fundamentais. Entretanto, é possível afirmar que a citometria de fluxo, no protocolo proposto, pode ser utilizada para a determinação e monitoramento de isolados resistentes, proporcionando assim agilidade e eficácia no controle das infecções causadas por microrganismos multirresistentes.

4. Referências Bibliográficas

1. Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discov Today*. 2005;10(1):45–52. doi:10.1016/S1359-6446(04)03285-4.
2. Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. The Future of Antibiotics and Resistance. *N Engl J Med*. 2013;368(4):299–302. doi:10.1056/NEJMp1215093.
3. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *NatRevMicrobiol*. 2007;5(1740–1534 (Electronic)):175–186.
4. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. *WHO Publ*. 2014:1–119. <http://www.ijmr.org.in/article.asp?issn=0971-5916;year=2014;volume=139;issue=1;spage=182;epage=183;aulast=Kapi>.
5. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? *Evol Appl*. 2015;8(3):240–247. doi:10.1111/eva.12185.
6. Thaller MC, Migliore L, Marquez C, et al. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of galápagos land iguanas: No man, no resistance. *PLoS One*.

- 2010;5(2):3–6. doi:10.1371/journal.pone.0008989.
7. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):692–699. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004.
 8. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):1–11. doi:10.1371/journal.pone.0034953.
 9. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *NatMed*. 2004;10(1078–8956 (Print)):S122–S129. doi:10.1038/nm1145.
 10. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. *WHO Publ*. 2014:1–119.
 11. Syal K, Mo M, Yu H, et al. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*. 2017;7(7):1795–1805. doi:10.7150/thno.19217.
 12. El-mashad N, Foad MF, Saady N, Salem D a. Susceptibility tests of oropharyngeal. *Quest*. 2012:266–273.
 13. Morales BP, Junior IN, Trilles L, et al. Determination of the minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against fluconazole by flow cytometry. *Med Mycol*. 2014;52:90–98. doi:10.3109/13693786.2013.806827.
 14. Faria-Ramos I, Espinar MJ, Rocha R, et al. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2012;19:E8–E15. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03986.x.
 15. Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J*. 2010;48(3):385–407. doi:10.1016/j.bej.2009.07.013.
 16. Leonard L, Chibane LB, Bouhedda BO, Degraeve P, Oulahal N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front Microbiol*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.01225.
 17. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. Vol 32.; 2014.
 18. Freire JM, Gaspar D, Garcia B, et al. Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time- resolved flow cytometry. *Biochim Biophysica Acta*. 2015;1848:554–560.
 19. Huang TH, Ning X, Wang X, Murthy N, Tzeng YL, Dickson RM. Rapid cytometric antibiotic susceptibility testing utilizing adaptive multidimensional statistical metrics. *Anal Chem*. 2015;87(3):1941–1949. doi:10.1021/ac504241x.

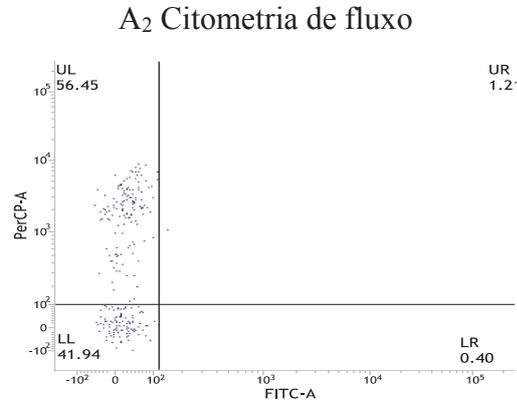
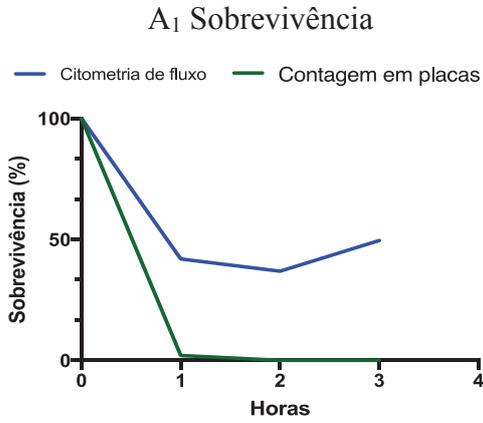
20. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol.* 2015;15:36. doi:10.1186/s12866-015-0376-x.
21. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016;6(2):71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
22. Czechowska K, Johnson DR, van der Meer JR. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(3):205–212. doi:10.1016/j.mib.2008.04.006.
23. Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H, Müller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytom Part A.* 2007;71(8):592–598. doi:10.1002/cyto.a.20402.
24. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol.* 2011;163(1):184–194. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x.
25. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423–435. doi:10.1038/nrmicro2333.

Figura 1. Taxa de sobrevivência de *E. coli* (ATCC 25922) exposta à diferentes antimicrobianos (A - E) e analisadas por citometria de fluxo e contagem bacteriana em placas. O percentual de sobrevivência, representado pelas figuras à esquerda, foi avaliado anteriormente a exposição (0h) e após exposição (1h, 2h e 3h) por meio de citometria de fluxo e contagem bacteriana em placas. As figuras a direita representam o scartograma da contagem bacteriana nas amostras por citometria de fluxo. O quadrante inferior esquerdo representa a subpopulação de células viáveis (não marcadas pelo PI), enquanto que o quadrante superior esquerdo representa a subpopulação de células não viáveis (marcadas pelo PI).

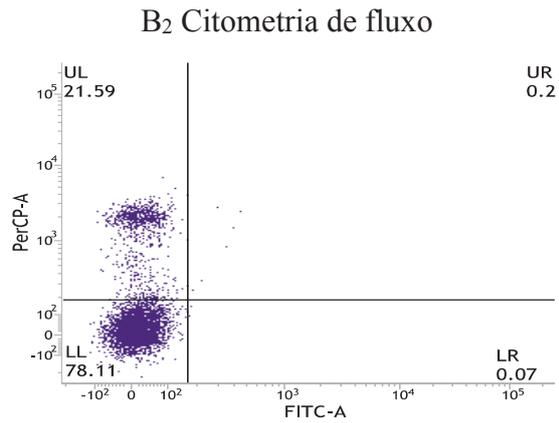
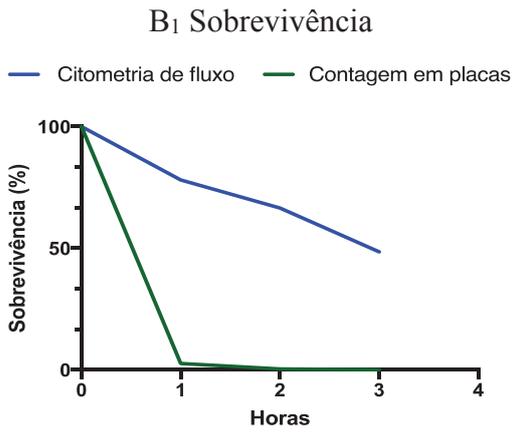
Figura 2. Avaliação do crescimento de *E. coli* resistente aos antimicrobianos por meio da técnica de citometria de fluxo e contagem em placas. O número absoluto de bactérias, representado pelas figuras à esquerda, foi determinado anteriormente à exposição (0h) e após a exposição (1h, 2h e 3h). O scartograma apresentado na coluna à esquerda demonstra a contagem bacteriana por citometria de fluxo. O quadrante inferior esquerdo representa a subpopulação de células viáveis (não marcadas pelo PI), enquanto que o quadrante superior esquerdo representa a subpopulação de células não viáveis (marcadas pelo PI).

Figura 1.

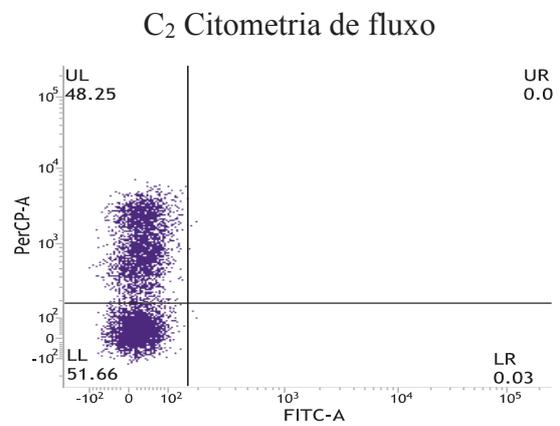
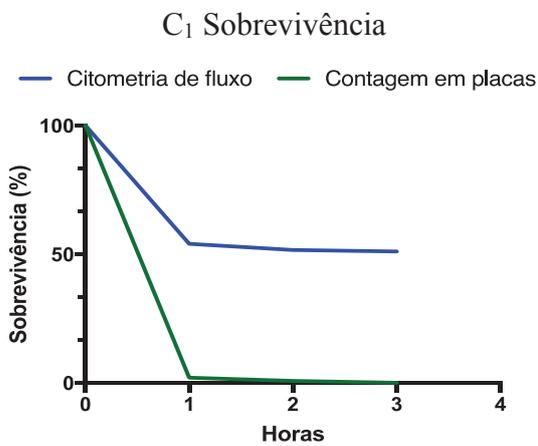
A) Ampicilina



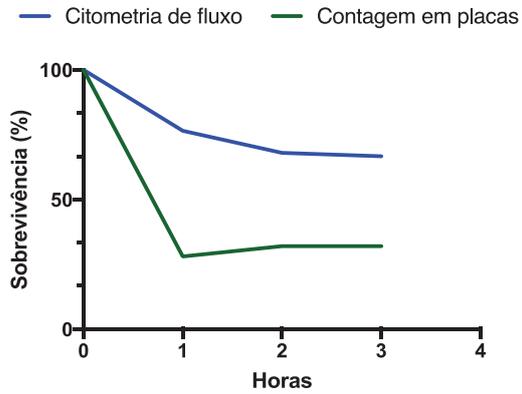
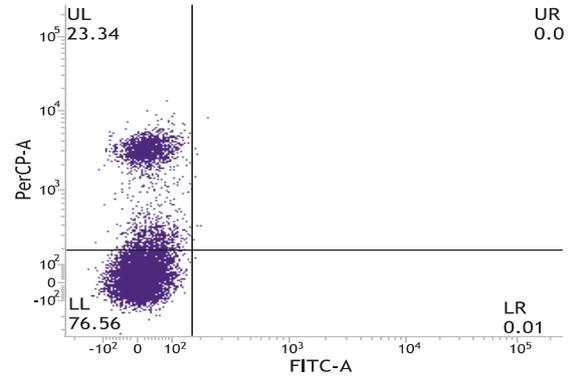
B) Enrofloxacin



C) Gentamicina



D) Sulfametoxazol/trimetoprim

D₁ SobrevivênciaD₂ Citometria de fluxo

E) Tetraciclina

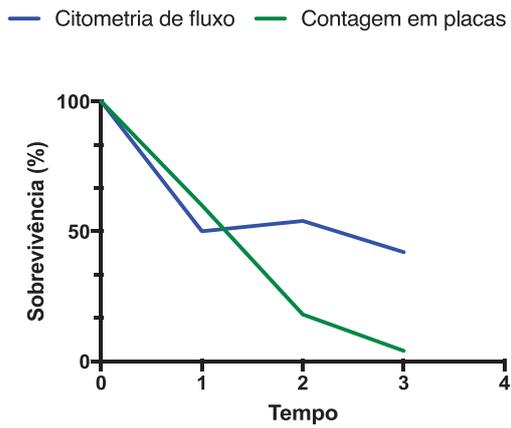
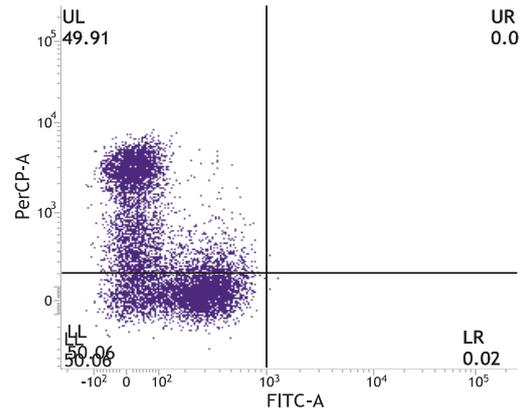
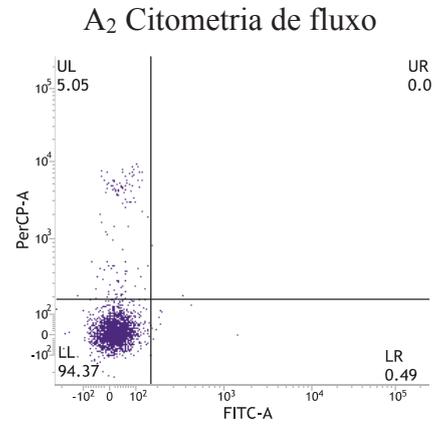
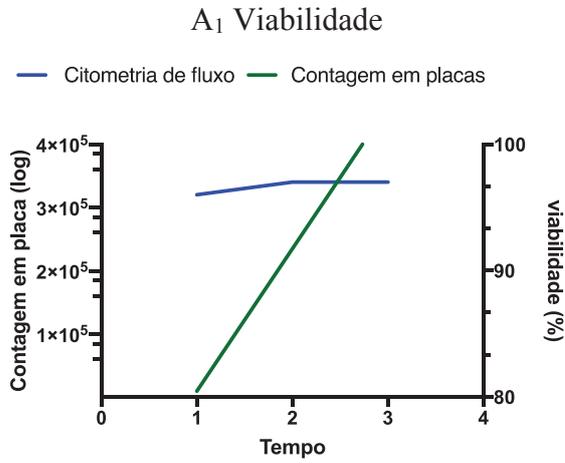
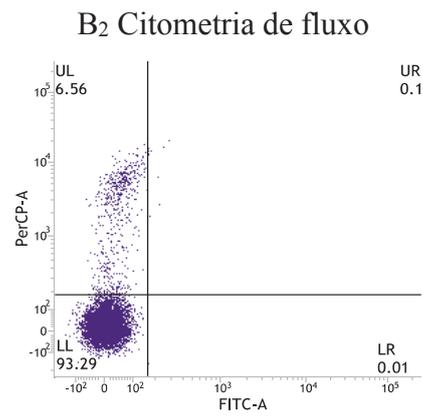
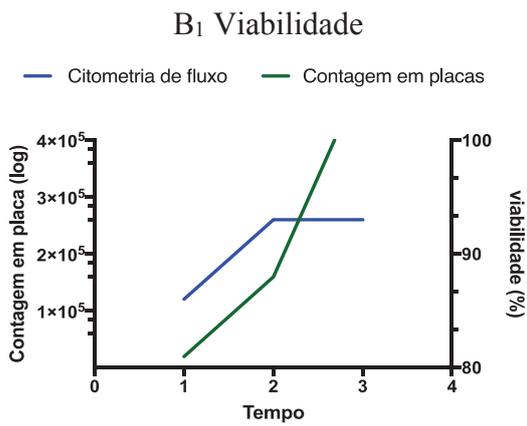
E₁ SobrevivênciaE₂ Citometria de fluxo

Figura 2.

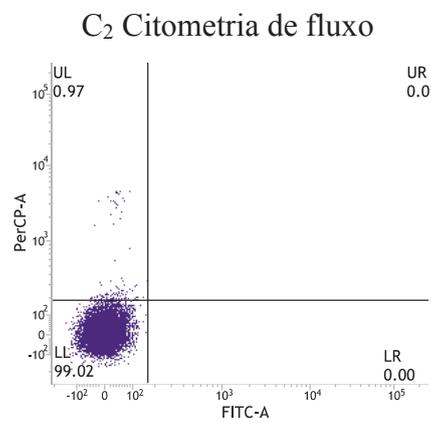
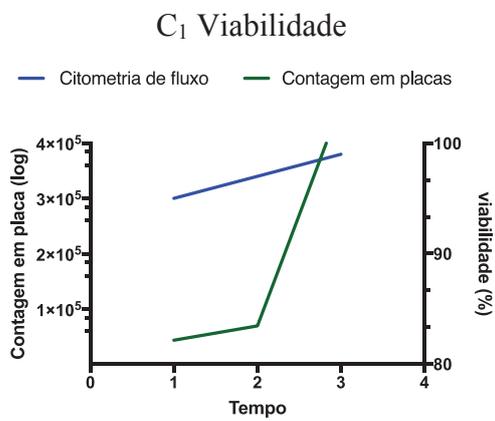
A) Ampicilina



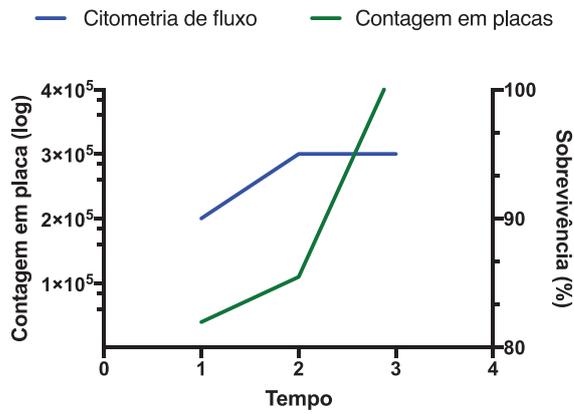
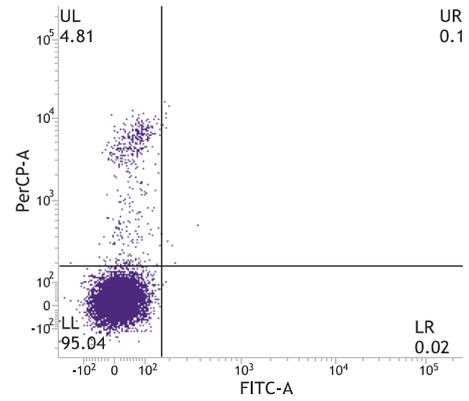
B) Enrofloxacin



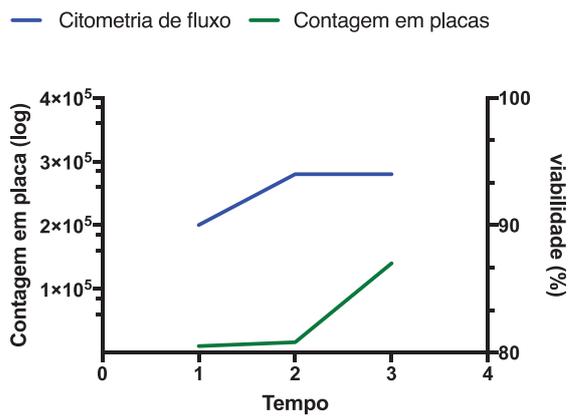
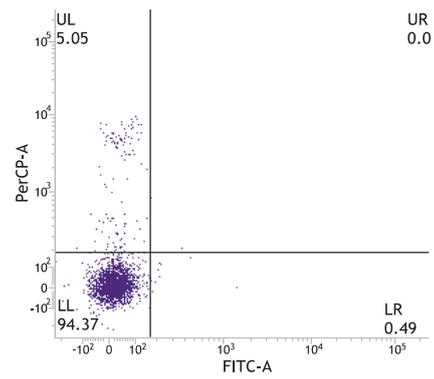
C) Gentamicina



D) Sulfametoxazol/trimetoprim

D₁ ViabilidadeD₂ Citometria de fluxo

E) Tetraciclina

E₁ ViabilidadeE₂ Citometria de fluxo

4. CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo, verificamos que a técnica proposta apresentou boas perspectivas para a determinação da susceptibilidade antimicrobiana. Entretanto, mais estudos e avaliações serão necessárias para que a CF possa ser utilizada como uma ferramenta na microbiologia clínica, especialmente nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

Acreditamos que, nesse ponto específico, a utilização de mais de um fluorocromo, concomitantemente, possibilitaria ampliar o espectro de marcação nas diferentes populações bacterianas. Contudo, o método apresentado mostrou ser capaz de distinguir os isolados resistentes com precisão já na primeira hora de incubação, e poderá ter uma aplicação prática para os casos de infecções por microrganismos multirresistentes, fornecendo resultados válidos em tempo útil.

Nossos resultados apontaram que esse protocolo não é capaz de ser utilizado para a cefalexina, onde não foi possível detectar a fluorescência das células bacterianas, provavelmente resultado do intumescimento ou lise celular, que impediu a ação do fluorocromo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, devido ao constante surgimento de cepas bacterianas multirresistentes, bem como a redução de alternativas terapêuticas para o controle de algumas infecções, vem surgindo um crescente interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos métodos de triagem e avaliação de atividade antimicrobiana, bem como o desenvolvimento de novos fármacos. Ferramentas que visem a detecção da susceptibilidade antimicrobiana em tempo real não só ajudarão a salvar vidas, mas também têm o potencial de conduzir a antibioticoterapia precisa no início da doença, potencialmente retardando a evolução da resistência aos antibióticos

Neste sentido, a técnica de citometria de fluxo vem sendo avaliada como uma alternativa segura e eficaz para a determinação da sensibilidade antimicrobiana. Ainda que os resultados obtidos até o presente momento estejam em nível experimental, decorrente da necessidade de equipamentos específicos e com operadores qualificados, a técnica apresenta boas perspectivas de utilização.

Este novo ensaio de citometria de fluxo é um método promissor, que pode ser usado no laboratório de microbiologia clínica durante a rotina diária. Além disso, reduz o tempo de espera para os resultados e demonstrou precisão em identificar prontamente isolados resistentes aos antimicrobianos, o que pode despontar como uma solução para o diagnóstico de cepas produtoras de enzimas como as carbapenemases, oxacilinas e ESBL, cuja emergência pode representar uma ameaça para os pacientes hospitalares e a comunidade em geral.

Por fim, nossas perspectivas são que com os resultados obtidos neste estudo possamos ajustar a técnica para a utilização como uma ferramenta alternativa, rápida e segura na determinação de isolados multirresistentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):184–94.
2. Nathan C, Cars O. Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. *N Engl J Med*. 2014;493–4.
3. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. WHO Publ [Internet]. 2014;1–119. Recuperado de: <http://www.ijmr.org.in/article.asp?issn=09715916;year=2014;volume=139;issue=1;page=182;epage=183;aulast=Kapi>
4. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(1740–1534 (Electronic)):175–86.
5. Brusselaers N, Vogelaers D, Blot S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. *Ann Intensive Care*. Springer Open Ltd; 2011;1(1):47.
6. Blair JM al, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; 2014;13(1):42–51.
7. Freire JM, Gaspar D, Garcia B, Torre D, Veiga AS, Andreu D, et al. Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time- resolved flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848:554–60.
8. Huang TH, Ning X, Wang X, Murthy N, Tzeng YL, Dickson RM. Rapid cytometric antibiotic susceptibility testing utilizing adaptive multidimensional statistical metrics. *Anal Chem*. 2015;87(3):1941–9.
9. Belkum A Van, Dunne WM. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2018–24.
10. Syal K, Mo M, Yu H, Iriya R, Jing W, Guodong S, et al. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*. 2017;7(7):1795–805.
11. Faria-Ramos I, Espinar MJ, Rocha R, Santos-Antunes J, Rodrigues a G, Canton R, et al. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2012;19:E8–15.
12. Saviuc C, Gheorghe I, Coban S, Drumea V, Chifiriuc MC, Banu O, et al. Rosmarinus Officinalis essential oil and eucalyptol act as efflux pumps inhibitors and increase ciprofloxacin efficiency against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Acinetobacter Baumannii* MDR strains. *Rom Biotechnol Lett*. 2016;21(4):11796–804.
13. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. Elsevier; 2016;6(2):71–9.
14. El-mashad N, Foad MF, Saady N, Salem D a. Susceptibility tests of oropharyngeal. *Quest*. 2012;266–73.
15. Morales BP, Junior IN, Trilles L, Bertho AL, Oliveira RDVC De, Nishikawa MM, et al. Determination of the minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against fluconazole by flow cytometry. *Med Mycol*. 2014;52:90–8.
16. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. SEGO; 2015;33(10):692–9.
17. D’Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457–61.
18. Doyle MP, Loneragan GH, Scott HM, Singer RS. Antimicrobial resistance: Challenges and perspectives. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013;12(2):234–48.
19. Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discov Today*.

- 2005;10(1):45–52.
20. Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. The Future of Antibiotics and Resistance. *N Engl J Med*. 24 de janeiro de 2013;368(4):299–302.
 21. Pankey G a, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):864–70.
 22. Fair RJ, Tor Y. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;25–64.
 23. O’Brien-Simpson NM, Pantarat N, Attard TJ, Walsh KA, Reynolds EC. A Rapid and Quantitative Flow Cytometry Method for the Analysis of Membrane Disruptive Antimicrobial Activity. *PLoS One*. 2016;11(3).
 24. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? *Evol Appl*. 2015;8(3):240–7.
 25. Thaller MC, Migliore L, Marquez C, Tapia W, Cedeño V, Rossolini GM, et al. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of galápagos land iguanas: No man, no resistance. *PLoS One*. 2010;5(2):3–6.
 26. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):1–11.
 27. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Vol. 32, Clinical Laboratory Standards Institute. 2014. 1-188 p.
 28. Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J*. 2010;48(3):385–407.
 29. Leonard L, Chibane LB, Bouhedda BO, Degraeve P, Oulahal N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front Microbiol*. 2016;7.