



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

LARISSA NAVA PINTO DE FARIA CASTRO

ÁGAR SPOT, DROP TEST E MICROELUIÇÃO: ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO
DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B

Brasília - DF
2024

LARISSA NAVA PINTO DE FARIA CASTRO

*ÁGAR SPOT, DROP TEST E MICROELUIÇÃO: ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO
DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B*

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
Co-orientadora: Isabel de Souza Andrade Arruda

Brasília - DF
2024

LARISSA NAVA PINTO DE FARIA CASTRO

*ÁGAR SPOT, DROP TEST E MICROELUIÇÃO: ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO
DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B*

BANCA EXAMINADORA

Tanise Vendruscolo Dalmolin (Universidade de Brasília) - Presidente

Tazio Vanni (Hospital de Base do Distrito Federal)

Rafaella Christina Rocha Moreira da Silva (Universidade de Brasília)

RESUMO

Devido ao aumento das infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, as polimixinas retornaram como opções terapêuticas para combater esses patógenos. Contudo, o uso indiscriminado e inadequado das polimixinas contribuiu para o desenvolvimento da resistência à esta classe. Assim, diversos métodos são empregados para avaliar a sensibilidade às polimixinas, sendo a microdiluição em caldo considerada o padrão de referência. Este estudo tem como objetivo avaliar o desempenho de métodos alternativos modificados na detecção de resistência frente à polimixina B. Os métodos avaliados foram *Ágar Spot*, *Drop Test* e Teste de Microeluição da polimixina B comparados com a microdiluição em caldo. Foram utilizados 100 isolados bacterianos, dos quais 82 eram sensíveis e 18 resistentes à polimixina B. Para o *Ágar Spot*, os resultados mostraram sensibilidade, especificidade, CA e EA de 100%, 98,78%, 99% e 98%, respectivamente, com apenas um ME (1%) e nenhum VME. No *Drop Test*, os valores de sensibilidade, especificidade, CA e EA foram 100%, 96,34%, 97% e 93%, respectivamente, com três ME (3%) e nenhum VME. Por fim, o teste de Microeluição da polimixina B apresentou sensibilidade, especificidade e CA de 83,33%, 98,78% e 96%, respectivamente. Desse modo, os métodos *Ágar Spot*, *Drop Test* e Microeluição da polimixina B são potenciais candidatos à inclusão na rotina dos laboratórios na detecção da resistência à polimixina B, especialmente o *Agar Spot*.

Palavras-chave: *Ágar Spot*. *Drop Test*. Microdiluição em caldo. Microeluição da Polimixina B. Polimixina B. Resistência bacteriana.

AGRADECIMENTOS

Assim como grande parte das pessoas, meu sonho era passar e me formar em uma faculdade pública, e não em qualquer uma, mas na Universidade de Brasília. Esse sonho começou em mim, mas foi abraçado por incontáveis pessoas ao meu redor e o desejo delas passou a ser me ver feliz e realizada. De antemão, agradeço a todos por terem estado comigo nesse caminho, mesmo nos momentos difíceis, quando nem mesmo eu acreditava em mim. Não tenho como citar cada nome que fez parte dessa caminhada, mas levo todos em meu coração. Meus sonhos só se tornaram realidade porque tive vocês por perto, me mostrando que valia a pena continuar.

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me concedeu força e perseverança para confiar em mim mesma e trilhar o caminho que me fez chegar até aqui. Deus, que ama sem pré-requisitos e me faz acreditar que há sempre algo pelo que lutar.

A minha mãe, Heida, que sempre foi a minha maior incentivadora. Mesmo nos dias em que eu me sentia sozinha, ela se fez presente nos detalhes. Minha mãe que me inspira, como pessoa, mulher, mãe, filha; serei eternamente grata por ter me escolhido e me ensinado a ser alguém que faz a diferença.

Ao meu pai, Ricardo, que desde quando eu era pequena me ensinou o que era acreditar em mim mesma. Meu pai que nunca mediu esforços para mostrar o quanto me ama e que sempre me protegeu e guardou dos males da vida.

Aos meus irmãos, Danilo, Lorraine e Marcelo, os meus melhores amigos, mesmo que eles não saibam disso. Meus irmãos que me acolheram como filha quando cheguei e nunca fizeram eu me sentir menos por não compartilharmos o mesmo sangue. Carrego cada memória comigo e anseio por todas que ainda estão por vir. Cada um deles me trouxe uma nova família, minhas cunhadas (Thaís e Kátia) e sobrinhos (Hayna, Nayumi, Mahara, Maximus, Matheus, Gabriel e Ana Júlia), aprendo a ser mais feliz através do olhar de cada um. Agradeço por terem colocado pessoas tão especiais na minha vida e por serem quem são.

Aos meus avós, Helienir, José e Maria das Mercês, que não estão mais aqui. Meus avós que beijaram meus machucados, me ensinaram a caminhar, me fizeram rir, me alimentaram com as melhores receitas caseiras e que me fizeram enxergar a vida com outros olhos. Guardo com carinho cada lembrança e lição que aprendi com vocês.

Ao meu avô, Murilo, mesmo que eu não o tenha conhecido, agradeço por ter me dado o pai que tenho hoje.

A toda a minha família, meus exemplos de vida. Vocês são a minha base, e Deus fez bem em me colocar em uma família como a nossa. Barulhenta, animada, falante, de bem com a vida, resumindo, feliz. Minha luz vem de vocês.

As minhas filhas de quatro patas, Chanel, Pandora e Pitanga, minhas companheiras mais leais que muitas vezes eram as únicas que sabiam como eu me sentia e que, mesmo sem saberem se comunicar, sabiam exatamente o que falar. Também aos que já se foram, mas que iluminaram tantas escuridões, Neném, Menino e Prada. Me ensinaram o verdadeiro significado de amar incondicionalmente.

As minhas melhores amigas, Clara, Giovanna, Camila e Giovana, vocês curam partes minhas que nem mesmo machucaram. Minhas irmãs de alma, vocês são a minha metade favorita. Agradeço por serem meu porto seguro, por aceitarem cada pedaço meu e por acreditarem em mim. Cuidarei dessa amizade com carinho, porque nós somos para sempre.

As minhas amigas, Juliana, Bruna, Camila Klein, Nicole, Ana Beatriz, Rafaela, Caroline, Rebecca e Luísa, cada uma de vocês sonhou comigo, me apoiou, me ouviu e me incentivou a conquistar as minhas batalhas. Eu encontro felicidade em vocês e nunca conseguiria me imaginar em um mundo no qual vocês não fazem parte da minha vida. Agradeço por existirem e por estarem ao meu lado a tantos anos.

As minhas amigas de profissão e apoiadoras desse trabalho, Rebeca e Isabel, nada disso teria sido possível sem a ajuda de vocês. Passei por cada semestre, porque as tinha ao meu lado. Não poderia pedir por melhores pessoas para compartilhar o título de Farmacêutica.

Aos meus amigos da escola, da faculdade e do intercâmbio, parte essencial da minha jornada. A cada dia tenho mais certeza de que escolhi bem a minha segunda família. Por isso, meu carinho eterno. “O objetivo da vida não é estar ao lado da maioria, mas escapar, encontrando-se no meio dos insanos. Obrigada por serem o meu lado insano”.

À Bragança, a cidade dos amigos para sempre. Cidade que me deixou sonhar e me fez uma nova Larissa. Uma parte minha sempre será de Portugal.

Aos meus professores, da faculdade e da escola, que foram mestres da vida. Sou grata por cada ensinamento e por terem sido inspiração. Em especial, à minha professora e orientadora, Tanise, agradeço por ter visto potencial em mim e por ter sido amiga em tantos momentos. Sua sabedoria é imensa e espero um dia me tornar metade do que você é. Meus olhos sempre brilham ao falar de uma profissão como professor, pois “heróis de verdade não vestem capas, eles ensinam”.

A todos que, de alguma forma, acompanharam e estiveram presentes durante esses seis anos, me incentivando a ser a minha melhor versão. Cada palavra de apoio, ombro amigo, risada compartilhada, lágrima secada e olhar de compaixão me trouxeram até esse momento. Mesmo aqueles que não estão mais presentes, seja por motivos de força maior, seja por desencontros da vida, uma parte minha caminha com cada um.

O meu mais sincero, obrigada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microdiluição em caldo para avaliação de sensibilidade da polimixina B.....	17
Figura 2. <i>Ágar Spot</i> modificado para detecção da resistência à polimixina B.	19
Figura 3. <i>Drop Test</i> modificado para detecção da resistência à polimixina B.	21
Figura 4. Microeluição da polimixina B modificado para detecção da resistência à polimixina B.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos resultados do método de referência e <i>Ágar Spot</i> modificado.	27
Tabela 2: Comparação dos resultados do método de referência e <i>Drop Test</i> modificado.	27

LISTA DE ABREVIATURAS

CA: *Categorical Agreement*

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EA: *Essential Agreement*

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FP: Falso positivo

FN: Falso negativo

L-Ara4N: 4-amino-4-desoxi-L-arabinose

LABRESIS-HCPA: Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LAMP/UnB: Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos da Universidade de Brasília

mcr: Mobile colistin resistance

MH: Mueller Hinton

MHCA: Mueller Hinton Cátion Ajustado

ME: *Major Error*

OMS: Organização Mundial da Saúde

pEtN: Fosfoetanolamina

VME: *Very Major Error*

VN: Verdadeiro negativo

VP: Verdadeiro positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Resistência antimicrobiana.....	12
1.2 Polimixinas e a resistência antimicrobiana.....	13
1.3 Metodologias para detecção da resistência às polimixinas.....	15
2. METODOLOGIA.....	17
2.1 Isolados bacterianos.....	17
2.2 Microdiluição em caldo.....	17
2.3 <i>Ágar Spot</i> modificado.....	18
2.4 <i>Drop Test</i> modificado.....	21
2.5 Microeluição da polimixina B modificado.....	23
2.6 Análise de resultados.....	25
3. RESULTADOS.....	27
4. DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS.....	36
7. APÊNDICE.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência antimicrobiana

Antimicrobianos seguros e eficazes são utilizados como tratamento de infecções bacterianas, diminuindo ou eliminando micro-organismos, e contribuindo para a redução da morbidade e da mortalidade de pacientes. No entanto, devido ao uso disseminado de antimicrobianos, associado a baixa adesão, tratamentos e dosagens errôneas para cada problema de saúde, tem sido observado o surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos (Dvoretckaia et al, 2023).

Para o economista britânico Jim O'Neill, resistência bacteriana é entendida como a capacidade de alguns micro-organismos causadores de infecções sobreviverem e crescerem frente à exposição a antimicrobianos que usualmente interromperiam seu crescimento ou os matariam. Essa resistência é um processo natural que vem sendo percebida desde a descoberta dos primeiros antimicrobianos e estima-se que até 2050 possa causar a morte de cerca de 10 milhões de pessoas no mundo todo (O'Neill, 2016). Com o passar dos anos, a resistência bacteriana passou a apresentar risco global e segue como um problema crescente de saúde pública (Trimble et al., 2016).

Segundo o estudo publicado no *The Lancet*, com estimativas para 204 países, 4,95 milhões de mortes foram associadas a infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos e cerca de 1,27 milhões de mortes foram diretamente atribuídas à resistência antimicrobiana (Lancet., 2022).

As bactérias podem apresentar resistência intrínseca (atualmente denominada como fenótipo esperado resistente) ou resistência adquirida a determinadas classes de antimicrobianos. A resistência intrínseca é determinada por características estruturais e funcionais inerentes, isto é, que fazem parte da herança genética de determinada espécie bacteriana. Na resistência adquirida, as bactérias podem adquirir resistência a agentes antimicrobianos através da alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana, bombas de efluxo, alterações no local alvo dos antimicrobianos, genes que codificam enzimas que degradam os antimicrobianos, dentre outros (Baran et al., 2023).

1.2 Polimixinas e a resistência antimicrobiana

Em 2024 a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou a lista de bactérias com importância para a saúde pública para orientar a pesquisa, o desenvolvimento e as estratégias para prevenir e controlar a resistência antimicrobiana. Dentre as bactérias do grupo crítico estão listadas *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos e espécies da ordem Enterobacterales resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e resistentes aos carbapenêmicos (WHO, 2024).

Infecções provocadas por Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos estão associadas a taxas de mortalidade elevadas, principalmente devido à dificuldade no tratamento. As polimixinas são utilizadas como uma das últimas opções de tratamento para infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes aos antimicrobianos, principalmente as produtoras de carbapenemases (Collar et al., 2024; Lee et al., 2022; Yang et al., 2023). Atualmente, existem novas terapias com combinação de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases para tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases, como ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam e meropenem-vaborbactam. Entretanto, essas combinações não estão disponíveis em muitas partes do mundo e não são abrangentes contra todos os mecanismos de resistência (como as metalo-betalactamases, MBL). Além disso, a literatura já descreve casos de resistência a essas combinações (Cruz-López et al., 2022).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídios catiônicos formados por um grupo de cinco compostos químicos, designados de polimixina A, B, C, D e E, sendo que apenas as polimixinas B e E (também denominada colistina) são utilizadas na prática clínica (Li et al., 2006; Nation et al., 2015). As polimixinas caíram em desuso nos anos 70 devido ao seu potencial neurotóxico e nefrotóxico, sendo estritamente usadas para tratamentos oftálmicos e tópicos, bem como para uso sistêmico ou nebulizado para pacientes com fibrose cística (Dalmolin et al., 2018; Poirel et al., 2017). Apesar disso, com o passar dos anos, o interesse clínico nas polimixinas aumentou devido ao surgimento de bactérias Gram-negativas multirresistentes e a falta de novos antimicrobianos no mercado (Loutet et al., 2011; Soman et al., 2021F; Tran et al., 2016).

As polimixinas possuem estruturas semelhantes, diferindo apenas por um aminoácido na posição 6 no anel peptídico, isto é, a colistina apresenta o aminoácido leucina em seu anel e a polimixina B apresenta o aminoácido fenilalanina (Velkov et al., 2010). Além disso, apresentam propriedades farmacológicas diferentes, haja visto que a colistina é administrada por via intravenosa na forma de um pró-fármaco inativo (metanossulfonato de colistina) e a polimixina B é administrada como um fármaco ativo (Nation et al., 2015).

O principal mecanismo de ação das polimixinas é por meio do rompimento da membrana celular bacteriana, através da interação com moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos da superfície externa bacteriana. Essa classe de antimicrobianos se liga de forma seletiva ao componente lipídico A carregado negativamente, deslocando cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), que estabilizam a parede celular, promovendo o aumento da permeabilidade das membranas e liberação dos componentes celulares. Isso causa ruptura da parede celular e da membrana citoplasmática da bactéria, e posteriormente, morte celular (Ayoub, 2020).

Atualmente, o uso das polimixinas enfrenta um aumento na resistência devido, principalmente, à resistência cromossomal associada a modificações no grupo fosfato do lipídio A. Essas modificações no grupo fosfato ocorrem através da adição de grupos catiônicos 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (pEtN) ao lipídio A, o que causa alteração da carga total do LPS, enfraquecendo a ligação das polimixinas ao alvo principal. Dois sistemas reguladores estão relacionados com essas alterações, PmrAB e PhoPQ e seu gene regulador *mgrB*, que tem como função permitir que as células bacterianas reajam às mudanças ambientais, modificando a sua expressão genética (Ayoub, 2020).

O cenário da resistência às polimixinas mudou após a descoberta do gene de resistência à colistina, denominado *mobile colistin resistance (mcr)* codificado por plasmídeo. O gene foi identificado em 2015, sendo responsável pela resistência móvel através da codificação de pEtN transferase que medeia a adição de pEtN ao lipídio A. Com isso, uma adição catiônica reduz a carga negativa e limita a ligação do antimicrobiano e a quebra da membrana, sugerindo que há diminuição da penetração da polimixina (Ayoub, 2020; Liu et al., 2016; Poirel et al., 2017). O gene *mcr* está presente

em mais de 72 países do mundo e é altamente prevalente em espécimes animais. Na literatura foram identificadas dez variantes do gene *mcr* em onze espécies de Enterobacterales, sendo as mais comuns *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp. Dentre essas variantes, o gene *mcr-1* é o mais frequentemente documentado, com 26 subtipos identificados (de *mcr-1.2* a *mcr-1.27*), que resultam de mutações pontuais que causam alterações nos nucleotídeos (Rubens et al., 2024).

1.3 Metodologias para detecção da resistência às polimixinas

Os métodos de fita gradiente e disco-difusão apresentam difusão lenta e irregular das polimixinas no ágar, acarretando possíveis erros e baixa confiabilidade dos resultados (Nordmann et al., 2016; Poirel et al., 2017). Métodos automatizados também não são recomendados, devido a possíveis resultados apresentando heterorresistência, sendo esses resultados não interpretáveis pelo equipamento (Nordmann et al., 2016; Poirel et al., 2017). Diante disso, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) recomendam que a microdiluição em caldo seja o teste referência na avaliação da sensibilidade às polimixinas (Pasteran et al., 2020).

A microdiluição em caldo é realizada em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA) com diluição seriada da polimixina e inóculo bacteriano de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL em cada poço. A microdiluição em caldo é considerada uma técnica de difícil execução por exigir atenção minuciosa e preparo manual da placa, além de ser dispendiosa, dificultando sua realização em laboratórios com poucos recursos (Nordmann et al., 2016; Poirel et al., 2017).

Na tentativa de diminuir os problemas encontrados na microdiluição em caldo, empresas desenvolveram produtos comerciais contendo polimixinas liofilizadas diluídas em painéis plásticos, como por exemplo o Policimbac® (Probac do Brasil), ComASP® (Liofilchem), UMIC® (Biocentric), dentre outros. No entanto, esses testes comerciais são úteis para a classificação de isolados resistentes à polimixina B, apresentando inconsistências na detecção de isolados sensíveis à polimixina B. Essas inconsistências podem ser explicadas pela aderência das polimixinas às superfícies plásticas das placas de poliestireno, devido a natureza policatiônica das polimixinas, proporcionando

resultados não confiáveis e podendo ocasionar menores concentrações de polimixina B nos poços (Dalmolin et al., 2020).

Diante disso, testes são desenvolvidos para mitigar os erros da microdiluição em caldo e facilitar a sua realização (Lee et al., 2023). *Ágar Spot*, *Drop Test* e Microeluição das polimixinas apresentam-se como métodos alternativos à microdiluição em caldo.

Ágar Spot consiste na diluição das polimixinas no meio de cultura *Ágar Mueller-Hinton* que é posteriormente inoculado com cepas bacterianas em estrias. Após transcorrido o tempo de incubação é possível observar o crescimento de colônias em diferentes concentrações das polimixinas e categorizá-las conforme estabelecido pelo BrCAST (BrCAST, 2024; Pasteran et al., 2020). *Drop Test* consiste na inoculação de cepas bacterianas em meio de cultura *Ágar Mueller-Hinton*, seguido da deposição de gotas de diferentes concentrações de polimixinas a fim de observar, após o período de incubação, a formação de zonas de inibição e categorizados segundo BrCAST (BrCAST, 2024; Shinohara et al., 2022). Por sua vez, a Microeluição das polimixinas consiste na eluição das polimixinas a partir de discos em meio de cultura *Mueller-Hinton* e inoculado com a bactéria de interesse. Após transcorrido o tempo de incubação, o crescimento é avaliado pela turbidez e categorizados segundo o estabelecido pelo BrCAST (BrCAST, 2024; Simner et al., 2019).

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo avaliar o desempenho de métodos alternativos modificados na detecção de resistência à polimixina B.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram oriundos de banco de bactérias do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos da Universidade de Brasília (LAMP/UnB) e do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LABRESIS-HCPA).

Os isolados bacterianos foram identificados do seu local de origem, sendo utilizados 100 bactérias: 66 de *E. coli*, 29 de *K. pneumoniae*, 2 de *Klebsiella oxytoca*, 1 de *Citrobacter freundii*, 1 de *Serratia marcescens* e 1 de *Enterobacter* sp.

2.2 Microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo consiste na diluição seriada da polimixina B (128 a 0,125 µg/mL) no meio Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) em uma placa de 96 poços, juntamente com 5×10^5 UFC/mL de inóculo bacteriano de interesse em cada poço.

Para realização dessa técnica, 50 µL de meio de cultura MHCA foi pipetado em toda a placa, exceto na linha 1. 100 µL de 256 µg/mL de polimixina B foi pipetada na linha 1. Em seguida realizou-se a diluição seriada (50µL) do poço 1 até 10, descartando o volume do último poço (10). O inóculo bacteriano foi padronizado para escala 0,5 de McFarland, diluído 1:100, e pipetado 50 µL de suspensão bacteriana nas linhas 1-10. A linha 11 foi utilizada como controle positivo (50 µL de inóculo bacteriano + 50 µL de MHCA) e a linha 12 como controle negativo (100 µL MHCA) (Figura 1).

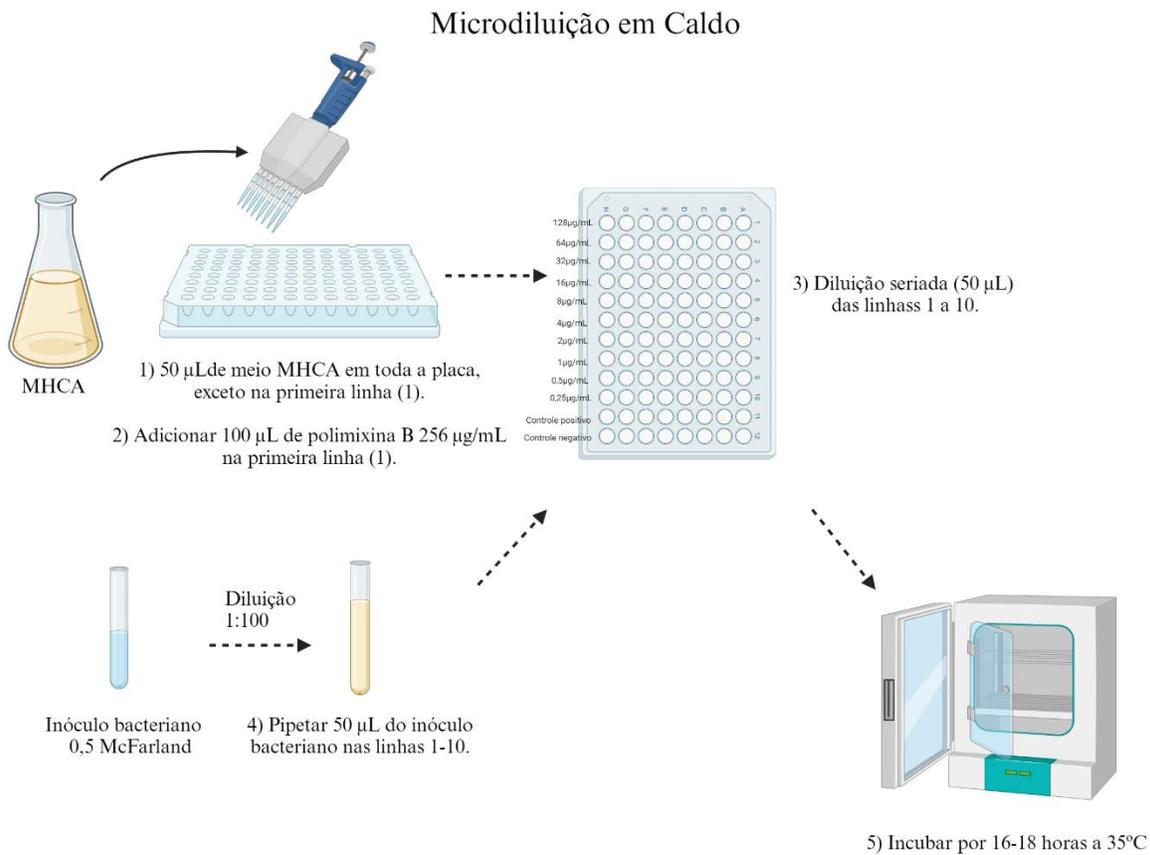


Figura 1. Microdiluição em caldo para avaliação de sensibilidade da polimixina B. Criado com BioRender.com.

As placas foram incubadas a 35°C por um período entre 16-18 horas. Os resultados foram analisados e interpretados seguindo os critérios de ponto de corte estipulados pelo BrCAST, onde a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. CIM ≥ 4 µg/mL é considerada resistente à polimixina B e CIM ≤ 2 µg/mL é considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2024)

2.3 Ágar Spot modificado

O método de *Ágar Spot* foi baseado no estudo de Pasteran (2020) com algumas alterações. Pasteran e colaboradores utilizaram placas com concentrações de 2 µg/mL

e 3 µg/mL para estudos com colistina. Em nosso estudo utilizamos três placas: placas com 2 µg/mL, 4 µg/mL e 8µg/mL, além da utilização da polimixina B ao invés de colistina.

Em 12 mL de caldo MHCA foram adicionados 24 discos de polimixina B (300UI = 30 µg cada disco), deixando eluir por 1 hora, resultando em uma solução mãe de 60 µg/mL. Através desta solução mãe foram confeccionadas as placas de ágar contendo 2 µg/mL de polimixina B (1333 µL solução mãe + 40 mL Ágar Mueller Hinton fundido), 4 µg/mL (2667 µL solução mãe + 40 mL Ágar Mueller Hinton fundido) e 8 µg/mL (5333 µL solução mãe + 40 mL Ágar Mueller Hinton fundido). As cepas bacterianas em análise foram ajustadas para a escala padrão de 0,5 de McFarland e foram inoculadas nas placas com polimixina B nas diferentes concentrações por meio de estrias em cada Placa de Petri de 90 mm. As placas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos e incubadas a 35°C por um período entre 16-18 horas (Figura 2).

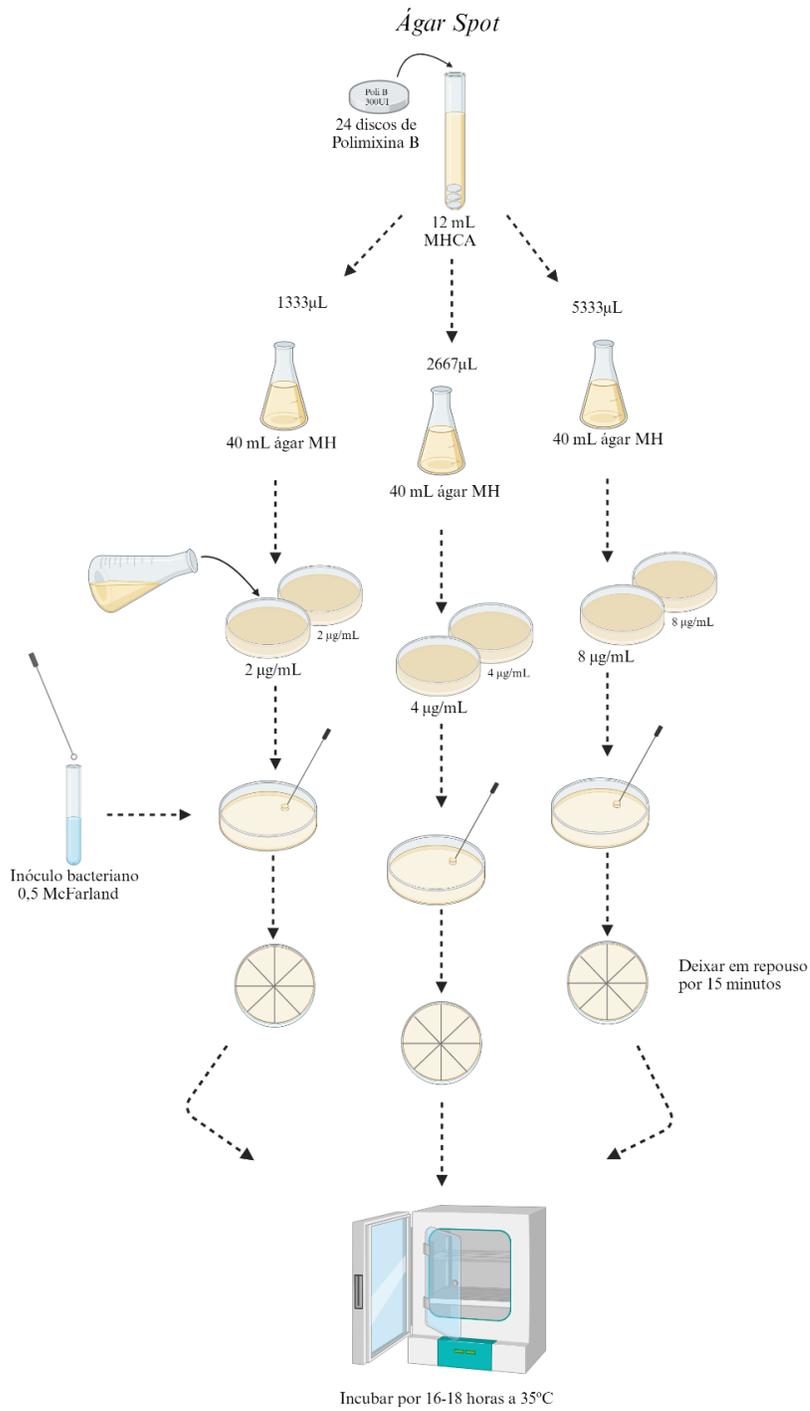


Figura 2. Ágar Spot modificado para detecção da resistência à polimixina B.
Criado com BioRender.com.

Após o período de incubação, pode-se observar o crescimento ou ausência de crescimento bacteriano nas placas com diferentes concentrações da polimixina B. As CIMs foram interpretadas de acordo com o estabelecido como ponto de corte pelo BrCAST. CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis à polimixina B e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes à polimixina B (BrCAST, 2024).

2.4 Drop Test modificado

Drop Test foi baseado no estudo de Shinohara (2022) com algumas alterações. Shinohara e colaboradores utilizaram gotas com concentrações de 12 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ de colistina. Em nosso estudo utilizamos quatro concentrações (2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$), e polimixina B ao invés de colistina.

As quatro concentrações foram preparadas a partir de discos de polimixina B (300UI = 30 μg cada disco) em diferentes volumes de MHCA em quatro tubos estéreis de vidro. Em cada um dos quatro tubos de vidro foi utilizado apenas um disco de polimixina B. Para a concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ foi usado um volume de 15 mL de MHCA, para 4 $\mu\text{g/mL}$ foi usado um volume de 7,5 mL de MHCA, para 8 $\mu\text{g/mL}$ foi usado um volume de 3,75 mL de MHCA e para 16 $\mu\text{g/mL}$ foi usado um volume de 1,875 mL de MHCA. Todos os tubos foram deixados em repouso em temperatura ambiente durante uma hora para que houvesse a total eluição da polimixina B do disco.

As cepas bacterianas em análise foram ajustadas para a escala padrão de 0,5 de McFarland e foram repicadas por espalhamento com swab estéril em placas contendo Ágar Mueller-Hinton. Nessas placas foram depositadas gotas de 10 μL de cada concentração da polimixina B e foram deixadas em repouso em temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos e incubadas a 35°C por um período entre 16-18 horas (Figura 3).

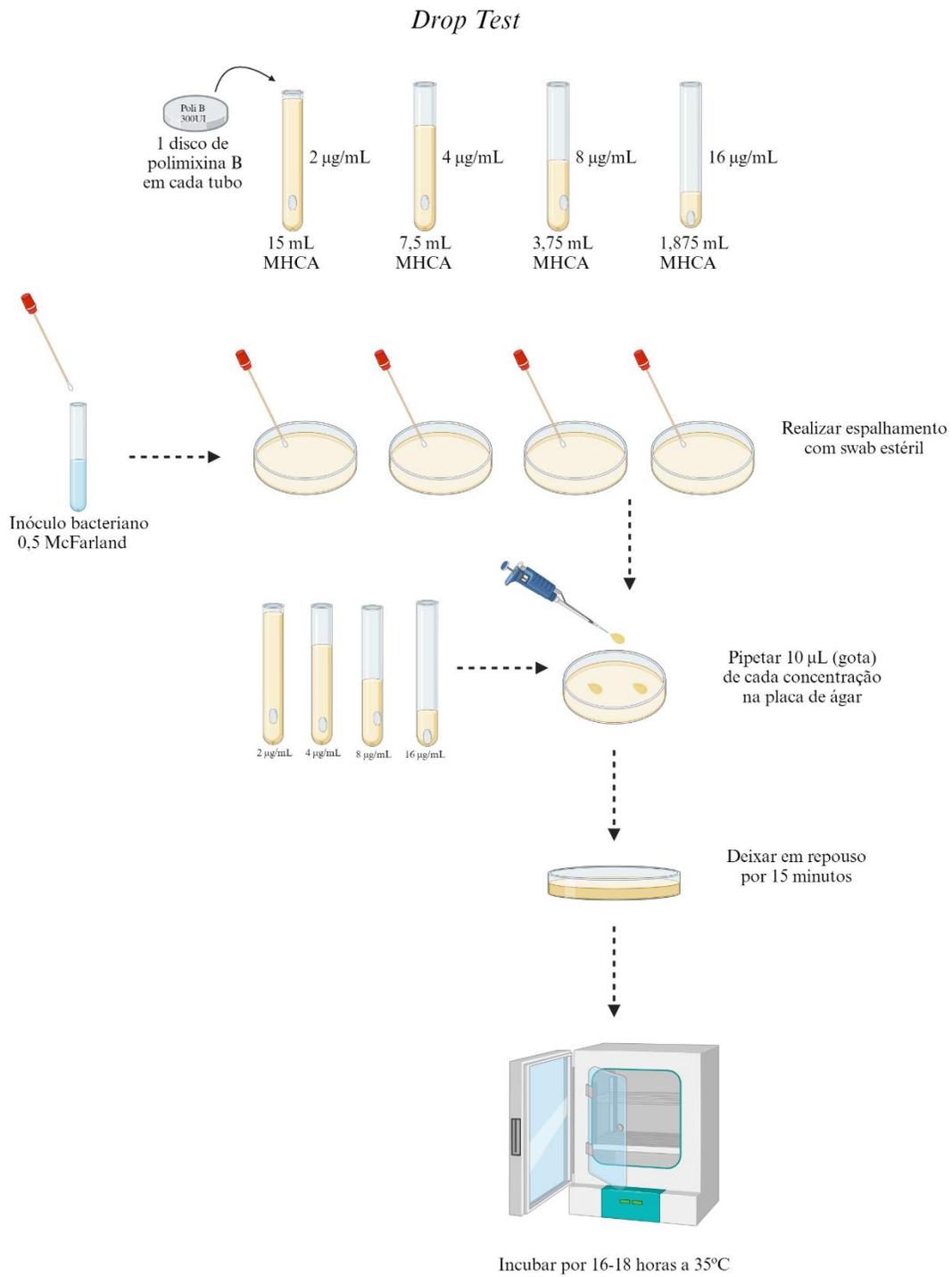


Figura 3. Drop Test modificado para detecção da resistência à polimixina B. Criado com BioRender.com.

Após o tempo de incubação, puderam ser observadas zonas de inibição ou crescimento onde foram pipetadas as gotas de diferentes concentrações da polimixina B. Nossos resultados foram interpretados de acordo com o estabelecido como ponto de corte pelo BrCAST. Isolados com CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis à polimixina B e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes à polimixina B (BrCAST, 2024).

2.5 Microeluição da polimixina B modificado

O teste de Microeluição foi baseado no estudo de Simner (2019) com algumas alterações. Simner e colaboradores utilizaram tubos com as concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$ de colistina. Em nosso estudo utilizamos apenas uma concentração (4 $\mu\text{g/mL}$) e polimixina B ao invés de colistina.

Em um tubo de vidro estéril com um volume de 15 mL de meio MHCA foram adicionados 2 discos de polimixina B (300 UI = 30 μg cada disco) resultando na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, o tubo foi deixado em repouso em temperatura ambiente durante uma hora para que houvesse a eluição total da polimixina B do disco. Para otimização do teste, esse volume foi fracionado em tubos contendo 1 mL. As cepas bacterianas em análise foram ajustadas para a escala padrão de 0,5 de McFarland e foram adicionados 5 μL do inóculo bacteriano no tubo contendo 4 $\mu\text{g/mL}$ da polimixina B. Esses tubos foram incubados a 35°C por um período entre 16-18 horas (Figura 4).

Microeluição da Polimixina B

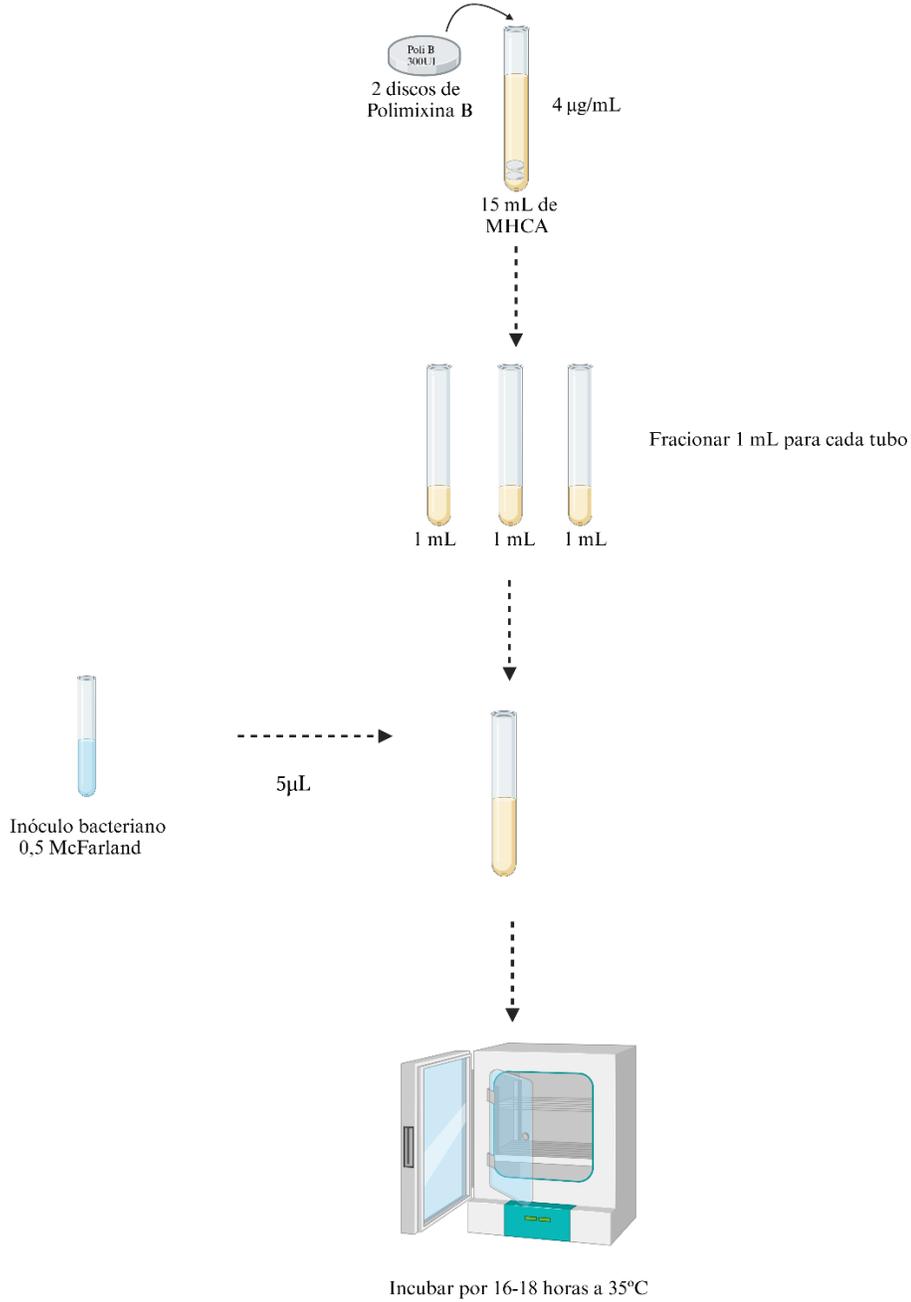


Figura 4. Microeluição da polimixina B modificado para detecção da resistência à polimixina B.

Criado com BioRender.com

Decorrido o tempo de incubação, os tubos puderam ser analisados, observando crescimento bacteriano (turbidez) indicando cepas resistentes à polimixina B ou ausência de crescimento (límpido) indicando cepas sensíveis à polimixina B (BrCAST, 2024).

2.6 Análise de resultados

Microdiluição em caldo foi utilizado como método de referência para comparação dos resultados dos novos métodos testadas neste estudo (*Ágar Spot*, *Drop Test* e *Microeluição* da polimixina B). Estas metodologias foram analisadas quanto a 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 foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Sensibilidade} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})$$

onde, VP (verdadeiro positivo) refere-se aos isolados classificados como resistentes segundo o método de referência (microdiluição em caldo) e pelo novo método; e FN (falso negativo) refere-se aos isolados classificados como resistentes pelo método de referência, porém classificados como sensíveis pelo novo método.

A especificidade foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Especificidade} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})$$

onde, VN (verdadeiro negativo) refere-se aos isolados classificados como sensíveis segundo o método de referência e pelo novo método; FP (falso positivo) refere-se aos isolados classificados como sensíveis pelo método de referência, porém classificados como resistentes pelo novo método.

CA consiste na porcentagem de isolados classificados com o mesmo resultado (resistente ou sensível) quando comparado com o novo método. EA consiste na porcentagem de isolados com CIM +/- 1 diluição entre o método de referência e pelo novo método. CA e EA são considerados aceitáveis quando apresentarem valores $\geq 90\%$ (ISO, 2021).

ME consiste na porcentagem de isolados classificados como resistentes segundo o novo método, porém deveriam apresentar resultados sensíveis segundo o método de referência. VME consiste na porcentagem de isolados classificados como sensíveis

segundo o novo método, porém deveriam apresentar resultados resistentes segundo o método de referência. ME e VME são considerados aceitáveis quando apresentarem valores $\leq 3\%$ (ISO, 2021).

3. RESULTADOS

Dentre os 100 isolados testados, 82 foram considerados sensíveis à polimixina B (59 *E. coli*, 20 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca* e 1 *C. freundii*) e 18 isolados foram considerados resistentes à polimixina B (5 *E. coli*, 11 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens* e 1 *Enterobacter* sp.), segundo o teste de referência microdiluição em caldo.

Quando avaliado o *Ágar Spot* modificado, 81 isolados foram considerados sensíveis e 19 isolados foram considerados resistentes à polimixina B. Os resultados encontrados no *Ágar Spot* modificado e sua comparação com o método de referência estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação dos resultados do método de referência e *Ágar Spot* modificado.

Microdiluição em caldo	<i>Ágar Spot</i> modificado				
		≤2 µg/mL Sensível	4 µg/mL Resistente	8 µg/mL Resistente	≥16 µg/mL Resistente
≤2 µg/mL Sensível		81			1*
4 µg/mL Resistente			1	1	1
8 µg/mL Resistente				3	3
≥16 µg/mL Resistente				1	8

Azul: Número de isolados com valores de CIM idêntica para a microdiluição em caldo e *Ágar Spot* modificado.

*ME: Erro Maior

Ágar Spot modificado exibiu sensibilidade de 100% e especificidade de 98,78%. CA de 99% e EA de 98%. Tanto CA quanto EA estão dentro dos valores aceitáveis, isto é, ≥ 90%. Houve um ME (1%), admissível e dentro do percentual ideal: *K. pneumoniae* sensível à polimixina B (CIM de 2 µg/mL) pela microdiluição em caldo e resistente no *Ágar Spot* modificado (CIM de ≥16 µg/mL). Não foram encontrados VME.

Para o *Drop Test* modificado, 79 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B e 21 isolados foram considerados resistentes à polimixina B. Os resultados citados estão elucidados na Tabela 2 comparando com o método de referência.

Tabela 2: Comparação dos resultados do método de referência e *Drop Test* modificado.

	<i>Drop Test</i> modificado					
		≤2 µg/mL Sensível	4 µg/mL Resistente	8 µg/mL Resistente	16 µg/mL Resistente	≥32 µg/mL Resistente
Microdiluição em caldo	≤2 µg/mL Sensível	79	2*			1*
	4 µg/mL Resistente				1	2
	8 µg/mL Resistente			2	1	3
	16 µg/mL Resistente				1	2
	≥32 µg/mL Resistente				1	5

Azul: Número de isolados com valores de CIM idêntica para a microdiluição em caldo e *Drop Test* modificado .

*ME: Erro Maior

O *Drop Test* modificado exibiu sensibilidade de 100% e especificidade de 96,34%. CA de 97% e EA de 93%. Tanto CA quanto EA estão dentro dos valores aceitáveis, isto é, ≥ 90%. Houve três ME (3%), dentro do percentual ideal: (i) *K. pneumoniae* sensível à polimixina B (CIM de 2 µg/mL) pela microdiluição em caldo e resistente pelo método de *Drop Test* modificado (CIM de 4 µg/mL); (ii) *K. pneumoniae* sensível à polimixina B (CIM de 2 µg/mL) pela microdiluição em caldo e resistente pelo *Drop Test* modificado (CIM de ≥ 32 µg/mL); e (iii) *K. pneumoniae* sensível à polimixina B (CIM de 1 µg/mL) pela microdiluição em caldo e resistente pelo *Drop Test* modificado (CIM de 4 µg/mL). Não foram encontrados VME.

Para a microeluição da polimixina B, 84 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B e 16 isolados foram considerados resistentes à polimixina B. A sensibilidade do método foi de 83,33%, especificidade de 98,78% e CA de 96%. EA não foi calculada para esse método, haja visto que esse estudo analisou apenas uma concentração. CA está dentro dos valores aceitáveis, isto é, $\geq 90\%$. Houve um ME (1%), dentro do percentual ideal: *K. pneumoniae* sensível à polimixina B (CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$) pela microdiluição em caldo e resistente na microeluição (CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$). Foram encontrados 3% de VME, valor considerado aceitável: 2 *E. coli* e 1 *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B pela microdiluição em caldo e sensíveis pela microeluição.

4. DISCUSSÃO

Tendo em vista o crescimento do debate a respeito da resistência antimicrobiana como um problema de saúde pública, o que desafia o uso de antimicrobianos de primeira linha no combate de infecções bacterianas, as polimixinas são consideradas uma das últimas opções no tratamento de infecções bacterianas graves multirresistentes (Ayoub, 2020; Poirel et al., 2017).

Os métodos tradicionais de detecção da resistência às polimixinas podem enfrentar algumas limitações como adesão ao poliestireno da placa e difícil leitura dos resultados. Portanto, há uma necessidade de desenvolver e implementar novos métodos para detecção mais sensível, rápida e prática da resistência às polimixinas (Nordmann et al., 2016; Poirel et al., 2017)

Em nosso estudo, analisamos o desempenho do *Ágar Spot*, *Drop Test* e o da Microeluição da polimixina B modificados. Conforme os resultados encontrados, foram demonstrados valores de sensibilidade de 100%, especificidade de 98,78%, CA de 99%, EA de 98%, bem como ME de 1% e VME de 0% para *Ágar Spot* modificado.

Outros estudos avaliaram o *Ágar Spot*. Raro e colaboradores (2021) avaliaram a resistência à polimixina B em 137 cepas de Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos, com diluição em *Ágar Mueller Hinton* com 0,25-64 µg/mL de polimixina B e um ágar de triagem (*Ágar Mueller Hinton* com 3 µg/mL de polimixina B). Os resultados demonstraram sensibilidade de 86,2% e especificidade de 97,5% para a diluição em ágar e sensibilidade de 86,2% e especificidade de 98,7% para o teste de triagem. Os valores de ME foram de 1,5% e 0,73%, respectivamente, e VME de 5,8% para ambos os métodos, taxa considerada acima dos padrões aceitáveis. Apesar da diluição em ágar possibilitar a determinação mais precisa do valor CIM, o teste de triagem é menos trabalhoso e mais econômico, já que avalia apenas uma diluição (Raro et al., 2021). Nosso estudo avaliou diferentes concentrações de ágar com polimixina B, apresentando melhores resultados, principalmente em relação à sensibilidade e VME.

Pasteran e colaboradores (2020) investigaram o desempenho do *Ágar Spot* para detecção da resistência à colistina, utilizando concentrações limitadas a 2 µg/mL e 3 µg/mL. Avaliaram 271 isolados clínicos de bacilos Gram-negativos, incluindo espécies

da ordem Enterobacterales, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. No geral, os resultados mostraram uma CA de 88,5% e 11% de VME para a concentração de 2 µg/mL, porém houve melhora substancial na CA de 95,5% e 3,8% de VME quando aumentada a concentração para 3 µg/mL. Quando avaliados individualmente cada grupo bacteriano, o estudo apresentou CA de 100% e 0% de VME para *P. aeruginosa*; CA de 94,6% e 10% de VME para *Acinetobacter* spp.; e CA de 98,5% e VME de 3,5% para Enterobacterales na concentração de 3 µg/mL (Pasteran et al., 2020). Em comparação com o nosso estudo, é possível observar certa semelhança entre os resultados para Enterobacterales, especialmente em relação à CA. Nosso estudo não avaliou bacilos Gram-negativos não fermentadores.

Já para o *Drop Test* modificado, nosso estudo demonstrou valores de sensibilidade de 100%, especificidade de 96,34%, CA de 97%, EA de 93%, ME de 3% e VME de 0%.

Shinohara e colaboradores (2022) avaliaram cerca de 100 isolados de 11 espécies diferentes utilizando *Drop Test* nas concentrações de 12 e 16 µg/mL de colistina. Quando avaliados individualmente para cada grupo bacteriano, o estudo apresentou melhores resultados para 12 µg/mL de colistina, isto é, CA de 100% e ME de 7% para *P. aeruginosa*; CA de 98% e 0% de ME para Enterobacterales; e CA de 95% e 10% ME para *A. baumannii*. Não foram encontrados VME (Shinohara et al., 2022).

Perez e colaboradores (2021) avaliaram 715 isolados (628 espécies de Enterobacterales e 87 bacilos Gram-negativos não fermentadores), utilizando o *Drop Test*. Para a avaliação desse teste foram empregadas concentrações que variaram de 0,25 a 8 µg/mL de polimixina B. Na concentração de 2 µg/mL, a precisão alcançou 92%, enquanto a concentração de 4 µg/mL a precisão foi de 95,1% e na concentração de 8 µg/mL a precisão foi de 94,8%. Não foi encontrado nenhum VME entre os isolados (Perez et al., 2021).

Llorente e colaboradores (2022) também avaliaram o desempenho do *Drop Test*, frente à colistina em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Encontraram CA de 100% para Enterobacterales e 99,2% para *P. aeruginosa*. Não encontraram ME ou VME (Llorente et al., 2022).

Pasteran e colaboradores avaliaram a resistência cromossomal e plasmidial à colistina utilizando o *Drop Test*. Inicialmente testaram concentrações variando de 4 a 64 µg/mL, porém a solução de colistina de 16 µg/mL mostrou o melhor desempenho nos testes preliminares. No geral os resultados demonstraram uma CA de 96,2% com 0,7% de VME e 3,8% de ME. Quando avaliados individualmente para cada grupo bacteriano, os autores encontraram 100% de CA para *Acinetobacter* spp., 97,9% para Enterobacterales e 97,4% para *P. aeruginosa* (Pasteran et al., 2020).

Para a Microeluição da polimixina B nosso estudo obteve valores de sensibilidade de 83,33%, especificidade de 98,78%, CA de 96%, ME de 1% e VME de 3%. Como avaliamos apenas uma concentração de polimixina B (4 µg/mL), não realizamos o cálculo de EA. Apenas uma concentração é uma sugestão dos autores para ser utilizada como triagem fácil e barata nas rotinas laboratoriais.

Simner e colaboradores (2019) avaliaram 121 isolados clínicos retrospectivos, 45 isolados clínicos prospectivos e 6 isolados de *E. coli mcr-1* positivos. Os resultados mostraram uma CA de 98% e uma EA de 99%. No entanto, foi encontrado VME de 50% nas cepas produtoras de *mcr-1* (CIM variando de 2 a 4 µg/mL), alterando a categorização do isolado de sensível para resistente à colistina (Simner et al., 2019). A metodologia de eluição em disco mostra uma abordagem útil e promissora para a prática laboratorial. No entanto, é necessário pesquisar mais isolados com o gene *mcr* e validar os resultados por meio da microdiluição em caldo (Rubens et al., 2024).

Cielo e colaboradores (2020) também avaliaram o teste de eluição para determinar a resistência à polimixina B. A pesquisa incluiu 196 isolados de Enterobacterales e alcançou uma CA com 99,5%, 0% de ME e 1,11% de VME (Cielo et al., 2020).

Outro trabalho avaliou a microeluição da colistina em 270 isolados de Enterobacterales, 122 isolados de *P. aeruginosa* e 106 isolados de *Acinetobacter* spp. No quadro geral os resultados revelaram uma CA de 97,4%, EA de 94,4%, ME de 0,9% e VME de 3,2%. Quando avaliados individualmente para cada grupo bacteriano, observaram CA de 98,6%, ME de 0% e VME de 2,5% para Enterobacterales; CA de 99,3%, ME de 0,7% e VME de 0% para *P. aeruginosa*; e CA de 93,1%, ME de 3,3% e

VME de 5,6% para *Acinetobacter* spp. Esses valores indicam que alguns resultados superaram o limite aceitável de $\leq 3\%$ (Humphries et al., 2019).

Já em 2020, Dalmolin e colaboradores realizaram testes de eluição para avaliar a sensibilidade à colistina em 85 isolados de Enterobacterales empregando uma versão miniaturizada do teste original. Os resultados mostraram uma CA de 91,2%, ME de 4,65% e VME de 16%. As taxas de ME e VME foram consideradas insatisfatórias (Dalmolin et al., 2020).

Finalmente, Kansak e colaboradores (2023) avaliaram o desempenho do método de eluição em disco de caldo para colistina. O estudo incluiu 89 cepas de *K. pneumoniae* e 5 de *E. coli*. Os resultados mostraram uma CA de 100%, indicando uma alta precisão do método na identificação de resistência à colistina. No entanto, o método apresentou limitações, pois não conseguiu determinar valores de CIM inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$ ou superiores a 4 $\mu\text{g/mL}$, o que impossibilitou o cálculo da EA. Além disso, o estudo não encontrou valores de ME ou VME, sugerindo que o método é eficaz na identificação de cepas resistentes e sensíveis, mas destaca a necessidade de considerar essas limitações ao interpretar os resultados (Kansak et al., 2023).

Além da cepa bacteriana isolada, a microeluição colorimétrica de polimixina B pode ser realizada para determinação da resistência à polimixina B diretamente de hemoculturas. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 94,1% e uma especificidade de 99,1%, demonstrando ser uma metodologia viável, precisa e rápida para determinar a sensibilidade à polimixina B. No entanto, foi observado um ME de 0,8% (uma hemocultura positiva para *K. pneumoniae*) e 5,9% de VME (hemoculturas positivas para *K. pneumoniae* e o complexo *Enterobacter cloacae*) (Collar et al., 2024).

Os métodos utilizados em nosso estudo demonstraram boa sensibilidade e especificidade, assim como CA, EA e valores de ME e VME dentro dos padrões aceitáveis. É importante destacar que, entre os três métodos analisados, a Microeluição da polimixina B apresentou o menor valor de sensibilidade. Ao comparar nossos resultados com os de outros estudos, podemos observar que os valores encontrados em nossa pesquisa estão alinhados com a literatura, embora haja variações específicas que refletem a complexidade do fenômeno da resistência bacteriana.

Por serem menos complexos e requererem menos equipamentos e reagentes do que a microdiluição em caldo, esses métodos alternativos destacam-se pela sua agilidade e menor custo. Além disso, a interpretação dos resultados é direta e simplificada, o que otimiza a prática laboratorial e facilita a implementação de medidas clínicas apropriadas.

Cabe salientar que o presente estudo enfrentou limitações devido à ausência de uma análise de isolados de bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, os quais são conhecidos pela sua resistência a diferentes antimicrobianos e pela capacidade de causar infecções graves. Dessa forma, a falta de uma investigação específica sobre essas espécies pode ter comprometido a profundidade da compreensão sobre o perfil de resistência antimicrobiana e a epidemiologia desses agentes. Além disso, o baixo número de isolados resistentes comparados ao número de isolados sensíveis também foram considerados como limitações do nosso estudo.

Novos estudos focados em uma gama mais abrangente de espécies são necessários para avaliar o desempenho dos métodos aplicados neste estudo, permitindo uma avaliação mais complexa. Além disso, a testagem diretamente de hemoculturas positivas pode ser interessante com o intuito de acelerar a liberação do resultado de resistência às polimixinas.

5. CONCLUSÃO

Diante da crescente resistência antimicrobiana e da escassez de novos antimicrobianos, o interesse nas polimixinas tem aumentado. Com o uso crescente das polimixinas, surge a necessidade de métodos rápidos, eficazes, precisos, seguros e econômicos para detecção de cepas resistentes às polimixinas.

Este estudo demonstrou que os métodos *Ágar Spot*, *Drop Test* e Teste de Microeluição da polimixina B têm um desempenho notável quando comparados ao método de referência, a microdiluição em caldo. Os testes mostraram alta sensibilidade, especificidade, CA e EA, com baixos índices de ME e VME. Embora a Microeluição tenha apresentado a menor sensibilidade, o *Ágar Spot* se destacou devido a bons resultados em todas as análises.

A maioria das pesquisas sobre resistência as polimixinas se concentram no uso da colistina. A relevância deste estudo reside no fato de que foi empregada a polimixina B, em vez de colistina, o que é particularmente importante em contextos onde a colistina não está disponível comercialmente, como é o caso do Brasil.

Além disso, utilização de discos comerciais impregnados com polimixina B é outro diferencial desse trabalho, o qual facilita o manuseio do antimicrobiano nos laboratórios clínicos e torna o teste menos oneroso. A implementação de métodos rápidos e de baixo custo pode melhorar a detecção precoce da resistência às polimixinas, auxiliando na escolha de terapias adequadas e no controle da disseminação de cepas resistentes.

Desse modo, os métodos *Ágar Spot*, *Drop Test* e Microeluição da polimixina B são potenciais candidatos à inclusão na rotina dos laboratórios na detecção da resistência à polimixina B, especialmente o *Agar Spot*.

6. REFERÊNCIAS

Ayoub MC. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. *Membranes (Basel)*. 2020 Aug 8;10(8):181. doi: 10.3390/membranes10080181.

Baran A, Kwiatkowska A, Potocki L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 17;24(6):5777. doi: 10.3390/ijms24065777.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), 2024. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>

Cielo NC, Belmonte T, Raro OHF, da Silva RMC, Wink PL, Barth AL, da Cunha GR, Mott MP, Riche CVW, Dias C, Caierão J. Polymyxin B broth disk elution: a feasible and accurate methodology to determine polymyxin B susceptibility in Enterobacterales. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Oct;98(2):115099. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115099.

Collar GDS, Becker J, Moreira NK, Dornelles LS, Mott MP, Barth AL, Caierão J. Rapid colorimetric polymyxin B microelution directly from positive blood bottles: because patients with serious infections should not have to wait for results of culture-based methodologies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2024 Jul;43(7):1407-1417. doi: 10.1007/s10096-024-04846-3.

Cruz-López F, Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Maldonado-Garza HJ, Garza-González E. Efficacy and *In Vitro* Activity of Novel Antibiotics for Infections With Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 20;12:884365. doi: 10.3389/fcimb.2022.884365.

Dalmolin TV, Mazzetti A, Ávila H, Kranich J, Carneiro GIB, Arend LNVS, Becker GN, Ferreira KO, de Lima-Morales D, Barth AL, Pillonetto M. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Jan;96(1):114910. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910.

Dalmolin TV, de Lima-Morales D, Barth AL. Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? *J Infectiology*. 2018;1(2):16-22.

Dvoretckaia A, Egorova T, Dzhuzha A, Levit M, Sivtsov E, Demyanova E, Korzhikova-Vlakh E. Polymyxin B Conjugates with Bio-Inspired Synthetic Polymers of Different Nature. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 17;24(3):1832. doi: 10.3390/ijms24031832.

Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, Stump S, Lopez M, Macesic N, Uhlemann AC, Kohner P, Cole N, Simner PJ. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *J Clin Microbiol*. 2019 Oct 23;57(11):e01269-19. doi: 10.1128/JCM.01269-19.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO).ISO 20776-2:2021 - 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. Geneva: ISO, 2021.

Kansak N, Arici N, Uzunoner Y, Adaleti R, Aksaray S, Gonullu N. Evaluation of Broth Disk Elution Method to Determine Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains. Clin Lab. 2023 Feb 1;69(2). doi: 10.7754/Clin.Lab.2022.221008.

The Lancet. Antimicrobial resistance: time to repurpose the Global Fund. Lancet. 2022 Jan 22;399(10322):335. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00091-5.

Lee YL, Chen HM, Hii IM, Hsueh PR. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. Int J Antimicrob Agents. 2022 Feb;59(2):106528. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106528.

Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 2006 Sep;6(9):589-601. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70580-1.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 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. 2016 Feb;16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Llorente LI, Acero LA, Chamizo López FJ, Floren L. Evaluating the drop test method in measuring colistin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2022 Dec;71(12). doi: 10.1099/jmm.0.001628.

Loutet SA, Valvano MA. Extreme antimicrobial peptide and polymyxin B resistance in the genus *Burkholderia*. Front Cell Infect Microbiol. 2011 Jul 22;1:6. doi: 10.3389/fcimb.2011.00006.

Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, Paterson DL, Tam VH, Theuretzbacher U, Tsuji BT, Turnidge JD. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. Lancet Infect Dis. 2015 Feb;15(2):225-34. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70850-3.

Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2016 Jun;22(6):1038-43. doi: 10.3201/eid2206.151840.

O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Arch Pharm Pract.* 2016; 7(3):110.

Pasteran F, Danze D, Menocal A, Cabrera C, Castillo I, Albornoz E, Lucero C, Rapoport M, Ceriana P, Corso A. Simple Phenotypic Tests To Improve Accuracy in Screening Chromosomal and Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 2020 Dec 17;59(1):e01701-20. doi: 10.1128/JCM.01701-20.

Perez LRR, Carniel E, Narvaez GA, Dias CG. Evaluation of a polymyxin drop test for polymyxin resistance detection among non-fermentative Gram-negative rods and Enterobacterales resistant to carbapenems. *APMIS.* 2021 Mar;129(3):138-142. doi: 10.1111/apm.13096.

Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Apr;30(2):557-596. doi: 10.1128/CMR.00064-16.

Raro OHF, Collar GS, da Silva RMC, Vezzaro P, Mott MP, da Cunha GR, Riche CVW, Dias C, Caierão J. Performance of polymyxin B agar-based tests among carbapenem-resistant Enterobacterales. *Lett Appl Microbiol.* 2021 Jun;72(6):767-773. doi: 10.1111/lam.13467.

Rubens RS, Arruda ISA, Almeida RM, Nóbrega YKM, Carneiro MDS, Dalmolin TV. Challenges in the Detection of Polymyxin Resistance: From Today to the Future. *Microorganisms.* 2024 Jan 4;12(1):101. doi: 10.3390/microorganisms12010101.

Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, Campeau S, Kazmi AQ, Bell DT, Lewis S, Tamma PD, Humphries R, Hindler JA. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin *In Vitro* Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 2019 Jan 30;57(2):e01163-18. doi: 10.1128/JCM.01163-18.

Shinohara DR, de Carvalho NMM, Mattos MSF, Fedrigo NH, Mitsugui CS, Carrara-Marroni FE, Nishiyama SAB, Tognim MCB. Evaluation of phenotypic methods for detection of polymyxin B-resistant bacteria. *J Microbiol Methods.* 2022 Aug;199:106531. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106531.

Soman R, Bakthavatchalam YD, Nadarajan A, Dwarakanathan HT, Venkatasubramanian R, Veeraraghavan B. Is it time to move away from polymyxins?: evidence and alternatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Mar;40(3):461-475. doi: 10.1007/s10096-020-04053-w.

Tran TB, Velkov T, Nation RL, Forrest A, Tsuji BT, Bergen PJ, Li J. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Dec;48(6):592-597. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.010.

Trimble MJ, Mlynářčik P, Kolář M, Hancock RE. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Oct 3;6(10):a025288. doi: 10.1101/cshperspect.a025288.

Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem*. 2010 Mar 11;53(5):1898-916. doi: 10.1021/jm900999h.

World Health Organization (WHO). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021. Geneva: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>.

Yang F, Zhou Y, Bai Y, Pan X, Ha UH, Cheng Z, Wu W, Jin Y, Bai F. MvfR Controls Tolerance to Polymyxin B by Regulating *rfaD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Spectr*. 2023 Jun 15;11(3):e0042623. doi: 10.1128/spectrum.00426-23.

7. APÊNDICE

Apêndice 1. Resultados da microdiluição em caldo (teste de referência), *Ágar Spot* modificado, *Drop Test* modificado e Microeluição da polimixina B modificada.

Isolado Clínico	Espécie	Microdiluição em caldo/ Classificação	Ágar Spot/ Classificação	Drop Test/ Classificação	Microeluição Classificação
EC2	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC14	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC17	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC23	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC24	<i>E. coli</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
EC28	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC30	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC36	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC39	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC41	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC45	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC48	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC51	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC53	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC55	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC56	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC57	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC66	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC71	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC72	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC73	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC75	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC76	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC79	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC83	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC87	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC92	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC98	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC117	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC121	<i>E. coli</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
EC124	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC128	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC129	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC131	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC140	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC143	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S

EC144	<i>E. coli</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
EC189	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC203	<i>E. coli</i>	<0,125/S	≤2/S	≤2/S	S
EC212	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC216	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC224	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC258	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC275	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC278	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC281	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC283	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC284	<i>E. coli</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
EC287	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC289	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC291	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC295	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC296	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
EC297	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC318	<i>E. coli</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
EC323	<i>E. coli</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
KP2	<i>K. pneumoniae</i>	2/S	≤2/S	4/R	S
KP24	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
KP28	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
KP30	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
KP73	<i>K. pneumoniae</i>	>64/R	≥16/R	≥32/R	R
KP95	<i>K. pneumoniae</i>	<0,125/S	≤2/S	≤2/S	S
KP99	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
10P	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	8/R	8/R	R
12P	<i>K. pneumoniae</i>	16/R	≥16/R	16/R	R
14P	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
26P	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
27P	<i>K. oxytoca</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
28P	<i>C. freundii</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S

39P	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	S
48P	<i>K. pneumoniae</i>	2/S	≤2/S	≤2/S	S
54P	<i>S. marcescens</i>	>64/R	≥16/R	≥32/R	R
80P	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	≥16/R	≥32/R	R
90P	<i>E. coli</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
92P	<i>Enterobacter sp.</i>	4/R	4/R	16/R	R
5798	<i>E. coli</i>	4/R	8/R	≥32/R	R
242	<i>E. coli</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	S
3111	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	≥16/R	16/R	R
10418	KPC	>64/R	≥16/R	≥32/R	R
3431	<i>E. coli</i>	8/R	8/R	≥32/R	R
10422	KPC	1/S	≤2/S	≤2/S	S
283	<i>E. coli</i>	8/R	≥16/R	16/R	S
CD	<i>E. coli</i>	4/R	≥16/R	≥32/R	R
215	<i>E. coli</i>	16/R	8/R	≥32/R	S
10420	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
1	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
2	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	S
3	<i>K. oxytoca</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	S
4	<i>K. pneumoniae</i>	>64/R	≥16/R	≥32/R	R
5	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	R
6	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	≥16/R	≥32/R	R
8	<i>K. pneumoniae</i>	0,5/S	≤2/S	≤2/S	S
9	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	S
26	<i>K. pneumoniae</i>	2/S	≥16/R	≥32/R	S
28	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	4/R	S
33	<i>E. coli</i>	0,25/S	≤2/S	≤2/S	S
56	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	8/R	8/R	R

74	<i>K. pneumoniae</i>	8/R	≥16/R	≥32/R	R
81	<i>K. pneumoniae</i>	1/S	≤2/S	≤2/S	S
HU1	<i>K. pneumoniae</i>	16/R	≥16/R	≥32/R	R

S: Sensível; R: Resistente