



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA

*AGAR SPOT E DROP TEST NA DETECÇÃO DA SENSIBILIDADE À
POLIMIXINA B EM *Enterobacterales**

Brasília-DF

2023

ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA

*AGAR SPOT E DROP TEST NA DETECÇÃO DA SENSIBILIDADE À
POLIMIXINA B EM *Enterobacteriales**

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

Coorientadora: Rebeca Siqueira Rubens

Brasília-DF

2023

ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA

*AGAR SPOT E DROP TEST NA DETECÇÃO DA SENSIBILIDADE À
POLIMIXINA B EM *Enterobacteriales**

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.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Tanise Vendruscolo Dalmolin (UnB) - Presidente

Dr^o Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior (LACEN-DF)

RESUMO

As polimixinas são consideradas como terapias de última linha no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. No entanto, o frequente uso de polimixinas nos últimos tempos ocasionou aumento na disseminação da resistência bacteriana a essa classe de antimicrobianos. Dessa forma, viu-se a necessidade e a urgência no desenvolvimento de métodos confiáveis, fáceis, rápidos e eficazes para a detecção de bactérias resistentes. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar as metodologias *Agar Spot* e *Drop Test* na detecção da sensibilidade à polimixina B, comparando com o método de referência. Foram utilizados 36 isolados bacterianos, dos quais 19 isolados são sensíveis à polimixina B e 17 são resistentes. Para *Agar Spot*, os resultados apresentaram CA, EA, sensibilidade e especificidade de 100%, não sendo encontrados VME e ME. Já para *Drop Test* os resultados apresentaram valores de CA de 97,22%, EA de 86,11%, sensibilidade de 100% e especificidade de 97,7%. Nesse caso, foi detectado apenas um ME (2,78%) e não foram encontrados VME. Levando em consideração os resultados apresentados, concluiu-se que tanto o *Agar Spot* quanto o *Drop Test* poderiam ser incluídos na rotina dos laboratórios na detecção da sensibilidade à polimixina B.

Palavras-chaves: Resistência bacteriana; Polimixina B; Bactérias multirresistentes; metodologias alternativas; *Agar Spot*; *Drop Test*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
METODOLOGIA	9
Isolados bacterianos	9
<i>Agar Spot</i>	9
<i>Drop Test</i>	11
Análise dos resultados	12
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
APÊNDICE	22

INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos emergiu como uma grande ameaça à saúde humana do século XXI, sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo (LANCET et al., 2022; MURRAY et al., 2022). Diante disso, o número de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes têm se tornado cada vez mais frequentes (LEE et al., 2022; OLAITAN et al., 2014; SILVA et al., 2022). Os carbapenêmicos são os antibióticos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos. Porém, com o aumento da sua utilização na prática clínica ocorreu a disseminação de resistência à essa classe de antibióticos (GARG et al., 2017).

Atualmente, novas terapias estão sendo aprovadas como forma de tratamento das infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos, como ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam. Porém, essas combinações não estão disponíveis em muitas partes do mundo, bem como não são abrangentes contra todos os mecanismos de resistência, como por exemplo as metalo-betalactamases (CRUZ-LÓPEZ et al., 2022; SOMAN et al., 2021). Diante desse cenário, as polimixinas são consideradas como terapias de última linha no tratamento de infecções causadas, principalmente, por bactérias multirresistentes (SOMAN et al., 2021).

As polimixinas são antibióticos eficazes contra as bactérias Gram-negativas da ordem *Enterobacterales*, dentre elas *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Além dessas, também apresentam ação contra algumas bactérias Gram-negativas não-fermentadoras, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* (LEE et al., 2022; POIREL et al., 2017). No entanto, as polimixinas foram deixadas de lado na década de 1970 devido aos seus efeitos adversos, principalmente a nefrotoxicidade. Mesmo conhecendo seus efeitos nefrotóxicos, a partir da década de 90 as polimixinas foram reintroduzidas na prática clínica devido à urgente necessidade em tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes. (LEE et al., 2022; POIREL et al., 2017; SILVA et al., 2022; TRAN et al., 2016).

A polimixina E (colistina) e a polimixina B são análogos estruturais que diferem apenas por um aminoácido em seu anel peptídico. Na colistina, esse aminoácido é a leucina, enquanto na polimixina B é a fenilalanina. Além disso, a polimixina B é administrada como um antibiótico ativo, enquanto a colistina é administrada como um pró-fármaco inativo, na forma de metanossulfonato de colistina (POIREL et al., 2017; TRAN et al., 2016).

As polimixinas apresentam um mecanismo de ação em que o alvo principal é o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas. As polimixinas ligam-se de forma seletiva ao lipídeo A do LPS, interagindo com o grupo fosfato e substituindo os íons cálcio e magnésio, ocasionando a ruptura da membrana e posteriormente a sua morte celular (POIREL et al., 2017; SILVA et al., 2022).

A resistência às polimixinas ocorre através de modificações no grupo fosfato do lipídeo A, através da adição de fosfoetanolamina (PEtN) ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N), impedindo assim que as polimixinas se liguem a membrana externa da bactéria (NORDMANN et al., 2016; OLAITAN et al., 2014; SILVA et al., 2022; XU et al., 2022). Essas modificações são codificadas por cromossomos e ocorrem devido a mutações no sistema de dois componentes (PmrAB e PhoPQ) e mutações do regulador negativo de PhoPQ e no gene *mgrB* (LARROY-MAUMUS et al., 2023; NORDMANN et al., 2016). Além disso, estudos relataram a presença de genes de resistência mediados por plasmídeos, como o gene *mcr-I*, que codifica uma enzima da família das fosfoetanolaminas transferases, adicionando PEtN ao LPS (LIU et al., 2016; SILVA et al., 2022). Ademais, há espécies bacterianas que são naturalmente resistentes às polimixinas, como por exemplo cepas de *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* e *Vibrio cholerae* (OLAITAN et al., 2014; POIREL et al., 2017). Apesar de muitos estudos explicarem os mecanismos de resistência às polimixinas, ainda há mecanismos a serem elucidados (OLAITAN et al., 2014).

Atualmente, o método de microdiluição em caldo é considerado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) como método de referência para a determinação da sensibilidade bacteriana às polimixinas (SHINOHARA et al., 2022; FOLDES et al., 2022). No entanto, apesar de ser considerado o padrão-ouro, esse método pode ser trabalhoso, exige preparo manual e atenção minuciosa, é demorado (~24h), com um custo alto, principalmente por se tratar de uma técnica que exige o uso do pó de polimixina. Além de poder apresentar erros de interpretação, sendo inviável para algumas rotinas laboratoriais (FOLDES et al., 2022; LLORENTE et al., 2022; NORDMANN et al., 2016; POIREL et al., 2017; SHINOHARA et al., 2022).

Outros métodos, como disco-difusão e fita gradiente, não são recomendados para determinar a sensibilidade às polimixinas devido à baixa difusão do antibiótico no ágar, ocasionando uma alta taxa de falsa sensibilidade. Além disso, métodos automatizados não são recomendados, devido a possíveis resultados apresentando heterorresistência, sendo esses resultados não interpretáveis pelo equipamento (NORDMANN et al., 2016; POIREL et al., 2017).

A fim de atender a necessidade de detecção rápida e prática de micro-organismos causadores de infecções, diversos métodos têm sido desenvolvidos no meio científico (LEE et al., 2022; POIREL et al., 2017). O *Agar Spot* e o *Drop Test* são métodos alternativos à microdiluição em caldo e estão sendo amplamente estudados e aprimorados para que possam ser incorporados na rotina de laboratórios clínicos.

O *Agar Spot* é um método que se baseia na diluição das polimixinas no meio de cultura ágar Mueller-Hinton (MH), posteriormente inoculada com a cepa bacteriana. Essa diluição é realizada utilizando concentrações que seguem os critérios dos pontos de corte interpretativos (PASTERAN et al., 2020). Em contrapartida, o *Drop Test* é um método que se baseia na deposição de gotas de diferentes concentrações de polimixinas em placa de ágar MH, previamente inoculada com a cepa bacteriana de interesse. Com isso, é possível determinar a sensibilidade ou resistência da bactéria através da presença do halo de inibição (SHINOHARA et al., 2022).

Tendo em vista esses fatos, o presente estudo tem por objetivo avaliar o desempenho dos métodos *Agar Spot* e *Drop Test* na detecção de resistência à polimixina em bactérias Gram-negativas.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados para este estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), situado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. Esses isolados são oriundos de uma coleção de amostras de bacilos Gram-negativos, provenientes de estudos de vigilância. Os isolados foram caracterizados quanto a sua identificação, perfil de sensibilidade à polimixina B e presença do gene *mcr-1* e carbapenemases no laboratório de origem.

Foram testados 36 isolados bacterianos, dentre eles 23 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 1 cepa de *Citrobacter freundii*, 1 *Enterobacter* spp., 8 *E. coli*; 2 cepas de *Klebsiella oxytoca* e 1 cepa de *S. marcescens*. Dentre essas amostras, 19 isolados eram considerados sensíveis e 17 isolados considerados resistentes à polimixina B, de acordo com o método referência (microdiluição em caldo). Além disso, 6 espécies apresentavam o gene *mcr-1* (5 *E.coli* e 1 *K. pneumoniae*) e 5 *bla*_{KPC} (4 *K. pneumoniae* e 1 *E. coli*).

Agar Spot

O teste de *Agar Spot* foi baseado no estudo de Pasteran e colaboradores (2020), com algumas modificações. No estudo de Pasteran foram utilizadas placas com apenas 2 concentrações (2µg/mL e 3µg/mL). Em nosso estudo foram utilizadas 4 concentrações, além da utilização da polimixina B, ao invés de colistina. O teste está sintetizado na Figura 1.

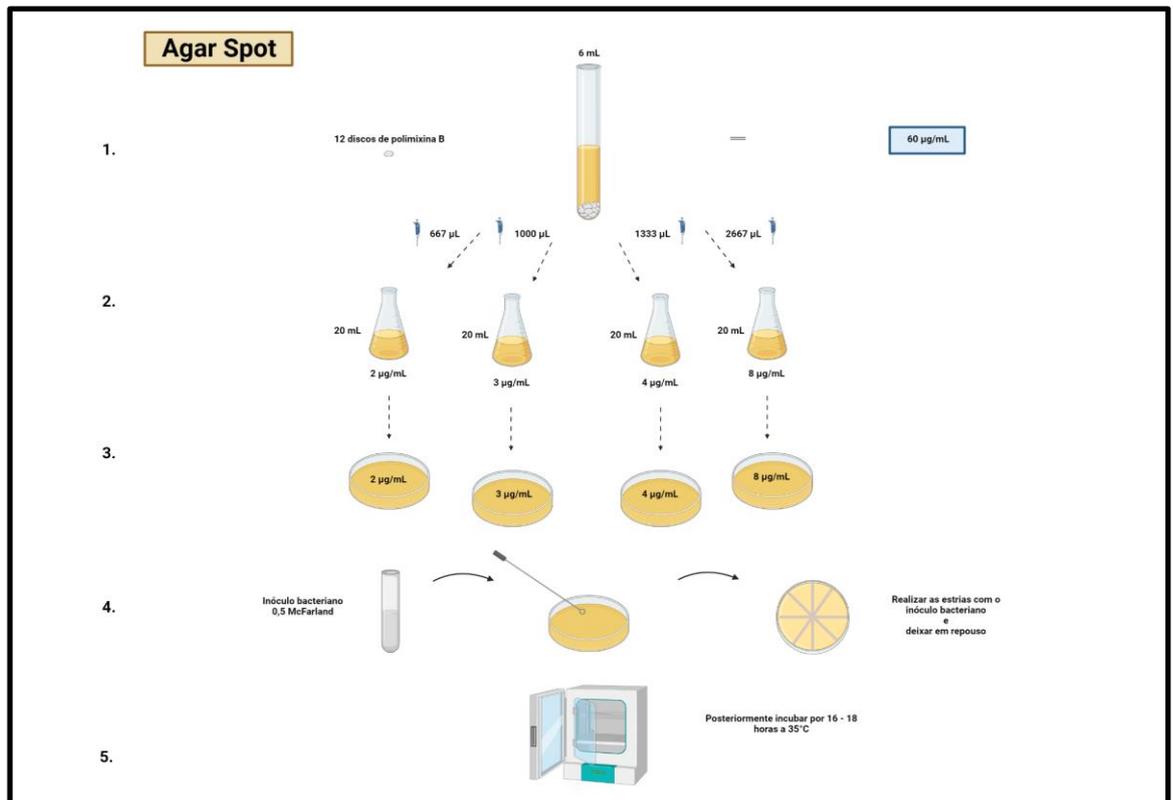


Figura 1. *Agar Spot* para polimixina B. Criado com BioRender.com.

Em um volume de 6 mL de CAMH foram adicionados 12 discos de polimixina B (300UI = 30µg) resultando em uma solução-mãe de 60µg/ml. A partir dessa solução-mãe foram realizadas as placas de ágar (MH) contendo 2µg/mL de polimixina B (667µL solução-mãe + 20mL ágar MH), 3µg/mL (1000µL solução-mãe + 20mL ágar MH), 4µg/mL (1333µL solução-mãe + 20mL ágar MH) e 8µg/ml (2667µL solução-mãe + 20mL ágar MH). O ágar MH foi previamente fundido e após sua temperatura estar morna (mão embaixo do Erlenmeyer para verificar se a temperatura não estava muito quente) foi adicionado a solução de antibiótico.

As cepas bacterianas de interesse foram ajustadas para escala padrão de 0,5 McFarland e foram inoculadas nas placas com polimixina B através de estrias de aproximadamente 20mm. Em uma única placa de Petri de 90mm foi possível testar 8 cepas diferentes. As placas já inoculadas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente durante 15 minutos e incubadas a 35°C por um período entre 16 -18 horas.

Após transcorrido o tempo de incubação, foram observadas o crescimento (no mínimo 1 colônia) nas diferentes concentrações da polimixina B. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano e o ponto de corte foi baseado no estabelecido pelo BrCAST, onde $CIM \geq 4\mu\text{g/mL}$ é considerada resistente à polimixina B e $CIM \leq 2\mu\text{g/mL}$ é considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2023).

Drop Test

O *Drop Test* foi baseado no artigo publicado por Shinohara e colaboradores (2022) com algumas modificações. No estudo de Shinohara foram testadas duas concentrações (12 μ g/mL e 16 μ g/mL). Em nosso estudo testamos 4 concentrações, além da substituição da colistina pela polimixina B (Figura 2).

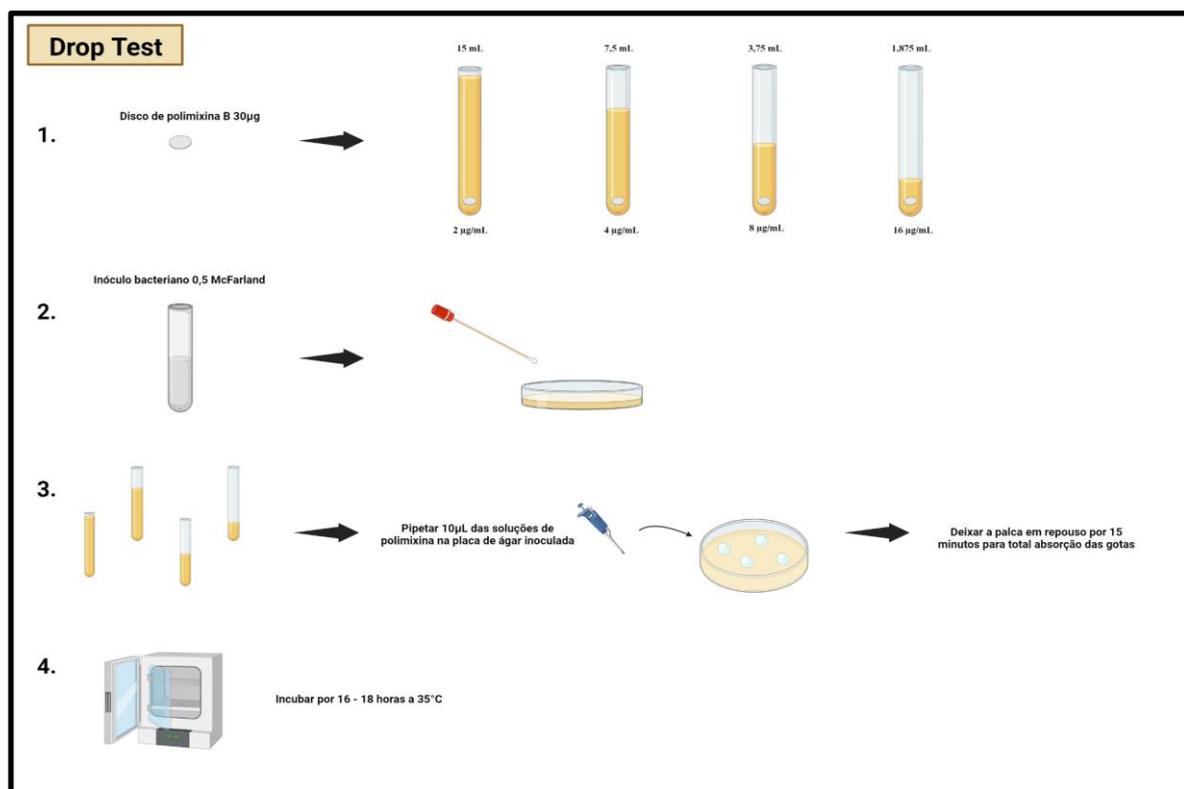


Figura 2. *Drop Test* para polimixina B. Criado com BioRender.com.

Foram preparadas soluções de polimixina B em 4 concentrações diferentes, sendo elas: 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL e 16 μ g/mL. Essas soluções foram preparadas a partir de discos de polimixina B (300UI = 30 μ g) em volumes de Caldo Mueller-Hinton Cation Ajustado (CAMH) em tubos estéreis de vidro para evitar a adsorção da polimixina B. Para a concentração de 2 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B (30 μ g) em um volume de 15mL de CAMH; para 4 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B em 7,5mL de CAMH; para 8 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B em 3,75mL de CAMH e para 16 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B em 1,875mL de CAMH. Os 4 tubos foram deixados em repouso por 1 hora em temperatura ambiente para eluição do antibiótico. Os inóculos das cepas testadas foram padronizados para 0,5 da escala de McFarland e repicados por espalhamento com swab estéril

em uma placa de ágar MH. Após, foram depositados 10µl (gota) de cada concentração da polimixina B (2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL) na placa de ágar inoculado e deixado por 15 minutos em repouso, em temperatura ambiente, para permitir a total absorção da gota (PASTERAN et al., 2020; SHINOHARA et al., 2022). As placas foram incubadas a 35 °C por 16 -18 horas. As gotas foram feitas a uma distância mínima de 2cm uma da outra, para que não houvesse contaminação ou interferência.

Após transcorrido o período de incubação, foram observadas as zonas de inibição (halos) nas gotas das diferentes concentrações da polimixina B. A CIM é definida como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano e o ponto de corte foi baseado no estabelecido pelo BrCAST, onde $CIM \geq 4\mu\text{g/mL}$ é considerada resistente à polimixina B e $CIM \leq 2\mu\text{g/mL}$ é considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2023).

Análise dos resultados

O método de microdiluição em caldo foi utilizado como referência para comparação com os resultados obtidos nas outras metodologias. As novas metodologias foram analisadas quanto à sensibilidade, especificidade, concordância categórica (*Categorical Agreement* - CA), concordância essencial (*Essential Agreement* - EA), Erro Maior (*Major Error* - ME) e Erro Muito Maior (*Very Major Error* - VME).

A sensibilidade dos métodos foi calculada conforme a fórmula:

$$S: VP/VP + FN$$

onde, VP (verdadeiro positivo) são os isolados classificados como resistentes pelo método de referência e pelo método novo; e FN (falso negativo) são os isolados classificados como resistentes pelo método de referência, porém apresentam resultados sensíveis pelo método novo (ISO, 2007).

A especificidade dos métodos foi calculada conforme a fórmula:

$$E: VN/VN + FP$$

onde, VN (verdadeiro negativo) são os isolados classificados como sensíveis pelo método de referência e pelo método novo; e FP (falso positivo) são os isolados classificados como sensíveis pelo método de referência, porém apresentam resultados resistentes pelo método novo (ISO, 2007).

CA é a porcentagem de isolados classificados com o mesmo resultado (resistente ou sensível) quando comparado ao método novo (*Agar Spot* ou *Drop Test*). Seu resultado é considerado aceitável quando apresentar valor $\geq 90\%$. EA é a porcentagem de isolados com

CIM +/- 1 diluição entre o método de referência (microdiluição em caldo) e o método novo (*Agar Spot* ou *Drop Test*). Seu resultado é considerado aceitável quando apresentar valor $\geq 90\%$ (ISO, 2007).

ME é a porcentagem de isolados com resultados resistentes, de acordo com a metodologia nova, mas que deveriam apresentar resultados sensíveis, de acordo com a metodologia de referência. VME é a porcentagem de isolados resistentes à polimixina no teste de referência e na metodologia nova o isolado foi caracterizado como sensível. ME e VME são considerados aceitáveis quando apresentarem valores $\leq 3\%$ (ISO, 2007).

RESULTADOS

Para *Agar Spot*, 17 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 10 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens*, 1 *Enterobacter* spp. e 5 *E. coli*. Dezenove isolados demonstraram ser sensíveis à polimixina B: 13 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii* e 3 *E. coli*. Os resultados obtidos no *Agar Spot* demonstraram uma boa concordância com o teste de referência, como está demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação dos resultados da metodologia de referência com os resultados encontrados no *Agar Spot*.

		Microdiluição em caldo			
Agar Spot		≤2µg/mL Sensível	4µg/mL Resistente	8µg/mL Resistente	≥16µg/mL Resistente
	≤2µg/mL Sensível	19			
	3µg/mL Sensível				
	4µg/mL Resistente			1	
	8µg/mL Resistente		1	4	1
	≥16µg/mL Resistente			2	8

Azul: Valor de CIM para microdiluição em caldo é exatamente o mesmo para *Agar Spot*.

O *Agar Spot* apresentou sensibilidade e especificidade de 100%. A CA e EA foi de 100%, sem ME e VME.

Para *Drop Test*, 18 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 11 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens*, 1 *Enterobacter* spp. e 5 *E. coli*. Dezoito isolados foram considerados sensíveis, sendo eles 12 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 3 *E. coli* e 1 *C. freundii*. Os resultados encontrados no *Drop Test*, bem como a sua comparação com a microdiluição, estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação dos resultados da metodologia de referência com os resultados encontrados no *Drop Test*.

Microdiluição em caldo						
Drop Test		≤2µg/mL Sensível	4µg/mL Resistente	8µg/mL Resistente	16µg/mL Resistente	≥32µg/mL Resistente
	≤2µg/mL Sensível	18				
	4µg/mL Resistente	1*				
	8µg/mL Resistente			3		
	16µg/mL Resistente			1	2	1
	≥32µg/mL Resistente		1	3	1	5

Azul: Valor de CIM para microdiluição em caldo é exatamente o mesmo para *Drop Test*. *ME: Erro Maior.

Foi possível observar sensibilidade de 100% e especificidade de 97,7%. CA de 97,22% e EA de 86,11%. Foram observados 5 resultados diferentes do esperado que ocasionaram na alteração do EA, sendo eles: uma cepa de *K. pneumoniae*, que apresentou CIM 4µg/mL pelo *Drop Test* e 2µg/mL pelo teste de referência; uma cepa de *E. coli* que deveria apresentar CIM 4µg/mL pela microdiluição em caldo e apresentou CIM ≥32µg/mL; duas cepas de *E. coli* que deveriam apresentar CIM 8µg/mL e apresentaram ≥32µg/mL pelo método de referência; e 1 cepa de *Enterobacter* spp. que deveria ter CIM 8µg/mL e apresentou MIC ≥32µg/mL pelo método de referência. Dessa forma, houve um ME: uma *K. pneumoniae* sensível à polimixina B pela microdiluição em caldo apresentou resistência no *Drop Test*. Sendo assim, foram encontrados valores de ME de 2,78% para *Drop Test*, sendo valores aceitáveis e dentro do percentual ideal, visto que resultados maiores que 3% são considerados inaceitáveis (ISO, 2007; PASTERAN et al., 2020). Não foram encontrados Erros Muito Maiores (VME).

DISCUSSÃO

Devido ao surgimento de bactérias multirresistentes a antibióticos de primeira linha, houve um consequente aumento do uso de polimixinas como opção de tratamento (OLAITAN et al., 2014; SILVA et al., 2022) e, conseqüentemente, um aumento na resistência bacteriana. Diante desse cenário, há uma demanda crescente por métodos que possam oferecer detecção rápida e prática da sensibilidade de cepas às polimixinas (LEE et al., 2022; POIREL et al., 2017).

Em nosso estudo avaliamos o desempenho do *Agar Spot* e do *Drop Test*. De acordo com os resultados encontrados, foram demonstrados valores de sensibilidade, especificidade, CA e EA de 100%, bem como VME e ME de 0% para *Agar Spot*. Já para o *Drop Test* foram encontrados valores de sensibilidade de 100% e especificidade de 97,77%, CA de 97,22%, EA de 86,11%, ME de 2,78% e VME de 0%.

Perez e colaboradores (2021) avaliaram o *Drop Test* para detecção de resistência à polimixina B em bastonetes Gram-negativos não-fermentadores (n: 87) e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (n: 628). O teste foi desenvolvido utilizando as concentrações que variam de 0,25 a 8,0µg/mL, sendo a concentração de 4,0µg/mL a que apresentou melhores resultados, classificada com a melhor precisão pelo estudo (95,1%). Os resultados do estudo revelaram uma CA de 95,5% para *Enterobacterales*, mais especificamente para *K. pneumoniae* e nenhum VME foi encontrado. Diante disso, *Drop Test* é um teste fácil e viável, além de apresentar baixo custo (PEREZ et al., 2021). Em nosso estudo os resultados foram bem similares, comprovando o desempenho do método.

Outro estudo que analisou o *Drop Test* foi o de Llorente e colaboradores (2022), o qual teve como objetivo avaliar a sensibilidade à colistina em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O estudo encontrou CA de 100% para *Enterobacterales* e 99,2% para *P. aeruginosa*. Não foram encontrados ME ou VME (LLORENTE et al., 2022). Em comparação com o nosso estudo, é possível observar certa similaridade entre os resultados no que tange o valor de CA. Vale ressaltar que nosso estudo foi realizado com polimixina B, enquanto o estudo de Llorente et al. foi com colistina. Além disso, em nosso estudo não foram testados isolados de *P. aeruginosa*, não sendo possível realizar a comparação desse valor.

Pasteran e colaboradores realizaram um estudo em 2020 onde avaliaram a resistência cromossomal e plasmidial à colistina em bacilos Gram-negativos através do *Drop Test*. Foram avaliadas 271 isolados clínicos e relataram que a solução de colistina de 16µg/mL apresentou

um melhor desempenho nos testes preliminares. Como resultado, foi observado 100% de CA para *Acinetobacter* spp., 97,9% para *Enterobacterales* e 97,4% para *P. aeruginosa*. O estudo também avaliou o desempenho do *Agar Spot* com diluição da colistina limitada às concentrações que abrangem os pontos de corte interpretativos, ou seja, concentrações de 2µg/mL e 3µg/mL. Neste contexto, foi possível separar as populações sensíveis com CIM ≤ 2µg/mL das cepas resistentes com CIM > 2,0µg/mL. Os resultados para *Agar Spot* demonstraram que a CA melhorou em até 95,4% quando utilizada a concentração de 3µg/mL de colistina. O estudo apresentou CA de 100% para *P. aeruginosa*, 94,6% para *Acinetobacter* spp., e 97,9% a 98,5% para *Enterobacterales* (PASTERAN et al., 2020). Em nosso estudo foram utilizadas concentrações de 2µg/mL, 3µg/mL, 4µg/mL e 8µg/mL. Não foram detectadas diferenças quanto à mudança de concentração de 2µg/mL para 3µg/mL.

Para identificação fenotípica do gene *mcr* em *Enterobacterales* baseado na inibição da atividade do gene através de EDTA, utilizando a metodologia do *Agar Spot*, foram testados 92 isolados e foram encontrados 100% de sensibilidade e especificidade. Foram testadas 3 placas: (i) uma contendo ágar MH com 3µg/ml de colistina; (ii) uma placa ágar com 3µg/ml de colistina e EDTA (1mM) e (iii) uma placa contendo MH com EDTA (1 mM) como controle de crescimento e descartando possível efeito inibitório do EDTA. Com isso, foi possível demonstrar eficiência no método em diferenciar espécies de *Enterobacterales* produtoras de MCR resistentes à colistina de espécies resistentes por mecanismos cromossômicos (ESCALANTE et al., 2020).

No nosso estudo, foram testados 6 isolados com o gene *mcr-1*, sendo 1 de *K. pneumoniae* e 5 de *E. coli*. Não foram observadas alterações de resultados devido a presença do gene. Vale ressaltar que foram testados um baixo número de cepas com o gene *mcr-1*, sendo necessário o desenvolvimento de estudos com mais cepas para que seja possível realizar essa análise de forma mais completa, bem como não foram realizados testes com EDTA.

Raro e colaboradores (2021) realizaram um estudo avaliando *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos utilizando metodologias baseadas na diluição em ágar (MH contendo 0,25–64µg/mL de polimixina B) e *Agar* de Triagem (MH com 3µg/mL de polimixina B). Diante dos resultados, encontraram uma sensibilidade de 86,2% e especificidade de 98,7% para o teste de triagem e CA de 86,2% e EA de 97,5% para a diluição em ágar. O ME foi de 0,73% para triagem e 1,5% para diluição em ágar. O VME foi de 5,8% para ambas as técnicas, sendo este um valor fora do padrão considerado aceitável de ≤3%. Dessa forma, concluíram que o desempenho do estudo de um modo geral foi bom, apesar da presença de uma alta taxa

de VME. No entanto, afirmam que essas metodologias baseadas em ágar são uma boa alternativa para a microdiluição em caldo (RARO et al., 2021).

Diante disso, pode-se dizer que as metodologias utilizadas em nosso estudo demonstraram uma excelente sensibilidade e especificidade, CA e EA. Quando comparamos nossos resultados com os resultados de outros estudos podemos observar que os valores encontrados foram muito similares, o que demonstra mais uma vez que o *Agar Spot* e o *Drop Test* são métodos eficazes, práticos e rápidos de realizar e que podem ser implementados na rotina dos laboratórios clínicos para detecção de resistência bacteriana à polimixina B, principalmente o *Agar Spot*.

Vale ressaltar que foram demonstrados em outros estudos uma certa dificuldade na análise da sensibilidade em *Enterobacter* spp., sendo esta espécie considerada uma influência negativa na sensibilidade e especificidade nos estudos, devido a presença de heterorresistência (RARO et al., 2021). No nosso estudo, foram utilizadas apenas 2 isolados de *Enterobacter* sp., e não foi observado valores divergentes aos valores de referência da microdiluição em caldo. No entanto, pode ser necessário a realização de mais estudos para verificar e comprovar esse fato.

Devido aos resultados positivos encontrados, pode-se afirmar que houve uma boa eluição da polimixina B a partir do disco, tornando assim esses métodos mais baratos, pois não há a necessidade da aquisição do pó de polimixina B. Além disso, a utilização de discos de antibióticos ao invés da preparação da solução de antibióticos oriundas dos pós torna as técnicas de fácil manipulação dentro dos laboratórios clínicos.

Resultados negativos foram encontrados em outros estudos com uma taxa de VME >3%, quando utilizada a eluição do disco (PASTERAN et al., 2020; RARO et al., 2021).

Futuros estudos com maior número de isolados e espécies, principalmente bacilos Gram-negativos não-fermentadores e *Enterobacter* spp., bem como maior número de isolados com *mcr-1* se faz necessária.

CONCLUSÃO

Com o aumento do uso das polimixinas no tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes fica evidenciada a importância da pesquisa e utilização de métodos rápidos, eficazes, precisos e de alta sensibilidade na prática clínica para detecção de cepas resistentes à polimixina B.

Diante dos resultados obtidos nesse estudo e da análise comparativa com o método de referência, é possível afirmar que os testes *Agar Spot* e *Drop Test* apresentaram resultados muito satisfatórios, em especial *Agar Spot*. Altas taxas de sensibilidade, especificidade, CA e EA foram encontradas no estudo, bem como baixos valores para VME e ME. Sendo assim, conclui-se que os testes utilizados neste estudo são fortes candidatos à inclusão na rotina dos laboratórios de análises clínicas para a detecção de cepas bacterianas resistentes à polimixina B, contribuindo para uma terapia mais adequada e obtendo melhores resultados.

REFERÊNCIAS

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), 2023. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>.

CRUZ-LÓPEZ, Flora et al. Efficacy and in vitro activity of novel antibiotics for infections with carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 884365, 2022.

ESCALANTE, Edgar Gonzales et al. Phenotypic detection of plasmid-mediated colistin resistance In *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 3, p. e01555-19, 2020.

FÓLDES, Annamária et al. Comparison of Six Phenotypic Assays with Reference Methods for Assessing Colistin Resistance in Clinical Isolates of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriales*: Challenges and Opportunities. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 377, 2022.

GARG, Suneel Kumar et al. Resurgence of polymyxin B for MDR/XDR Gram-negative infections: an overview of current evidence. **Critical care research and practice**, v. 2017, p. 3635609, 2017.

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

LANCET, The. Antimicrobial resistance: time to repurpose the Global Fund. **Lancet (London, England)**, v. 399, n. 10322, p. 335, 2022.

LARROUY-MAUMUS, Gerald et al. Two-site study on performances of a commercially available MALDI-TOF MS-based assay for the detection of colistin resistance in *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 6, p. 669-679, 2023.

LEE, Yu-Lin et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriales* infections: Recent advances in diagnosis and treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 2, p. 106528, 2022.

LIU, Yi-Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LLORENTE, Laura Iglesias et al. Evaluating the drop test method in measuring colistin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 001628, 2022.

- MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.
- NORDMANN, Patrice; JAYOL, Aurélie; POIREL, Laurent. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, 2016.
- OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.
- PASTERAN, Fernando et al. Simple phenotypic tests to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 10.1128/jcm. 01701-20, 2020.
- PEREZ, Leandro Reus Rodrigues et al. Evaluation of a polymyxin drop test for polymyxin resistance detection among non-fermentative gram-negative rods and *Enterobacterales* resistant to carbapenems. **Apmis**, v. 129, n. 3, p. 138-142, 2021.
- POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.
- RARO, O. H. F. et al. Performance of polymyxin B agar-based tests among carbapenem-resistant *Enterobacterales*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 767-773, 2021.
- SILVA, Kesia Esther da et al. Overview of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. e0349-2021, 2022.
- SHINOHARA, Danielle Rosani et al. Evaluation of phenotypic methods for detection of polymyxin B-resistant bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 199, p. 106531, 2022.
- SOMAN, Rajeev et al. Is it time to move away from polymyxins?: evidence and alternatives. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, p. 461-475, 2021.
- TRAN, Thien B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 592-597, 2016.
- XU, Xiaohong et al. Risk Factors and Molecular Mechanism of Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Hospital in Fujian, China. **Infection and Drug Resistance**, p. 7485-7494, 2022.

APÊNDICE

Apêndice 1. Resultados da microdiluição em caldo, *Agar Spot* e *Drop Test* da Polimixina B.

Isolado	Espécie	Microdiluição em Caldo/ Classificação	Agar Spot/ Classificação	Drop Test/ Classificação	Gene de resistência
10P	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	8/R	8/R	
12P	<i>K. pneumoniae</i>	16/R	≥16/R	16/R	
14P	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	
26P	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	
27P	<i>K. oxytoca</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
28P	<i>C. freundii</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	
39P	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
48P	<i>K. pneumoniae</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	
54P	<i>S. marcescens</i>	> 64/R	≥16/R	≥32/R	
80P	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	≥16/R	16/R	
90P	<i>E. coli</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
92P	<i>Enterobacter</i> sp.	8/R	8/R	≥32/R	
5798	<i>E. coli</i>	4/R	8/R	≥32/R	
242	<i>E. coli</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	<i>mcr-1</i>
3111	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	≥16/R	16/R	<i>mcr-1 + bla_{KPC}</i>

10418	<i>K. pneumoniae</i>	>64/R	≥16/R	≥32/R	<i>bla_{KPC}</i>
3431	<i>E. coli</i>	8/R	≥16/R	≥32/R	<i>mcr-1 + bla_{KPC}</i>
10422	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	<i>bla_{KPC}</i>
283	<i>E. coli</i>	16/R	≥16/R	16/R	<i>mcr-1</i>
CD	<i>E. coli</i>	8/R	8/R	≥32/R	<i>mcr-1</i>
215	<i>E. coli</i>	16/R	8/R	≥32/R	<i>mcr-1</i>
10420	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	<i>bla_{KPC}</i>
1	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	
2	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
3	<i>K. oxytoca</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
4	<i>K. pneumoniae</i>	>64/R	≥16/R	≥32/R	
5	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
6	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	≥16/R	≥32/R	
8	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	
9	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	
26	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	≥16/R	≥32/R	
28	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	4/R*	
33	<i>E. coli</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	

56	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	8/R	8/R	
74	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	4/R	8/R	
81	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	

R: resistente; S: Sensível.