

Mecanismos de ação e resistência à colistina. Testes de triagem para avaliação da dessensibilização da colistina.

Bioq. Melina Rapoport

Serviço Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Lab. Nacional/Regional de Referencia em Resistencia aos Antimicrobianos.

Centro Colaborador da OMS sobre Vigilância de Resistência Antimicrobiana.

www.antimicrobianos.com.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea



ANTIBIOGRAMA
AMPICILINA
AMOXICILINA/CLAVULÂNICO
C1G: CEFALOTINA/CEFAZOLINA
CEFOXITINA
C3G: CEFOTAXIMA/CEFTACIDIMA*
AC. NALIDIXICO
CIPROFLOXACINA
ENROFLOXACINA
FLORFENICOL
ESTREPTOMICINA
GENTAMICINA
AMICACINA
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL
COLISTINA
FOSFOMICINA
TETRACICLINA**
AZITROMICINA (só em Salmonella)

β-lactâmicos

Polipéptideos

*(Ceftiofur) Se houver R a C3G → IMIPENEM
 **Se houver R a TET → TIGECICLINA



VIGILÂNCIA INTEGRADA DE RAM EM ANIMAIS.

PAINEL DE ATB A VIGILAR EM E. coli e Salmonella

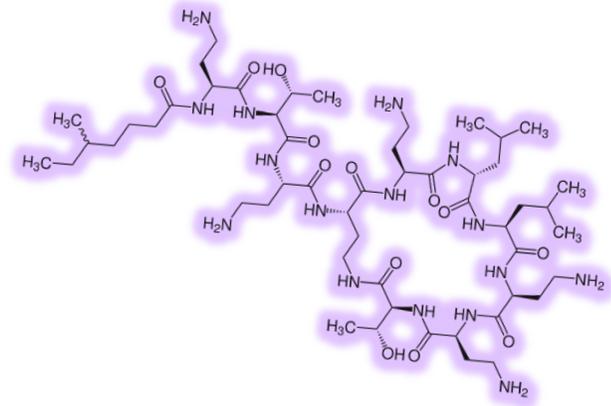
Polipeptídeos: Colistina e Polimixina-B

Moléculas grandes, anfipáticas e com várias cargas positivas

Drogas antigas

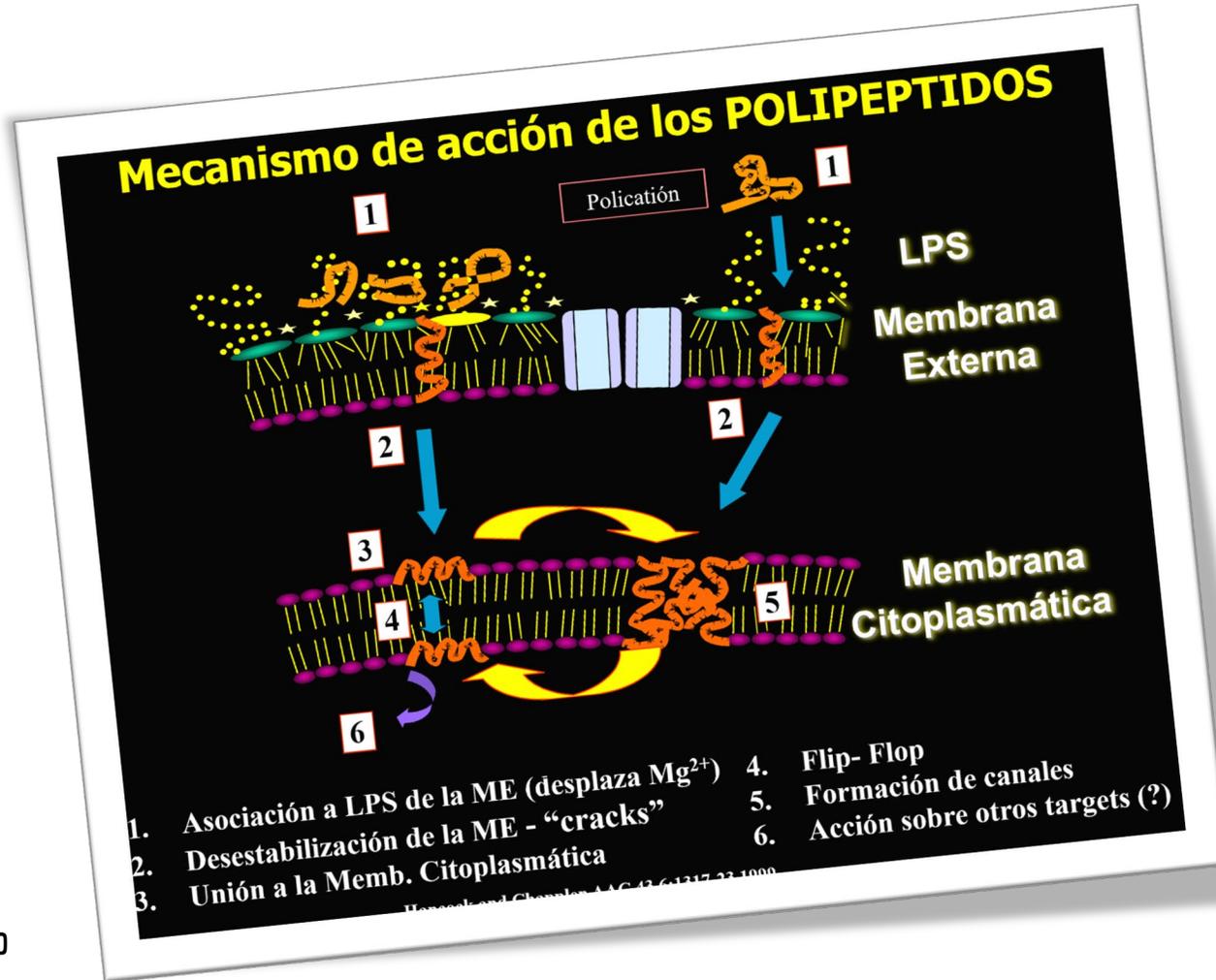
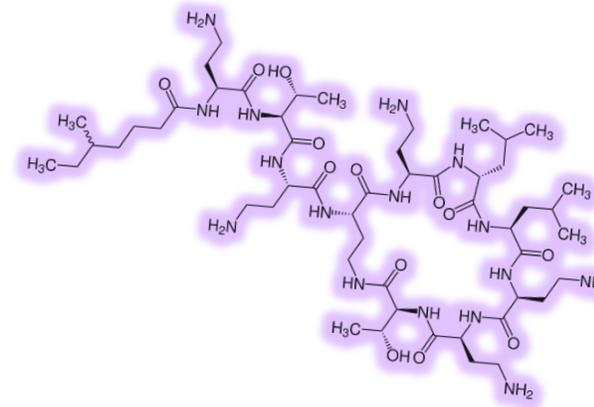
Em humanos: Terapia de resgate = alternativa de tratamento para germes MDR/XDR

Em animais: A Colistina é amplamente utilizada para prevenir infecções e como promotor de crescimento em animais destinados à alimentação.



Colistina e Polimixina-B

Mecanismo de Ação

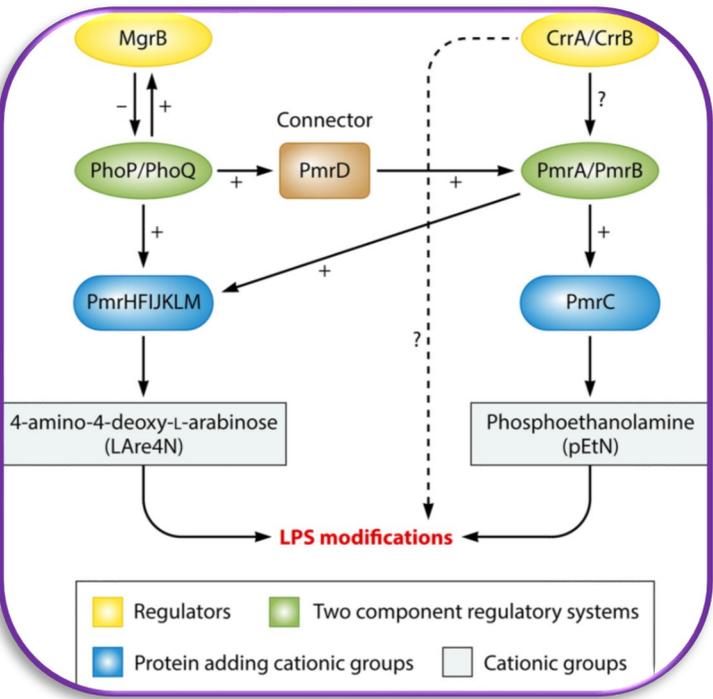
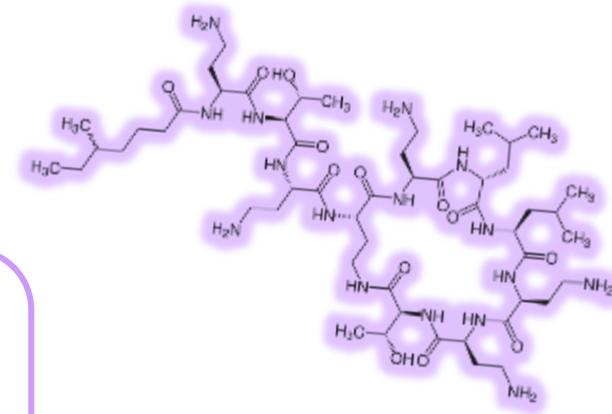


Mecanismo de Ação:

Ligação ao LPS da membrana externa:
Detergente catiônico, solubiliza membranas.
Bactericida.

Colistina e Polimixina-B

Mecanismos de Resistência



Mecanismos de resistência:

- **Cromossômico:** modificação de LPS por incorporação de resíduos com carga positiva: L-ara-4N, PEtN.

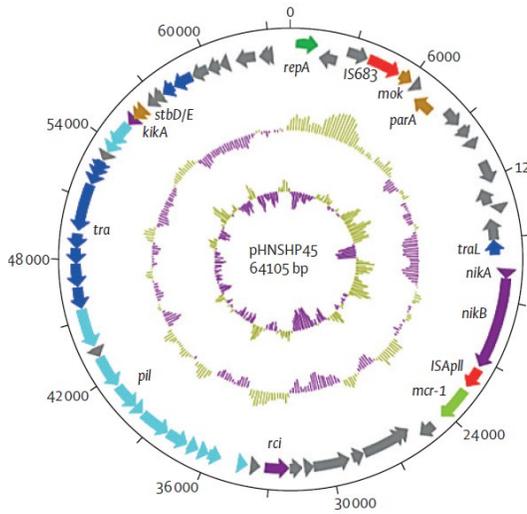
- **Plasmídico:** aquisição de gene **MCR** (Mobile Colistin Resistance) = PEtN-transferasa adiciona pEtN ao lípido A do LPS.

A resistência devida a mutações cromossômicas ou aquisição de MCR indistinguível fenotípicamente.

Resistência plasmídica transferível MCR

MCR (Mobile Colistin Resistance): enzima da família das fosfoetanolamino-transferases, adiciona pEtN ao lípido A do LPS. Até hoje MCR-1 a 10

❖ Primeira descrição da *mcr-1* na China Nov 2015*: *E. coli* de porcos e depois em outros animais de consumo, alimentos e amostras clínicas de pacientes.



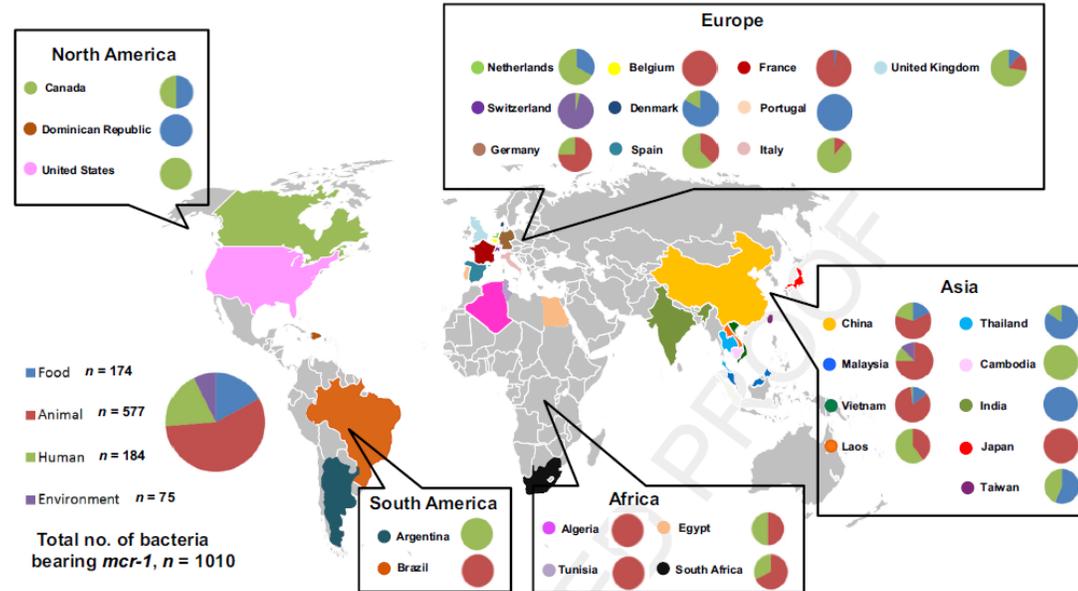
❖ Distribuição mundial

❖ Amostras humanas, animais alimentares e ambientais.

❖ Principalmente em *E. coli*.

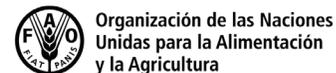
❖ Plásmidos principais: IncI2, IncX4, IncHI2

❖ Associação com mecanismos de R: CTX-M, CMY, NDM, KPC, OXA-48.

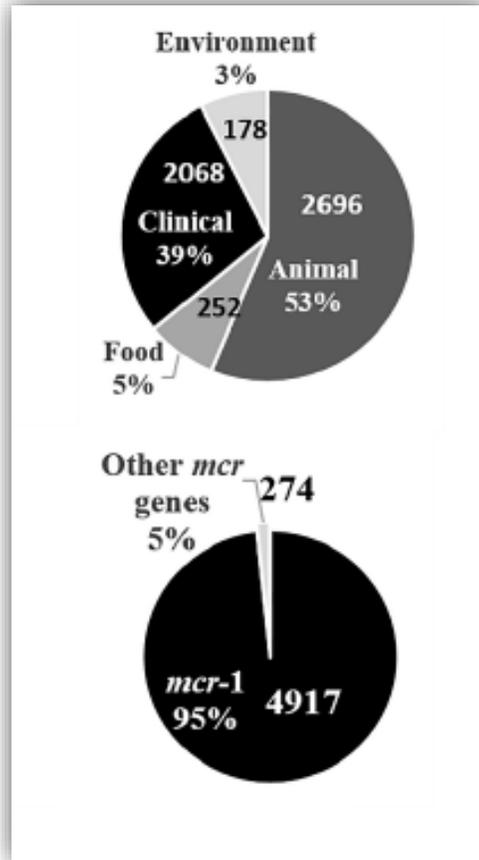


Yi-Yun Liu e col. Lancet Infect Disease 2015; Skov RL Eurosurveillance 2016; Poirel L JAC 2016; Baron S IJAA 2016; Poirel L CMR 2017; Kluytmans J Eurosurveillance 2017; Faccone D RPSP 2020.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

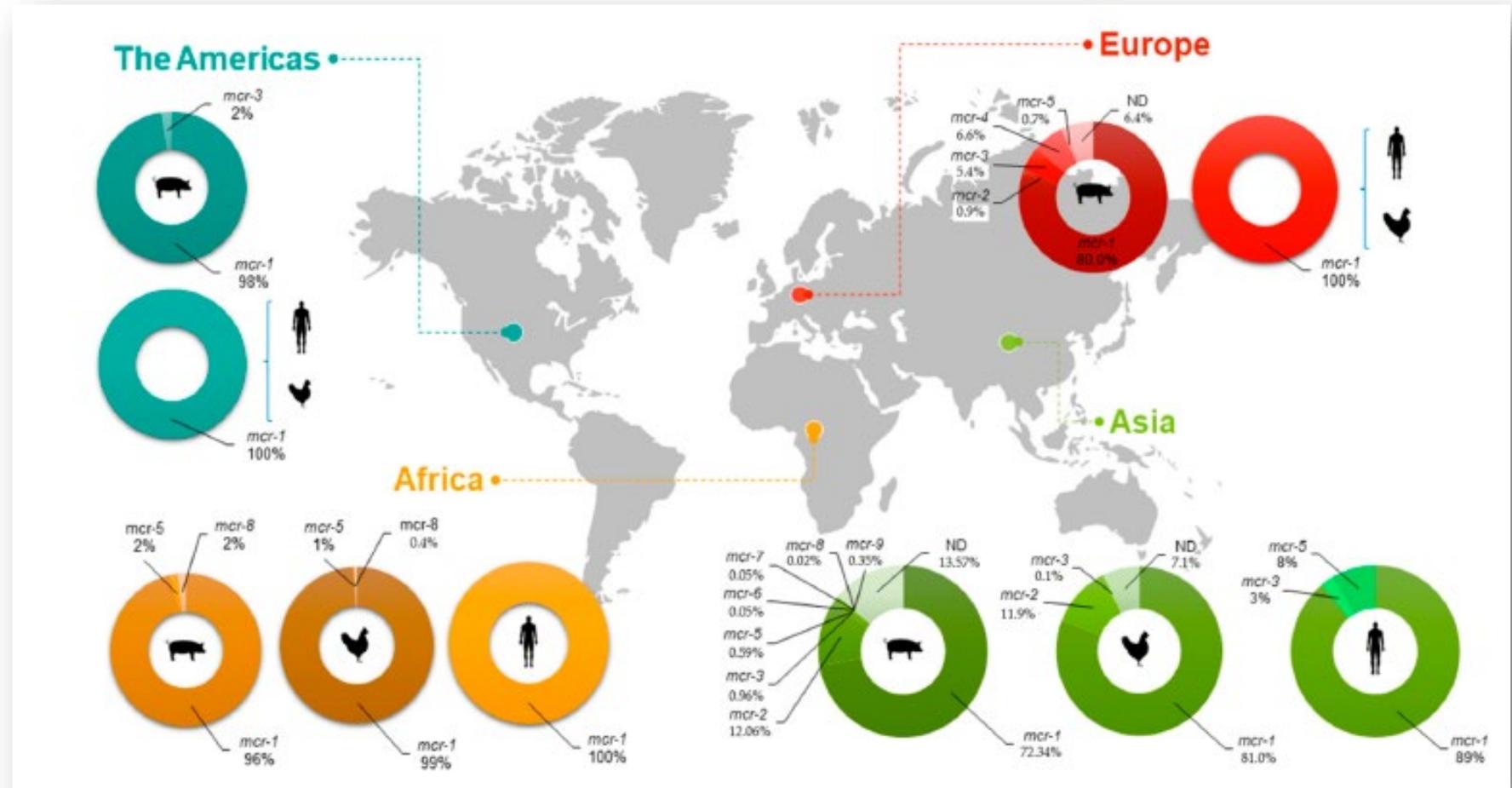


Distribuição global de mcr dependendo do hospedeiro



Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980–2018). Elbediwi M e col. *Microorganisms* 2019, 7, 461;

Distribuição global de variantes de mcr em *E. coli* de amostras de porcos, frangos e humanos saudáveis



Worldwide Prevalence of mcr-mediated Colistin-Resistance Escherichia coli in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock—A Systematic Review and Meta-Analysis. Bastidas-Caldes Carlos e col. *Pathogens* 2022, 11, 659.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

MCR na AMÉRICA LATINA

Isolamentos clínicos humanos (infecção e colonização)
Isolamentos clínicos de animais (grandes e de companhia).
Animais para consumo: porcos, frangos (sadios)
Aves de criação, pinguins, gaviotas.
Alimentos processados

Alto de nível de ocorrência em população sadia (Bolívia)

E. coli, *K. pneumoniae*, *C. amalonaticus*, *C. braakii*,
Salmonella, Shigella

MCR-1 e variantes, MCR-5 y MCR-9

Isolamentos genéticamente não relacionados.
Alta diversidade clonal em *E coli*



Quiroga C. e col 2019 RAM; Dominguez J e col 2019 Front. Cell. Infect. Microbiol; Rumi MV e col. 2019 Vet Mic; Sennati S e col. 2017 JAC; Giani T. e col 2018 EuroSurveillance; Legarraga P e col. 2018 Rev Chilena Inf.; Melgarejo Touchet N. e col 2018 Rev Sal Pub Paraguay.; Ugarte Silva RG e col. 2018 An Fac Med.; Medina J e col. 2017 Rev Med Uruguay; Delgado-Blas JF e col. 2016 AAC.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

✓ A detecção de genes *mcr* aumentou em termos de dispersão e variantes

✓ Transmissão favorecida pela exposição a baixas concentrações de colistina: uso veterinário e profilaxia = o uso de colistina em animais para consumo humano seria responsável pelo aparecimento e transmissão dos genes *mcr*.

✓ A prevalência de genes *mcr* em animais >> humanos saudáveis ou amostras clínicas.

✓ Foi sugerido que os plásmidos portadores de *mcr* passam de animais para humanos



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Em janeiro de 2019, o Ministério da Agricultura da Argentina proibiu o uso de colistina para fins veterinários.

(<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/31500-0-19999/318811/norma.htm>).

TESTES DE SENSIBILIDADE

1) ANTIBIÓTICO:

Para os testes in vitro deve ser utilizado **Colistina-sulfato** (não usar Col+Metanossulfonato)

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

TESTES DE SENSIBILIDADE

1) ANTIBIÓTICO:

Para os testes in vitro deve ser utilizado **Colistina-sulfato** (não usar Col+Metanossulfonato)

2) PONTOS DE CORTE: EUCAST E CLSI.

O LNR sugere o ponto de corte EUCAST:
 $\leq 2\mu\text{g/ml}$ Sensível, $\geq 4\mu\text{g/ml}$ Resistente

TESTES DE SENSIBILIDADE

1) ANTIBIÓTICO:

Para os testes in vitro deve ser utilizado **Colistina-sulfato** (não usar Col+Metanossulfonato)

2) PONTOS DE CORTE: EUCAST E CLSI.

O LNR sugere o ponto de corte EUCAST:
 $\leq 2\mu\text{g/ml}$ Sensível, $\geq 4\mu\text{g/ml}$ Resistente

3) METODOLOGIAS:

Gold standard: microdiluição (BMD)

Joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints working Group 2016:
Col-S + caldo MH ajustado com cátions + placas poliestireno sem aditivos

Metodologias alternativas aceitadas e recomendadas:

Ágar Spot, Predifusão com comprimidos, Drop Test, Eluição de discos.

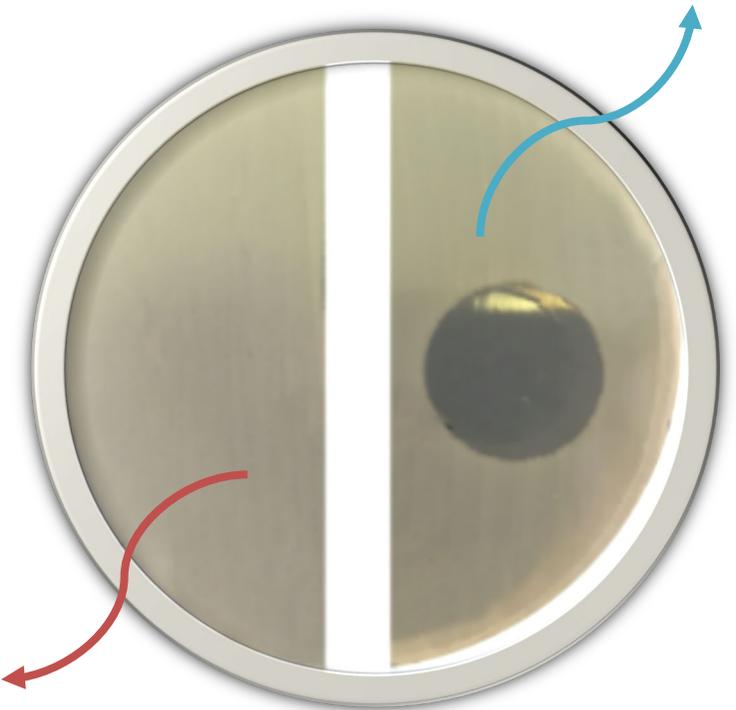
<http://antimicrobianos.com.ar/2017/09/protocolos-colistin/>

A difusão em disco não é recomendada, pois não se correlaciona com as metodologias de diluição= falsa sensibilidade.

Pré-difusão com comprimidos de COLISTIN Rosco-Neosensitabs®

1. Colocar o comprimido COL 10µg em placa de ágar MH
2. Incubar 2hs a 35-37°C
3. Retirar a placa do fogão e remover o comprimido
4. Deixar a placa a T° amb 18-22hs.
5. A placa pode ser conservada assim pré-difundida a 4°C
6. Inocular com 0,5McF do isolamento para ensaiar
7. Incubar 18hs a 35-37°C
8. Interpretar zona de inibição.

Interpretação (para Enterobacterales):
Pontos de corte recomendados pelo criador
S ≥16mm, I 12-15mm, R ≤11mm



Resistente
(CIM ≥4µg/ml)

Sensível
(CIM 0,5µg/ml)

Esta metodologia permite detectar a resistência à colistina mediada tanto por mecanismos cromossômicos quanto por plasmídeos transferíveis (MCR).

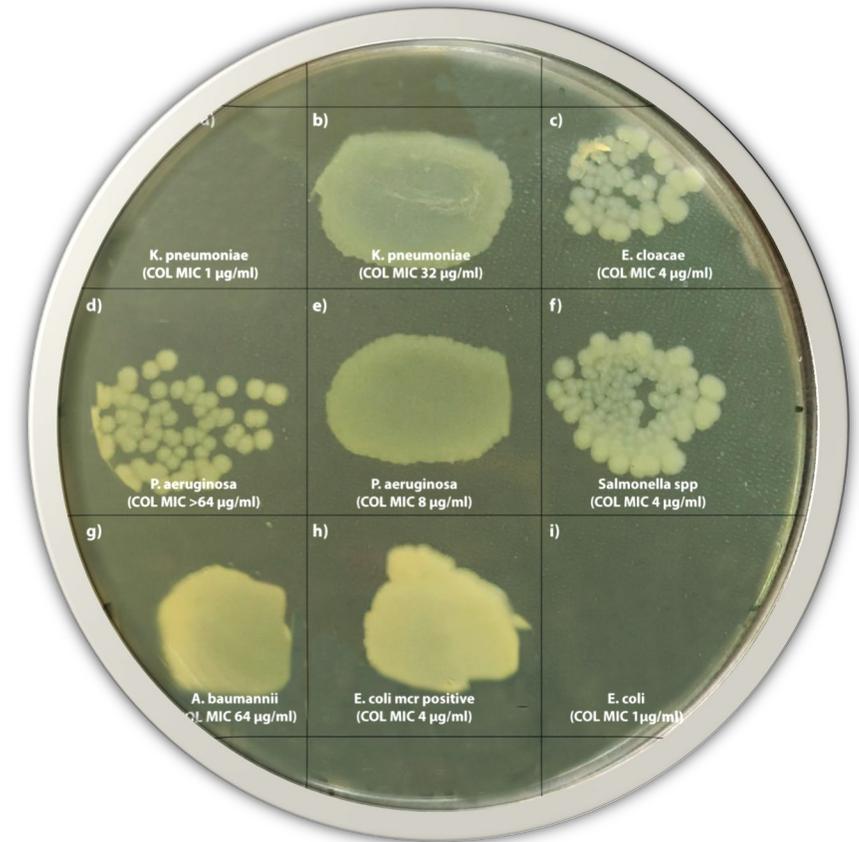
Método de ÁGAR SPOT COLISTINA / COL-TEST®

1. Preparar inóculo do isolamento a ensaiar 0,5 McFarland
2. Embeber um hisopo estéril com o inóculo, baixar o excesso e fazer um spot de 10 cm na placa de COL-TEST.
3. Incubar a 35-37°C durante 18-20hs.
4. Observar crescimento e Interpretar.

Interpretação:

Positivo: Visualização de >1 colônia = Resistente a COL

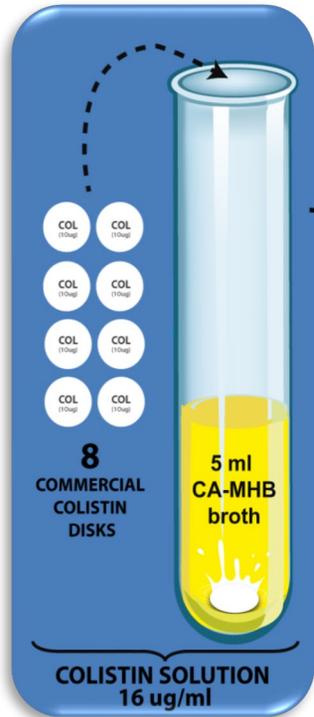
Negativo: Visualização de 1 ou nenhuma colônia = Sensível a COL



Esta metodología permite detectar a resistencia à colistina mediada tanto por mecanismos cromosómicos quanto por plasmídeos transferíveis (MCR).

Método da gota ou COL DROP TEST

Solução
COL 16µg/ml

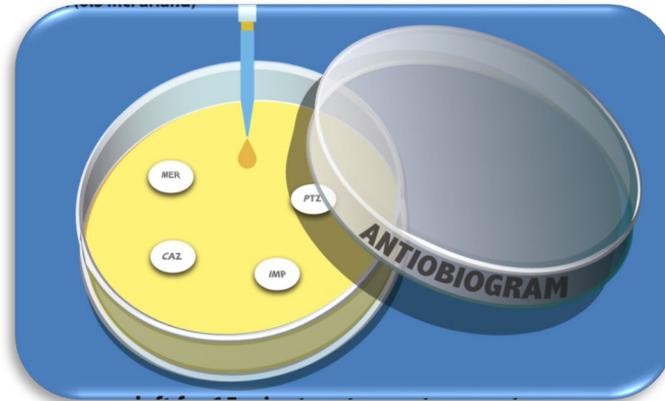


- Eluir durante 1h.
- Retirar os discos.
- Conservar a 4°C.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

CA-MHB: caldo MH ajustado en cationes

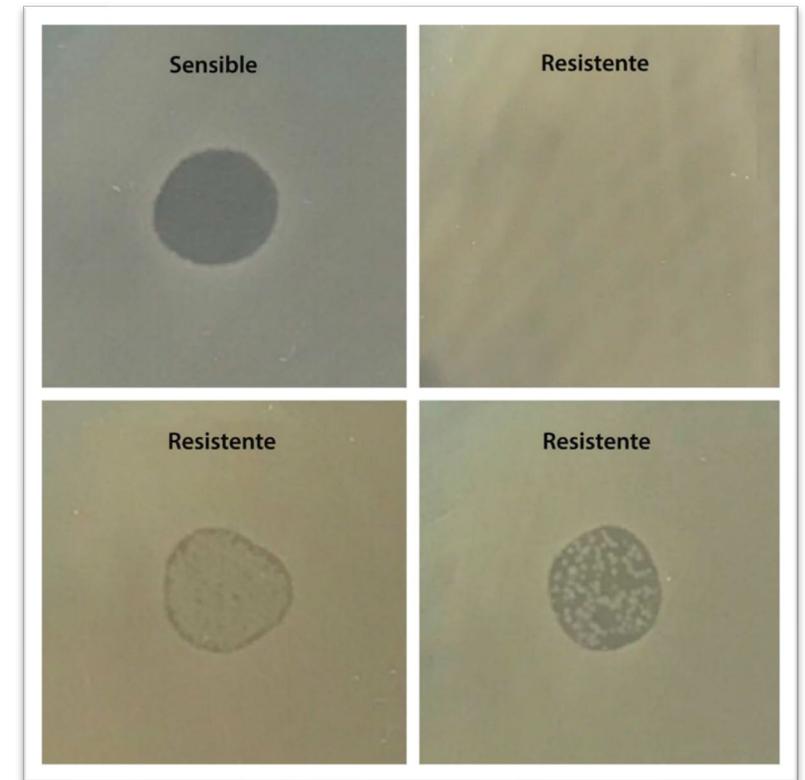
Procedimento



- Hissopar o ágar MH com 0,5McFarland da cepa a testar.
- Colocar 10µl de sol. COL.
- Deixar 15min para que seja absorvido.
- Inverter a placa e incubar a 35°C 16-18h.

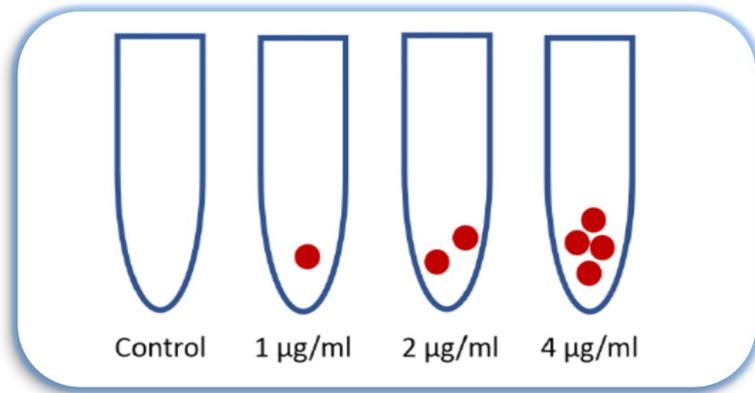
Esta metodologia permite detectar a resistência à colistina mediada tanto por mecanismos cromossômicos quanto por plasmídios transferíveis (MCR).

Interpretação



- **COL Sensível:** presença de zona de inibição de qualquer diâmetro.
- **COL Resistente:** ausência de zona de inibição.

Método de Eluição de discos de colistina



Macrométodo

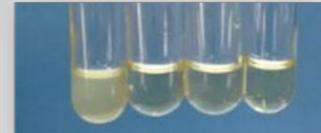
- Adicionar 1, 2 e 4 discos de COL a tubos com 10ml de CAMHB.
- Adicionar 50 µl do 0.5 Mc Farland
- Incubar 16-20hs

Tanto o Macro quanto o Micrométodo (adaptado por LNR, volume final 1ml) podem ser utilizados para avaliar Enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*

Adaptado de: Colistin Broth Disk Elution Test, Universidade de California em Los Angeles (UCLA), USA. Junho 2017.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

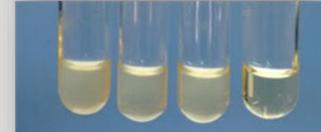
INTERPRETACION



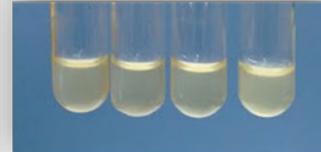
SENSIBLE



SENSIBLE



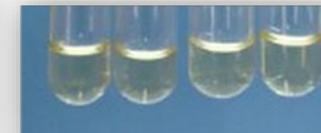
RESISTENTE



RESISTENTE

TC 1 2 4

INTERPRETACION



INVALIDO

No enturbia el control de crecimiento (TC)



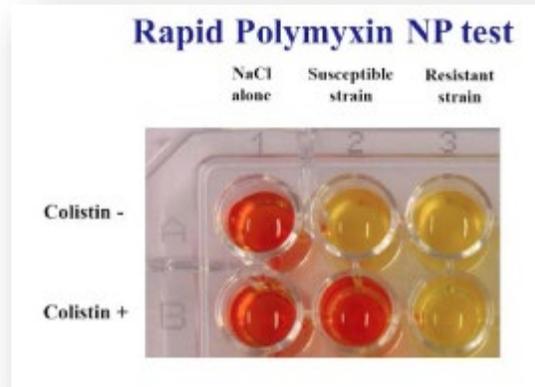
INVALIDO

Tubo salteado

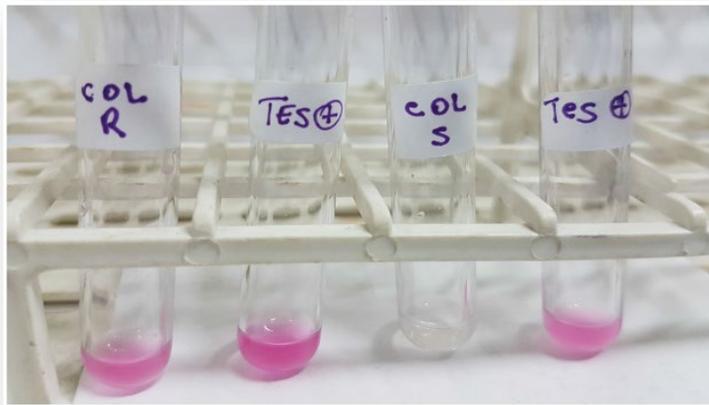
Outras metodologias para avaliar a sensibilidade à COLISTINA



SensiTest® Colistina Liofilchem.



Rapid POL-NP® Elitech (etb)

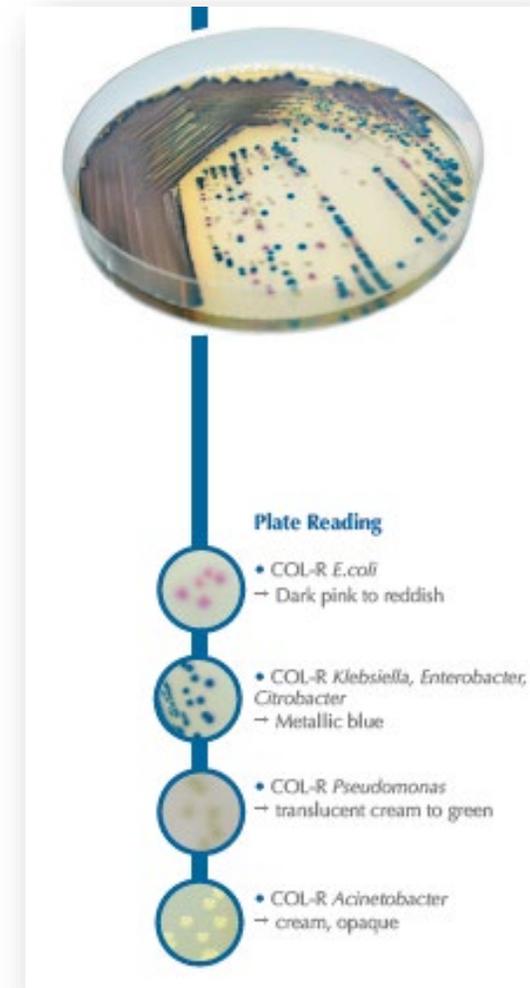


Método colorimétrico Andrade para resistência à colistina em etb

Rodriguez C. H. e col. J. of Chemotherapy 2019



NG-TEST mcr-1



CHROM-ágar COL-APSE

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Muito obrigado!

Serviço Antimicrobianos
INEI-ANLIS “Dr C. G. Malbran”

www.antimicrobianos.com.ar
rapoport@anlis.gob.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

