



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

IGOR LORRAN SERRA RODRIGUES

DESEMPENHO DO TESTE DE ELUIÇÃO DA POLIMIXINA B EM
Enterobacterales

Brasília-DF

2023

IGOR LORRAN SERRA RODRIGUES

DESEMPENHO DO TESTE DE ELUIÇÃO DA POLIMIXINA B EM
Enterobacterales

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da
Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel
em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tanise Vendruscolo Dalmolin

Brasília-DF

2023

IGOR LORRAN SERRA RODRIGUES

Apresentação em 17 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Tanise V. Dalmolin

Tanise Vendruscolo Dalmolin – Universidade de Brasília

Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior – Hospital da Criança de Brasília

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é considerada um grave problema de saúde pública em âmbito mundial e uma crescente ameaça para o tratamento de infecções causadas por bactérias. Com o foco de evitar a disseminação de micro-organismos resistentes, é necessária a avaliação e desenvolvimento de metodologias que possam ser utilizadas na rotina laboratorial para facilitar o trabalho e liberação de resultados confiáveis para um adequado e rápido manejo do paciente. A microdiluição em caldo é o teste referência para avaliar a suscetibilidade das polimixinas com elevada confiabilidade, porém é uma metodologia bastante laboriosa, que requer materiais que não são comumente encontrados na rotina laboratorial. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar metodologia alternativa para pesquisa de resistência às polimixinas, denominada microeluição da polimixina B, com a finalidade de reduzir os custos do teste e que o mesmo seja confiável. Foram utilizados 26 isolados bacterianos, os quais 14 eram resistentes e 12 eram sensíveis à polimixina B. A concordância categórica e a concordância essencial entre a metodologia testada e a de referência foi de 92,31%. Já em relação ao Erro Maior não foi encontrado em nosso estudo, enquanto o Erro Muito Maior foi de 7,7%. Levando em consideração o nível percentual de paridade entre as duas metodologias (microdiluição e microeluição) pode-se concluir que a microeluição em caldo é um método confiável, e os resultados obtidos podem ser relevantes nas decisões terapêuticas, colaborando assim no combate à resistência aos antimicrobianos. Além disso, a metodologia proposta utiliza materiais de baixo custo e de fácil acesso em laboratórios de microbiologia.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana; Polimixina B; Metodologias inovadoras; *Enterobacterales*; Teste de eluição; gene *mcr-1*; Microdiluição em caldo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 Resistência bacteriana	5
1.2 Polimixina B e a resistência	6
2 METODOLOGIA	9
2.1 Isolados bacterianos	9
2.2 Caracterização dos isolados clínicos	9
2.3 Teste de microeluição da polimixina B	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4 CONCLUSÃO	16
5. REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é um problema crescente em saúde pública, sendo entendida como a capacidade que algumas bactérias possuem de se tornarem resistentes aos antibióticos, o que torna o tratamento das infecções cada vez mais difícil. A resistência bacteriana carece urgentemente de atenção por partes das autoridades, pois é considerada um grave problema de saúde em âmbito mundial e uma crescente ameaça para o tratamento de infecções causadas por bactérias (VENTOLA, 2015). O impacto do aumento da resistência ocorre em qualquer grupo etário, país e contexto epidemiológico, tornando o tratamento difícil e com altos custos para a sociedade, tanto em questões humanas como econômicas, resultando em doenças de curso prolongado e aumento da mortalidade. É causada por vários fatores, incluindo o uso excessivo e inadequado de antibióticos em humanos, animais e meio ambiente (FRIEDMAN et al.; 2016).

De acordo com as previsões lideradas pelo macroeconomista Jim O'Neil, até 2050 deverão ocorrer em torno de 10 milhões de mortes por ano em decorrência de infecções causadas por bactérias resistentes. Se nenhuma ação for tomada para evitar a disseminação da resistência frente aos antimicrobianos, estima-se que a perda de produção global poderá atingir 100 trilhões de dólares americanos (O'NEIL, 2014). Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), publicado ao final do segundo semestre de 2022, aproximadamente 700 mil pessoas vêm à óbito todos os anos devido a infecções resistentes aos antibióticos (WHO, 2022). Uma análise sistemática realizada em 2019, estimou que aproximadamente 1,27 milhões de pessoas perderam a vida em casos associados à resistência bacteriana (MURRAY et al., 2019).

Outro fato relevante, relaciona-se ao risco do aumento da resistência bacteriana durante a pandemia da COVID-19. Um estudo realizado em 2020 demonstrou que aproximadamente 72% dos pacientes internados com COVID-19 foram submetidos à antibioticoterapia, enquanto apenas 8% tiveram infecção bacteriana de fato, tornando comum neste período, o uso indiscriminado de antibióticos, podendo favorecer o aumento da incidência de resistência bacteriana (GETAHUN et al., 2020; MAHONEY et al., 2021).

Para tentar conter a resistência bacteriana, a administração adequada dos antibióticos é fundamental, incluindo o uso de doses corretas, o tratamento dos pacientes

por tempo suficiente e a realização de testes de suscetibilidades aos antibióticos antes de prescrever o tratamento. Ademais, medidas para reduzir o uso excessivo de antibióticos, como a implementação de práticas de prescrição responsável e a promoção de boas práticas de higiene, também são cruciais para prevenir a resistência bacteriana (UCHIL et al., 2014).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos também são importantes para combater a resistência bacteriana. No entanto, a pouca rentabilidade da pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos são um obstáculo para a indústria farmacêutica, o que torna difícil a sua produção (GUIMARÃES et al., 2010). É necessário que sejam criados modelos econômicos que incentivam a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções resistentes. O enfrentamento para esta problemática requer uma abordagem coordenada e colaborativa para prevenir e controlar sua disseminação. Existem metodologias inovadoras sendo desenvolvidas, principalmente por pequenas e médias empresas como a utilização de novos compostos e a identificação de novos alvos terapêuticos (TERRENI et al., 2021).

A ordem *Enterobacterales* incluiu espécies patogênicas comumente responsáveis por infecções graves em hospitais e na comunidade. A virulência das enterobactérias é mediada por vários fatores, dentre eles a produção de toxinas, adesão às células hospedeiras, invasão e a resistência ao sistema imunológico. Além disso, também é comum nesse grupo de bactérias mecanismos de resistência, incluindo modificação de alvo, alteração da permeabilidade da membrana plasmática (perda de porinas e expressão de bombas de efluxo), e principalmente a produção de enzimas, as β -lactamases (β -lactamases de espectro estendido e carbapenemases) (BUSH et al., 2020; DAVIN-REGLI et al., 2019).

1.2 Polimixina B e a resistência

As polimixinas são consideradas um grupo de antimicrobianos polipeptídeos catiônicos, amplamente utilizados no passado para o tratamento de infecções bacterianas, mas que perderam a sua popularidade devido ao surgimento de outros medicamentos mais eficazes e menos tóxicos. Nos últimos anos, no entanto, tem havido um aumento na incidência de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos convencionais, o que tem levado a reintrodução das polimixinas nos tratamentos. Atualmente, existem duas formulações representantes dessa classe: a polimixina E (colistina) e a polimixina

B. As polimixinas diferem apenas por um aminoácido no anel peptídico, com o aminoácido fenilalanina em polimixina B e o aminoácido leucina em colistina. Além disso, a polimixina B é administrada como fármaco ativo, enquanto a colistina é administrada como pró-fármaco inativo (BISWAS et al., 2012; POIREL et al., 2017; SADER et al., 2015).

A polimixina B é um antibiótico polipeptídico natural que é produzido por bactérias do gênero *Paenibacillus* e *Bacillus*. É eficaz contra uma ampla variedade de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Atua inibindo a síntese da parede celular das bactérias Gram-negativas, levando à morte bacteriana. Devido ao seu alto potencial de toxicidade para os tecidos humanos, sua utilização é restrita a infecções graves e em casos de resistência a outros antibióticos, devido aos seus efeitos colaterais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade. A nefrotoxicidade é a toxicidade mais comum, e pode levar à insuficiência renal. A neurotoxicidade pode causar fraqueza muscular e formigamento, e a ototoxicidade pode causar perda auditiva (ZAVASCKI et al., 2007). Por essa razão, a polimixina B é usada como último recurso, sendo administrada por via intravenosa ou intramuscular e é utilizada para tratar infecções do trato urinário, sepse, meningite, pneumonia, dentre outras infecções graves.

Acreditava-se que os únicos mecanismos de resistência às polimixinas eram mediados por mutações cromossômicas, as quais levam a modificação do lipídeo A (componente do lipopolissacarídeo bacteriano) através de substituições catiônicas, diminuindo a afinidade das polimixinas (YE et al., 2016). Porém, a partir de 2015, foi identificado pela primeira vez o gene *mcr-1*, o qual é capaz de transferir facilmente entre as bactérias através de plasmídeos (KOBIS et al., 2020; LIU et al., 2015). O surgimento do gene *mcr-1* mudou o cenário de resistência às polimixinas, devido à possibilidade de transferência horizontal desse gene, tornando-se uma grande preocupação para a saúde pública.

Para o enfrentamento do aumento da incidência da resistência bacteriana, métodos rápidos e acreditados, que busquem avaliar a suscetibilidade bacteriana frente aos antimicrobianos, precisam ser desenvolvidos. Não há indicação para utilização dos testes de fita de gradiente ou disco difusão em ágar para polimixinas, pois sua difusão mostrou-se expressamente lenta, irregular e passível de erros consideráveis (LO-TEM-FOE et al., 2007). O método de referência recomendado pelo “*Brazilian Committee on Antimicrobial*

Susceptibility Testing (BrCAST)” para testes de suscetibilidade às polimixinas, é o de microdiluição em caldo.

A microdiluição em caldo uma técnica utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de um determinado agente antimicrobiano frente a uma população bacteriana. É um dos métodos mais comuns para testar a suscetibilidade dos micro-organismos frente à antimicrobianos e é amplamente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica e de pesquisa, o qual consiste na diluição seriada do antimicrobiano em meio de cultura apropriado, adicionando-o em uma placa de 96 poços, juntamente com um inóculo bacteriano final de 5×10^5 UFC/mL em cada poço (POIREL et al., 2017). A CIM é expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) e é definida como a concentração mais baixa do antimicrobiano que inibe o crescimento visível bacteriano.

Uma vantagem do método de microdiluição em caldo é que ele permite a avaliação da suscetibilidade a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos com rapidez e eficiência, porém, é considerado um teste difícil de ser realizado em laboratórios de rotina devido aos altos custos e tempo para execução. Além disso, em detrimento de possuir cargas catiônicas, as polimixinas aderem à uma variedade de materiais, principalmente nos plásticos dos poços de microtitulação (KARVANEN et al., 2011). Para tal, é indicada a utilização de tubos de vidro, visto que sua interação e adesão torna-se menor (SADER et al., 2015).

Diversos testes têm sido relatados como alternativas ao teste de referência como o Teste Rápido NP Polimixinas (NORDMANN et al., 2016a), Policimbac® (PROBAC, 2023), Ágar Superpolimixinas (NORDMANN et al., 2016b), eluição da colistina (SIMNER et al., 2018), entre outros.

Neste contexto, este estudo tem como objetivo desenvolver e avaliar uma metodologia alternativa para pesquisa de resistência às polimixinas, denominada de microeluição da polimixina B, permitindo reduzir os custos do teste (método de referência necessita da utilização do pó do antibiótico sulfato de polimixina B), bem como a facilidade na realização, possuindo grande eficácia e confiabilidade, colaborando para o adequado manejo do paciente.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolados bacterianos

Para o presente estudo utilizamos as principais espécies de bacilos Gram-negativos da ordem *Enterobacteriales*, oriundos de um banco de bactérias do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, provenientes de estudos de vigilância, caracterizados quanto a sua identificação e ao perfil de suscetibilidade a alguns antimicrobiano (CAAE: 59567616.6.0000.5327).

Foram utilizados 26 isolados clínicos, dentre os quais, 13 eram da espécie *Klebsiella pneumoniae* (6 sensíveis e 7 resistentes à polimixina B); 1 *Klebsiella oxytoca* (sensível à polimixina B); 1 *Citrobacter freundii* (sensível à polimixina B); 1 *Serratia marcescens* (resistente à polimixina B); 2 *Enterobacter* sp. (resistentes à polimixina B); 7 *Escherichia coli* (3 sensíveis e 4 resistentes à polimixina B); 1 *Klebsiella aerogenes* (resistente à polimixina B). Dentre os isolados citados, 7 possuem gene *mcr-1*.

2.2 Caracterização dos isolados clínicos

Os isolados foram caracterizados quanto a suscetibilidade frente à polimixina B através do método de referência microdiluição em caldo no LABRESIS. A técnica foi executada com meio de cultura Mueller Hinton cátion ajustado, pipetando 50µL de suspensão bacteriana (5×10^5 UFC/mL) e 50µL da polimixina B nas diferentes concentrações testadas em uma placa de poliestireno de 96 poços. Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de ponto de corte do BrCAST, onde CIM $< 2 \mu\text{g}/\text{m}$ foram considerados resistentes à polimixina B.

Quando houve divergência nos resultados entre o método de microdiluição em caldo e a microeluição da polimixina B, confirmamos o valor da CIM através do teste comercial Policimbac®, o qual foi gentilmente cedido pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Este teste é utilizado nas rotinas dos laboratórios da rede da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES-DF).

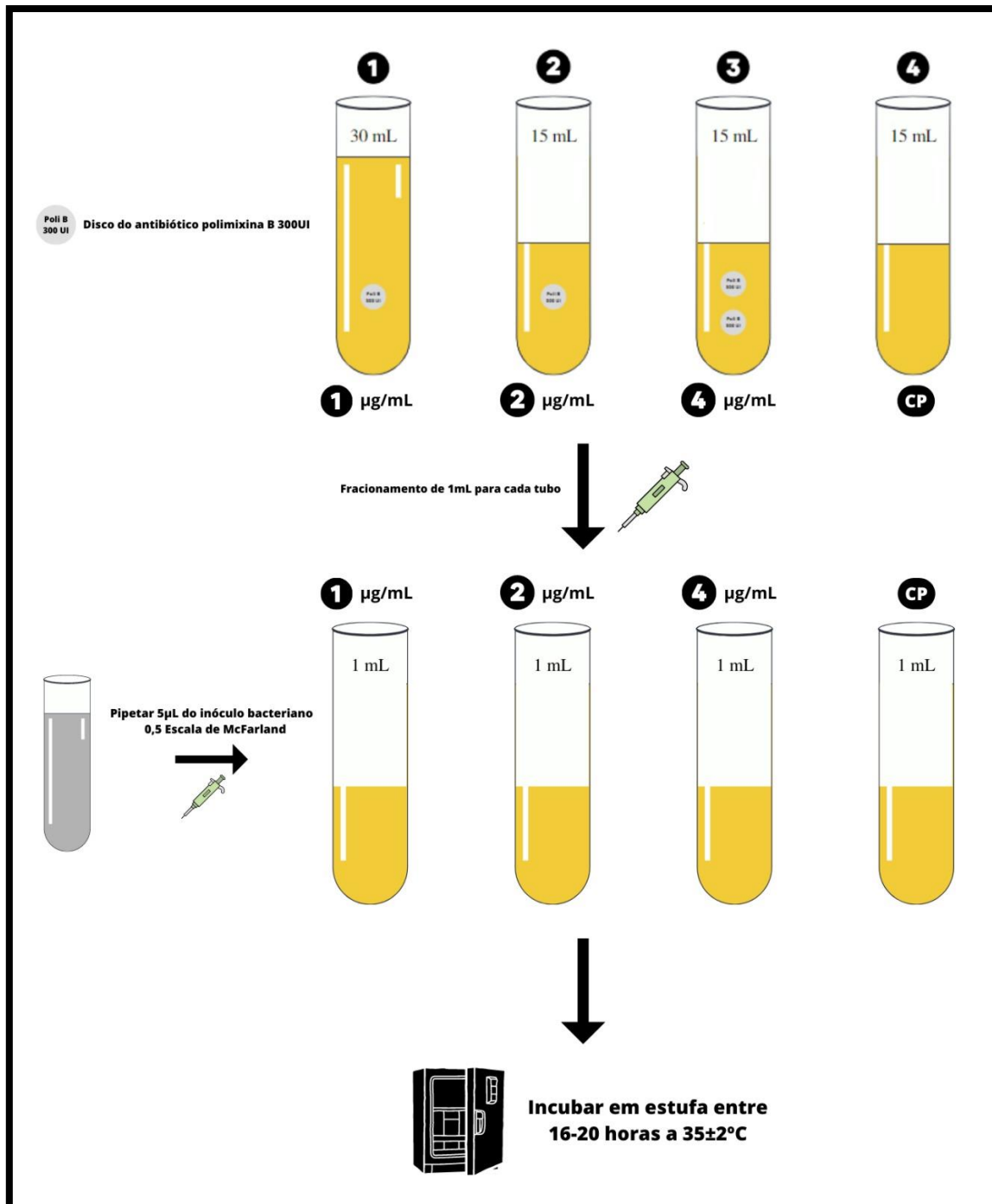
2.3 Teste de microeluição da polimixina B

O teste de eluição original foi criado por Simner e colaboradores (2018). A proposta do nosso grupo foi modificar o teste da eluição, diminuindo o volume empregado no teste e substituindo a colistina pela polimixina B, uma vez que a mesma é utilizada nas instituições de saúde brasileira. Esta modificação recebeu o nome de microeluição da polimixina B.

Para a realização do teste da microeluição da polimixina B foram utilizados discos de antibiótico de polimixina B com concentração de 300 UI. Foram utilizados 4 tubos de vidro. No tubo 1, foi adicionado 30mL de meio de cultura Mueller Hinton (MH) e 1 disco de polimixina B resultando em uma concentração de 1µg/mL. No Tubo 2, foi adicionado 15mL do meio de cultura MH e 1 disco de polimixina B (2µg/mL) e no Tubo 3 foi adicionado 15mL e 2 discos de antibiótico (4µg/mL). No Tubo 4 não foi adicionado nenhum disco, apenas meio de cultura MH, sendo este tubo denominado como tubo de controle positivo (CP). Após a adição dos discos de polimixina B, o antibiótico foi eluído por 60 minutos, e em seguida, visando a otimização do teste, foi fracionado um volume de 1mL para outros 4 tubos de ensaio.

Cinco microlitros (5µL) de uma suspensão bacteriana padronizada (escala 0,5 McFarland) foi adicionada a cada um dos 4 tubos e incubados em estufa aeróbia a 35° ± 2°C por 16 a 20 horas, conforme figura 1.

Figura 1 – Teste da microeluição da polimixina B.



CP: controle positivo

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de ponte de corte do BrCAST, sendo que isolados bacterianos com CIM ≤ 2 µg/mL foram considerados sensíveis e CIM ≥ 4 µg/mL considerados resistentes à polimixina B.

Como forma de validação dos resultados, realizamos a concordância categórica (CC) e a concordância essencial (CE) dos resultados. CC diz respeito à porcentagem de

isolados classificados na mesma categoria (resistente ou sensível) quando comparado o teste novo (microeluição da polimixina B) e o teste de referência (microdiluição em caldo). CE diz respeito à porcentagem de isolados com CIM ± 1 diluição entre o método novo (microeluição da polimixina B) e o método de referência (microdiluição em caldo). Os resultados são considerados aceitáveis quando CC e CE apresentarem $\geq 90\%$ (ISO, 2007).

Além disso, foram avaliados os Erros Maiores (*Major Errors* – ME), o qual é a porcentagem de isolados resistentes pelo novo método e sensíveis pelo método de referência, e Erros Muito Maiores (*Very Major Errors* – VME), o qual é a porcentagem de isolados sensíveis pelo novo método e resistentes pelo método de referência. Os resultados foram considerados aceitáveis quando ME e VME foi $\leq 3\%$ (ISO, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram utilizados 26 isolados bacterianos, sendo 12 isolados sensíveis e 14 resistentes à polimixina B, de acordo com o método de referência microdiluição em caldo. A caracterização dos isolados, bem como os resultados do teste da microeluição da polimixina B encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Teste da Microeluição da polimixina B.

Isolado	Espécie	Material	Meropenem	CIM Polimixina B/ Classificação (método referência)	CIM Polimixina B/ Classificação (microeluição)
1	<i>K. pneumoniae</i>	Urina	R	1/S	≤1/S
2	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	R	8/R	>4/R
3	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	R	16/R	>4/R
4	<i>K. pneumoniae</i>	Biópsia	R	0,5/S	<1/S
5	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	R	0,5/S	<1/S
6	<i>K. oxytoca</i>	Desbridamento de Pé	R	0,5/S	<1/S
7	<i>C. freundii</i>	Urina	R	0,5/S	<1/S
8	<i>K. pneumoniae</i>	Ascite	R	0,25/S	<1/S
9	<i>K. pneumoniae</i>	Abcesso	R	2/S	2/S
10	<i>S. marcescens</i>	Escarro	R	>64/R	>4/R
11	<i>K. pneumoniae</i>	Urina	R	32/R	>4/R
12	<i>K. pneumoniae</i>	Ascite	R	4/R	4/R
13	<i>Enterobacter</i> sp.	Sangue	R	32/R	>4/R
14	<i>E. coli</i>	Abcesso	R	0,5/S	<1/S
15	<i>Enterobacter</i> sp.	Urina	R	8/R	4/R
16	<i>K. aerogenes</i>	Sangue	R	8/R	>4/R
17	<i>E. coli</i> *	Swab retal	R	4/R	4/R
18	<i>E. coli</i> *	Swab retal	ND	0,25/S	<1/S
19	<i>K. pneumoniae</i> *	Swab retal	R	4/R	4/R
20	<i>K. pneumoniae</i> #	ND	R	>64/R	>4/R
21	<i>E. coli</i> *	Swab retal	R	4/R	4/R
22	<i>K. pneumoniae</i> #	ND	R	1/S	<1/S
23	<i>E. coli</i>*	Swab retal	ND	4/R	<1/S
24	<i>E. coli</i>*	Swab retal	ND	8/R	2/S
25	<i>E. coli</i> *	Swab retal	ND	2/S	2/S
26	<i>K. pneumoniae</i> #	ND	R	1/S	≤1/S

R: Resistente. S: Sensível. CIM: Concentração Inibitória Mínima. ND: Não definido.

*Presença do gene *mcr-1*; #Presença da enzima KPC.

Em negrito: resultados discrepantes.

Dentre os resultados, pudemos observar boa similaridade dos valores apresentados pelo método de referência (microdiluição) com o exposto neste trabalho (microeluição). Do número total de isolados, 24 obtiveram a mesma classificação resistente ou sensível para a polimixina B. Isso representa uma concordância categórica

de 92,31% entre as metodologias. Ademais, 24 isolados apresentaram concordância da CIM ± 1 diluição entre os métodos, alcançando uma concordância essencial de 92,31%. Tanto a CC quanto a CE estão dentro dos valores aceitáveis.

A classificação de sensível e resistente, conforme cada metodologia, está apresentada na tabela 2. O Erro maior (ME) não foi encontrado em nosso estudo, enquanto o Erro Muito Maior (VME) foi de 7,7%.

Tabela 2 – Comparação dos resultados em relação ao Erro Maior (ME) e Erro Muito Maior (VME) de ambas as metodologias abordadas.

		Microdiluição em caldo (teste referência)	
		Sensível	Resistente
Microeluição em caldo (teste novo)	Sensível	12	2**
	Resistente	0*	12

*Erro Maior (ME). ** Erro Muito Maior (VME).

Nosso estudo baseou-se no trabalho de Simner e colaboradores (2018), os quais utilizaram a colistina. Os resultados obtidos pelos autores atingiram uma CC e CE de 98% e 99%, respectivamente, as quais são consideradas aceitáveis (SIMNER et al., 2018).

Outro estudo buscou relacionar a eficiência do método de microdiluição em caldo (referência) com a microeluição para colistina. Foram avaliados 270 isolados de *Enterobacterales*, 122 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e 106 isolados de *Acinetobacter* spp. Este estudo representou um total de 94,4% de CE e 97,9% em CA, com valores de VME e ME de 2,5% e 0%, respectivamente, quando observados apenas as enterobactérias (HUMPHRIES et al., 2019).

A título de comparação, uma pesquisa realizada por Kulengowski e colaboradores (2019), utilizou uma outra técnica quantitativa denominada de E-test®, a qual baseia-se na difusão de um agente antimicrobiano em uma tira de plástico para um meio de ágar. No entanto, quando comparado ao método de microdiluição em caldo, percebeu-se que a suscetibilidade à polimixina B foi significativamente maior pelo Etest®, com uma CC de 80%, porém, com apenas 10% de CE. O VME foi de aproximadamente 90%, demonstrando bastante ineficácia da difusão da polimixina B em ágar, podendo resultar no uso inapropriado do antibiótico e dificultando ainda mais o tratamento do paciente (KULENGOWSK et al., 2019).

Já em 2020, Dalmolin e colaboradores realizaram outros testes envolvendo a colistina, sendo eles, microeluição da colistina, microeluição da colistina em placa e tubo único de suscetibilidade à colistina, apresentando excelentes resultados (concordância categórica, concordância essencial, especificidade e sensibilidade) quando equiparados com o teste de referência, porém, com ME e VME menos satisfatórios (DALMOLIN et al., 2020). A fim de triagem, visando o baixo custo e facilidade de reprodutibilidade, os métodos apresentaram-se como boas opções na identificação da resistência à colistina.

Em geral, os isolados analisados no presente trabalho dispuseram de um resultado satisfatório, quando comparados com outros estudos e com o método de referência. Vale destacar que 7 isolados (9, 12, 17, 19, 21, 23 e 25) encontram-se próximos a faixa de *breakpoint* (CIM 2 ou 4) e apenas um deles (23) apresentou resultado discrepante com o método de referência. Esses isolados com CIM próximo ao ponto de corte necessitam de atenção, pois um simples erro na diluição poderia alterar a categoria sensível/resistente.

Os dois únicos isolados (23 e 24) que apresentaram discordância na classificação sensível/resistente possuem o gene *mcr-1*, sendo que um dos isolados possui a CIM também próxima ao *breakpoint* da polimixina B, demonstrando certa fragilidade. Estudos mais aprofundados precisam ser realizados para entender o acontecimento, bem como, adição de mais isolados com o gene *mcr-1* para comparação, sendo esta, uma limitação deste estudo.

Diante disso, a microeluição da polimixina B é uma técnica de baixo custo, que oferece um excelente custo-benefício na detecção da resistência à polimixina B, podendo colaborar no combate da resistência bacteriana e conduzir o melhor tratamento na clínica. Além disso, pode ser facilmente inserida na rotina de laboratórios de pequeno e médio porte, visto que os materiais utilizados são de fácil acesso e manejo, não exigindo técnicas complexas e processos de automação (SIMNER et al., 2019). Ademais, este é o primeiro estudo com microeluição com a polimixina B, sendo que as demais publicações são com colistina. Cabe salientar que este trabalho trata de um estudo piloto para desenvolvimento e avaliação inicial de um novo método. Novos estudos com um número maior de isolados clínicos devem ser realizados, principalmente com bactérias que possuem o gene *mcr-1*, devido a discrepância do resultado obtido em relação ao método de referência.

4. CONCLUSÃO

Levando-se em consideração a importância das polimixinas na medicina humana, buscam-se metodologias padronizadas, rápidas, fáceis e de baixo custo, que visam diminuir a incidência e a resistência a esta classe que, atualmente, é a última opção de escolha para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes. O impacto socioeconômico esperado neste trabalho, é a redução dos custos dos testes utilizados para avaliação da suscetibilidade às polimixinas, uma vez que o teste referência muitas vezes não é realizado pelo seu alto custo e por ser bastante laborioso. Além disso, o presente estudo pretende gerar impactos futuros de médio a longo prazo, contribuindo para o conhecimento e compreensão da epidemiologia local da resistência, frente à polimixina B.

Considerando todos os resultados obtidos e, após feita uma análise comparativa com o método de referência para detecção da suscetibilidade bacteriana, podemos concluir que o método apresentado atingiu resultados satisfatórios. Além disso, a maioria dos testes de suscetibilidade às polimixinas presentes na literatura são referentes à colistina (antibiótico que não é utilizado na prática clínica no Brasil) devendo assim, ser incluído na prática laboratorial como metodologia extremamente relevante na identificação de bactérias multirresistentes, e contribuindo assim, para um maior aprofundamento da pesquisa com a polimixina B, devido ao seu amplo uso em hospitais brasileiros.

5. REFERÊNCIAS

BISWAS S, BRUNEL JM, DUBUS JC et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2012; 10 (8): 917-34.

BUSH K, BRADFORD PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clin Microbiol Rev.** 2020; 33 (2): e00047-19.

DALMOLIN TV, MAZZETI A, ÁVILA H et al. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2020; 96 (1): 114910.

DAVIN-REGLI A, LAVIGNE JP, PAGÈS JM. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clin Microbiol Rev.** 2019; 32 (4): e00002-19.

FRIEDMAN ND, TEMKIN E, CARMELI Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clin Microbiol Infect.** 2016; 22 (5): 416-22.

GETAHUN H, SMITH I, TRIVEDI K et al. Combatendo a resistência antimicrobiana na pandemia de COVID-19. **Bull World Health Organ.** 2020; 98 (7): 442-442A.

GUIMARÃES DO, MOMESSO LS, PUPO MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím Nova.** 2010; 33 (3): 667-679.

HUMPHRIES RM, GREEN DA, SCHUETZ NA et al. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk. **J Clin Microbiol.** 2019; 57 (11): e01269-19.

International Standard Organization (ISO). Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 2: evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. International Standard ISO 20776-2:2007, Geneva: ISO, 2007.

KARVANEN MC, MOHAMAD A, LAGERBACK P. Colistin is extensively lost during normal experimental conditions. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017; 61 (11): e00857-17.

KOBS VC, VALDEZ RE, MEDEIROS F et al. *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae isolated from companion animals in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 2020; 40 (9):690-695.

KULENGOWSKI B, RIBES JA, BURGESS DS. Polymyxin B Etest® compared with gold-standard broth microdilution in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae exhibiting a wide range of polymyxin B MICs. **Clin Microbiol Infect.** 2019; 25 (1): 92–95.

LIU YY, WANG Y, WALSH TR et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis.** 2015; 16: 161-68.

LO-TEM-FOE JR, SMET AMGA, DIEDEREN BMW et al. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrob Agents Chemother**. 2007; 51 (10): 3726-30.

MAHONEY AR, SAFAEE MM, WUEST WM et al. The silent pandemic: emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. 2021; **iScience** 24 (4): 102304102304.

MURRAY CJ, IKUTA KS, SHARARA F et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**. 2022; 399: 629-55.

NORDMANN P, JAYOL A, POIREL L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. **J Clin Microbiol**. 2016b; 54 (5): 1395-9.

NORDMANN P, JAYOL A, POIREL L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**. 2016a; 22 (6): 1038-1043.

O'NEILL J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. **Rev Antimicrob Res**. 2014.

POIREL L, JAYOL A, NORDMANN P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clin Microbiol Rev**. 2017; 30 (2): 557-596.

PROBAC DO BRASIL. Policimbac. Disponível em: <<http://probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/POLICIMBAC%20Rev%2004.pdf>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2023.

SADER HS, RHOMBERG PR, FARREL DJ et al. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2015; 83 (4): 379-81.

SIMNER, PJ, BERGMAN Y, TREJO M et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. **J Clin Microbiol**. 2019; 57 (2): 1-7.

TERRENI M, TACCANI M, PREGNOLATO M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. **Molecules**. 2021; 26 (9): 2671.

UCHIL RR, KOHLI GS, KATEKHAYE VM et al. Strategies to combat antimicrobial resistance. **J Clin Diagn Res**. 2014; 8 (7): ME01-4.

VENTOLA CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**. 2015; 40 (4): 277-83.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022. Global report. Acesso em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>.

YE H, LI H, LI Z et al. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. **mBio**. 2016; 7 (2): e00177-16.

ZAVASCKI AP, GOLDANI LZ, LI J et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother**. 2007; 60 (6): 1206-15.