



Aplicação de Análise de Sobrevivência em dados de CIM de *Escherichia coli*

Juliana Gardelli¹ e Josmar Mazucheli²

^{1,2} Programa de Bioestatística/Universidade Estadual de Maringá

RESUMO

Na rotina laboratorial quando se deseja definir a atividade de um agente antimicrobiano diante de um determinado microorganismo utiliza-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é definida como a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível do microorganismo. O verdadeiro valor que o inibe está entre a última diluição/concentração que não o inibiu e a primeira que inibiu. Esta particularidade associada ao valor observado da CIM caracteriza o que é conhecido em Análise de Sobrevivência com resposta censurada intervalarmente. Neste trabalho são comparadas as distribuições das CIMs obtidas pelo método de vigilância e pelo método de cultura clínica para as estirpes de enterobactérias: *Escherichia coli*. As covariáveis utilizadas nas análises são: o tipo de amostra (clínicas ou de vigilância) e o ano cuja amostra foi coletada.

Palavras chave: Concentração Inibitória Mínima, Análise de sobrevivência, Censura intervalar.

1 INTRODUÇÃO

A CIM é proveniente de ensaios de diluição (LEE; WHITMORE, 1999) que se caracterizam pela exposição de um isolado bacteriano a concentrações crescentes de antimicrobianos. A determinação da CIM é estabelecida pela medição da sobrevivência dos isolados neste gradiente de concentrações (ROLLO, 2011).

A CIM é utilizada para verificar o aumento na resistência bacteriana aos antimicrobianos. No Brasil, para tentar controlar este grave problema de resistência nas diversas instituições de saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um sistema de monitoramento. Na Nota Técnica N° 01/2013 (BRASIL, 2013), foi instituído que além dos microrganismos isolados de materiais clínicos, podem ser obtidas culturas de vigilância para monitorar o aparecimento de bactérias multirresistentes. Neste documento a ANVISA preconiza que cabe à cada instituição avaliar a necessidade de implantar a coleta de culturas de vigilância de acordo com seu perfil epidemiológico.

No Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM), a coleta de culturas de vigilância foi instituída em 2011 juntamente com o desenvolvimento do projeto “Vigilância Epidemiológica de Bactérias Multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá”. O HUM é um hospital de ensino vinculado à Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá no Paraná. Ele possui 123 leitos em atividade para internações em enfermaria, UTIs pediátrica, adulta e neonatal e pronto-atendimento.

O método de detecção da CIM utilizado no HUM é o Sistema Automatizado *Phoenix BD*. Este sistema utiliza o “Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos” (TSA), *BD PhoenixTM*, que consiste num teste de microdiluição em caldos com concentrações crescentes, como por exemplo, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/L. A primeira concentração que não é observada turbidez define a CIM.

De acordo com Wu (2008), este processo de detecção da CIM retorna uma resposta censurada intervalarmente. Por exemplo, uma CIM de 8 mg/L indica que seu valor real encontra-se entre 4 e 8 mg/L. Devida a esta particularidade, dados de CIM podem ser analisados via procedimentos usuais de Análise de Sobrevivência, os quais contemplam a possibilidade de observações censuradas.

Sob o ponto de vista da análise estatística paramétrica, muitos trabalhos na literatura consideram que dados de CIM seguem distribuição Log-Normal. Sob esta suposição tem-se que o logaritmo da CIM é uma variável aleatória normalmente distribuída com média que pode ser dependente de covariáveis.

Foram justados três modelos, para avaliar a resitência da bactéria *Escherichia coli* aos antimicrobianos: Ertapenem, Imipenem e Meropenem. Todos os modelos foram ajustados utilizando a Proc Lifereg (STUDIO, 2015), que considera os 3 tipos de censura inerente a estes dados. As duas covariáveis avaliadas foram: *Tipo* e *Ano*. O Modelo 1 foi ajustado apenas com a covariável *Ano*. O Modelo 2 foi ajustado apenas a covariável *Tipo* e o Modelo 3 foi ajustado com as duas covariáveis.

2 METODOLOGIA

Uma variável aleatória contínua com distribuição Log-Normal é caracterizada pela sua função densidade de probabilidade descrita por

$$f(c | \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma c} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\log c - \mu)^2 \right] \quad (1)$$

em que $\mu \in \mathbb{R}$ e $\sigma > 0$. O valor esperado desta variável aleatória Log-Normalmente distribuída é $E(C) = \exp(\mu + 0.5\sigma^2)$ enquanto que $Var(C) = \exp(2\mu + \sigma^2)[\exp(\sigma^2) - 1]$.

A partir de (1) pode-se verificar que a função de distribuição acumulada $F(c | \mu, \sigma)$, que indica a probabilidade de um isolado ser inibido no máximo até a concentração C é dada por

$$F(c | \mu, \sigma) = \Phi \left(\frac{\log(c) - \mu}{\sigma} \right) \quad (2)$$

em que $\Phi(\cdot)$ é a função de distribuição acumulada de uma variável aleatória normal padrão.

A partir de (2) a função de sobrevivência fica definida por $S(c | \mu, \sigma) = 1 - \Phi \left(\frac{\log(c) - \mu}{\sigma} \right)$.

Uma das características mais importantes da distribuição Log-Normal é sua relação com a distribuição Normal. Se a variável aleatória C tem distribuição Log-Normal, pela transformação $Y = \log(C)$, tem-se que $Y \sim N(\mu, \sigma^2)$. De acordo com a natureza dos dados observados μ e σ podem depender de uma ou mais covariáveis.

Klein e Moeschberger (2005) e Colosimo e Giolo (2006) discutem o uso de modelos paramétricos para estimar a sobrevivência para dados censurados. Segundo estes autores a forma mais eficiente de acomodar o efeito das covariáveis na variável resposta é utilizando um modelo de regressão, que estratifica os resultados da resposta pelos níveis das covariáveis. Neste trabalho temos como covariáveis o “tipo de cultura” e o “ano”.

Seja a variável aleatória C , não negativa e não censurada, com função densidade Log-Normal. Fazendo a transformação $Y = \log(C)$, obtém-se uma variável aleatória Y , com função densidade Normal. A função de verossimilhança para Y é expressa por $L(\theta) = \prod_{i=1}^n f(y_i; \theta)$, onde $f(y)$ é a função densidade da Normal. Para esta distribuição, θ representa o vetor de parâmetros (β_0, β_1) e o termo y_i representa cada valor observado na amostra, para a variável aleatória Y .

De acordo com Klein e Moeschberger (2005), ao construir uma função de verossimilhança para dados censurados é preciso considerar cuidadosamente as informações que cada indivíduo fornece. Cada um contribui com uma informação específica. Se fosse observado o tempo exato da ocorrência do evento, a contribuição de cada indivíduo para a $L(\theta)$, seria a função densidade, no tempo registrado. Isolados censurados à direita informam que a concentração de falha é maior que a concentração de censura observada, neste caso a função de sobrevivência é mais informativa para a função de verossimilhança do que a função densidade. Para um isolado censurado à esquerda, tudo o que se sabe é que a CIM é inferior à primeira concentração observada na placa, de modo que a contribuição para a probabilidade é dada pela função de distribuição acumulada, $F(C)$, avaliada na primeira concentração da placa. O *Proc Lifereg* (STUDIO, 2015), admite os 3 tipos de censura inerente a dados de CIM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram justados três modelos com as duas covariáveis de interesse: *Tipo* e *Ano*. O Modelo 1 foi ajustado apenas com a covariável *Ano* [Y] = *ANO*. O Modelo 2 foi ajustado apenas a covariável *Tipo*: [Y] = *TIPO* e o Modelo 3: [Y] = *TIPO* + *ANO*.

A Tabela 1 representa a distribuição das CIMs de *Escherichia coli*, divididas pelos antimicrobianos testados e pelo tipo de amostra. A Tabela 2 mostra o número de isolados por ano e por tipo de amostra.

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de *Escherichia coli* para Ertapenem, Imipenem e Meropenem.

Microorganismo	Antibióticos	Tipo de Amostra	Nº de Isolados	Distribuição das CIMs					
				0.25	0.5	1	2	4	8
<i>Escherichia coli</i>	Ertapenem	Clínica	274	3	402	10	4	12	-
		Vigilância	24	1	-	-	-	23	-
	Imipenem	Clínica	270	-	-	579	10	9	5
		Vigilância	26	-	-	19	4	-	3
	Meropenem	Clínica	277	-	-	587	7	2	10
		Vigilância	22	-	-	14	1	1	6

Tabela 2: Distribuição de frequências do número de isolados por ano e por tipo de cultura de *Escherichia coli* para Ertapenem, Imipenem e Meropenem.

Antimicrobiano	Amostra Clínica					Amostra de Vigilância				
	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016
<i>Escherichia coli</i>										
Ertapenem	108	74	67	17	8	-	1	4	9	10
Imipenem	118	71	62	12	7	-	1	7	7	11
Meropenem	118	73	71	13	2	-	1	5	7	9

Tabela 3: Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e p-valor para os três modelos observados para os três antimicrobianos para *Escherichia coli*.

Ertapenem					
Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	p-valor
1	$\hat{\beta}_0$	-28.8030	13.9882	[-56.2194; -1.3866]	0.0395
	$\hat{\beta}_1$	9.7742	4.7879	[0.3901; 19.1584]	0.0412
2	$\hat{\beta}_0$	1.8778	0.3397	[1.2121; 2.5436]	<.0001
	$\hat{\beta}_1$	-3.6857	0.9653	[-5.5777; -1.7937]	0.0001
3	$\hat{\beta}_0$	1.6233	0.4110	[0.8178; 2.4288]	<.0001
	$\hat{\beta}_1$	-3.6853	0.8968	[-5.4429; -1.9277]	<.0001
	$\hat{\beta}_2$	0.1080	0.1566	[-0.1989; 0.4150]	0.4903
Imipenem					
Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	p-valor
1	$\hat{\beta}_0$	-16.1690	9.3808	[-34.5551; 2.2171]	0.0848
	$\hat{\beta}_1$	3.6908	2.2074	[-0.6356; 8.0173]	0.0945
2	$\hat{\beta}_0$	-2.5729	1.8999	[-6.2967; 1.1508]	0.1757
	$\hat{\beta}_1$	-24.8654	112617.6	[-220751; 220701.6]	0.9998
3	$\hat{\beta}_0$	-9.0246	6.4564	[-21.6790; 3.6298]	0.1622
	$\hat{\beta}_1$	-22.5843	111590.1	[-218735; 218690.1]	0.9998
	$\hat{\beta}_2$	2.0497	1.6080	[-1.1020; 5.2014]	0.2024
Meropenem					
Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	p-valor
1	$\hat{\beta}_0$	-8.8410	3.3626	[-15.4316; -2.2505]	0.0086
	$\hat{\beta}_1$	2.2950	0.8963	[0.5383; 4.0518]	0.0105
2	$\hat{\beta}_0$	-0.2558	0.6036	[-1.4388; 0.9273]	0.6718
	$\hat{\beta}_1$	-13.6385	57740.12	[-113182; 113154.9]	0.9998
3	$\hat{\beta}_0$	-2.7508	2.1293	[-6.9241; 1.4224]	0.1964
	$\hat{\beta}_1$	-12.5378	57555.49	[-112819; 112794.2]	0.9998
	$\hat{\beta}_2$	0.8393	0.6318	[-0.3990; 2.0777]	0.1840

A Tabela 3 apresenta os resultados do ajuste dos três modelos para a bactéria *Escherichia coli*. O Modelo 1 apresentou significância para o Ertapenem, a estimativa de β_1 foi 9.7742, com IC ([0.3901; 19.1584]). Os outros dois antimicrobianos não apresentaram significância.

O Modelo 2, também apresentou significância apenas para o Ertapenem, com $\beta_1 = -3.6857$, com IC $([-5.5777; -1.9277])$, indicando que este parâmetro é significativamente diferente de zero. A estimativa negativa para β_1 indica que a média da $\log(CIM)$ da cultura clínica é menor que a de vigilância para este antimicrobiano. Para os outros dois antimicrobianos as estimativas não são significativamente diferentes de zero.

O Modelo 3, também só apresenta significância para o Ertapenem, no parâmetro $\beta_1 = -3.6853$, com IC $([-5.4429; -1.9277])$ este representa o tipo de cultura, com IC $([-2.4545; -1.0090])$ o parâmetro β_2 , relativo ao ano, não apresentou significativamente diferente de zero.

4 CONCLUSÃO

Para estes dados observados, o Modelo 1 apresenta significância para os antimicrobianos Ertapenem e Meropenem, indicando um aumento médio significativo na $\log(CIM)$ ao longo dos anos. Já para o Modelo 2, apenas para o Ertapenem, indicando que a média da $\log(CIM)$ da cultura clínica é menor que a de vigilância para este antimicrobiano. O Modelo 3 avalia a inclusão das duas covariáveis, como era de se esperar só para o Ertapenem houve significância, mas apenas para o tipo de amostra. Esta diferença pode estar associada ao fato de ficarem muito poucas observações nas amostras de Vigilância, quando os dados são divididos nos níveis das 2 covariáveis para este modelo.

Referências

- BRASIL. Nota técnica nº 01/2013 -medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. agência nacional de vigilância sanitária. 2013.
- COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. Análise de sobrevivência aplicada. In: *ABE-Projeto Fisher*. [S.l.]: Edgard Blücher, 2006.
- KLEIN, J. P.; MOESCHBERGER, M. L. *Survival analysis: techniques for censored and truncated data*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2005.
- LEE, M.-L. T.; WHITMORE, G. Statistical inference for serial dilution assay data. *Biometrics*, Wiley Online Library, v. 55, n. 4, p. 1215–1220, 1999.
- ROLLO, S. N. *Herd-level risk factors associated with antimicrobial susceptibility patterns and distributions in fecal bacteria of porcine origin*. Tese (Doutorado) — Texas A&M University, 2011.
- STUDIO, S. 3.4: *User's Guide SAS Institute Inc Cary*. [S.l.]: NC, 2015.
- WU, H. *Statistical inference for minimum inhibitory concentration data*. Tese (Doutorado) — Dept. of Statistics and Actuarial Science-Simon Fraser University, 2008.