

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Kharol Neves

**Avaliação de modificações em dois métodos fenotípicos com menor tempo de resposta para triagem da resistência às polimixinas em isolados clínicos de *Enterobacterales***

Florianópolis

2022

Kharol Neves

**Avaliação de modificações em dois métodos fenotípicos com menor tempo de resposta para triagem da resistência às polimixinas em isolados clínicos de *Enterobacterales***

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutico (a).

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Neves, Kharol

Avaliação de modificações em dois métodos fenotípicos com menor tempo de resposta para triagem da resistência às polimixinas em isolados clínicos de Enterobacterales / Kharol Neves ; orientadora, Jussara Kasuko Palmeiro, 2022. p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Polimixinas. 4. Método colorimétrico. 5. Método de eluição. I. Palmeiro, Jussara Kasuko. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Kharol Neves

**Avaliação de modificações em dois métodos fenotípicos com menor tempo de resposta para triagem da resistência às polimixinas em isolados clínicos de *Enterobacterales***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 08 de fevereiro de 2022.

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Liliete Canes de Souza  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Girardello  
Avaliadora  
Universidade São Francisco

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, familiares e amigos que me apoiaram ao longo da graduação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me manter no caminho certo durante toda trajetória, sempre me abençoando e proporcionando saúde, força, luz, sabedoria e serenidade para chegar ao final da jornada, satisfeita e feliz com minha escolha profissional.

À **Universidade Federal de Santa Catarina, mestres e funcionários**, agradeço o acolhimento, qualidade de ensino e experiências transmitidos à minha caminhada.

Aos meus pais, **Otávio e Carla**, meus grandes exemplos de vida, pelo amor incondicional, incentivo e apoio ao longo de toda minha vida.

Aos meus familiares: irmãs **Cheyenne e Mariana**, cunhados **Eduardo e Monick**, sobrinhas **Isabella e Maria Eduarda**, que sempre me escutaram, apoiaram e aconselharam, com alegria, amor, carinho e aconchego. Obrigada por sempre me arrancarem sorrisos e ser meu motivo de força e perseverança.

Aos meus avós: maternos, **Ivanda e Marcelino**, paternos, **Valdira e Arcanjo** (*in memoriam*), que com carinho, sempre demonstraram orgulho da pessoa e profissional que fui me tornando. Obrigado pelo exemplo de vida e amor incondicional. Vô Arcanjo, sei que onde estiver, está muito orgulhoso da sua “doutora”, como me chamava.

Ao meu namorado, **Vitor**, por compreender minha dedicação aos estudos, pelo amor, carinho e apoio nos momentos felizes e tristes ao longo de toda jornada. Você é meu porto seguro e grande incentivador.

Aos **amigos** que fiz durante a graduação e àqueles que estão comigo ao longo da vida, pela compreensão, apoio, risadas e momentos inesquecíveis. Vocês foram essenciais, tornando tudo mais leve e divertido.

À **Prof.<sup>a</sup> Dra. Marina Raijche Mattozo Rover (Mami)**, muito além de orientadora de estágio, foi grande inspiração, amiga, conselheira. Sempre disponível com carinho, apoio e sábios ensinamentos. Seus conselhos fizeram parte de meu amadurecimento acadêmico.

Aos membros do **Laboratório de Microbiologia** da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – ULAC/HU/UFSC/EBSERH, por todo o auxílio e disponibilidade ao longo da pesquisa e no decorrer do Trabalho de Conclusão de Curso.

Às **Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes, Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Girardello e Prof.<sup>a</sup> Dra. Thaís Cristine Marques Sincero**, por terem aceitado o convite para participar da Banca Avaliadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dra. Jussara Kasuko Palmeiro**, por ter confiado a mim este desafio e não poupou esforços para que esta pesquisa pudesse realizar-se, auxiliando de modo essencial no desenvolvimento prático e escrito deste. Além de professora e orientadora, tornou-se grande amiga, a quem agradeço pelas conversas, risadas e principalmente por suas experiências profissionais e pessoais compartilhadas comigo. Você tornou este trabalho mais leve e com certeza levarei seus conselhos por toda minha jornada pessoal e profissional.

## RESUMO

O surgimento de bacilos gram-negativos resistentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos tornou as polimixinas a última opção para o tratamento de infecção por bactérias multirresistentes. Com isso, altas taxas de mortalidade envolvendo bacilos gram-negativos resistentes às polimixinas são de grande preocupação para condutas terapêuticas e desafiadoras para a rotina dos laboratórios clínicos, devido à falta de acurácia dos testes de sensibilidade de mais fácil realização, como disco-difusão e fita de gradiente de concentração e à dificuldade na execução do método referência (microdiluição em caldo) conforme ISO 20776-1. A proposta deste trabalho foi avaliar modificações em protocolos de dois métodos colorimétricos para triagem de resistência às polimixinas em isolados clínicos de *Enterobacterales* e comparar com o método referência. Os métodos avaliados foram os testes rápidos *Andrade Screening Antimicrobial Test* e Polimixina NP (*Nordmann-Poirel*). As modificações foram realizadas no protocolo de preparo, na composição da solução aquosa e na incorporação dos antimicrobianos. Os testes foram denominados como *Andrade Screening Antimicrobial Test Modificado* (ASAT-M) e POLI-NP-MOD, nos quais foram testados polimixinas B e colistina. Ao total, 149 isolados bacterianos foram testados. O coeficiente Kappa mostrou uma concordância categórica de 0,77 para o teste rápido ASAT-M com colistina e 0,80 com polimixina B. Já o teste rápido POLI-NP-MOD mostrou uma concordância categórica de 0,89 tanto para polimixina B quanto para colistina. ASAT-M com colistina e com polimixina B demonstraram *very major error* (VME) elevados de 25% e 19,23%, respectivamente. Para POLI-NP-MOD os resultados de VME foram de 13% para polimixina B e colistina. ASAT-M apresentou *major error* (ME) de 2,06% e 3,09% para colistina e polimixina B, respectivamente, enquanto POLI-NP-MOD não apresentou ME. Embora os testes tenham apresentado valores de VME inadequados, se mostraram de preparo fácil e barato, além de fornecerem resposta em poucas horas, reduzindo o tempo necessário para detectar isolados resistentes às polimixinas de 20 horas para 4 horas. Esses resultados sugerem uma aplicabilidade útil e viável dos testes colorimétricos ASAT-M e POLI-NP-MOD para triagem de resistência às polimixinas na rotina clínica laboratorial, sendo necessário a confirmação com o método referência em isolados considerados sensíveis na triagem com estes testes rápidos.

**Palavras-chave:** Método colorimétrico. Método de eluição. *Enterobacterales*. Microdiluição em caldo.



## ABSTRACT

The emergence of gram-negative bacilli resistant to aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams made polymyxins the last option for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria. Thus, high mortality rates involving polymyxin-resistant gram-negative bacilli are of great concern for therapeutic approaches and are challenging for the routine of clinical laboratories, due to the lack of accuracy of the sensitivity tests that are easier to perform, such as disk diffusion and concentration gradient tape and the difficulty in performing the reference method (broth microdilution) according to ISO 20776-1. The purpose of this work was to evaluate modifications in protocols of two colorimetric methods for screening for resistance to polymyxins in clinical isolates of *Enterobacterales*, compared with the reference method. The methods evaluated were the rapid tests *Andrade Screening Antimicrobial Test* and Polymyxin NP (*Nordmann-Poirel*). Modifications were carried out in the preparation protocol, in the composition of the aqueous solution, and the incorporation of antimicrobials into the test. Polymyxins B and colistin were tested. The tests were called Modified Andrade Screening Antimicrobial Test (ASAT-M) and POLI-NP-MOD, in which polymyxins B and colistin were tested. A total of 149 bacterial isolates were tested. The Kappa coefficient showed a categorical agreement of 0.77 for the ASAT-M rapid test with colistin and 0.80 with polymyxin B. The POLI-NP-MOD rapid test showed a categorical agreement of 0.89 for both polymyxin B and colistin. ASAT-M with colistin and with polymyxin B demonstrated elevated very major error (VME) of 25% and 19.23%, respectively. For POLI-NP-MOD, the VME results were 13% for polymyxin B and colistin. ASAT-M obtained ME of 2.06% and 3.09% for colistin and polymyxin B, respectively, while POLI-NP-MOD showed no ME. Although the tests showed inadequate VME values, they proved to be easy and inexpensive to prepare, in addition to providing a response within a few hours, reducing the time needed to detect polymyxin-resistant isolates from 20 hours to 4 hours. The results suggest useful and viable applicability of the ASAT-M and POLI-NP-MOD colorimetric tests for screening for polymyxin resistance in the clinical laboratory routine, requiring confirmation with the reference method in cases of isolates considered susceptible in the screening with these rapid colorimetric tests.

**Keywords:** Colorimetric method. Elution method. *Enterobacterales*. Broth microdilution.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação da estrutura químicas das polimixinas B e E (colistina) ..... 14
- Figura 2** - Representação esquemática dos mecanismos de resistência às polimixinas identificados em diferentes espécies bacterianas..... 15

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |   |
|-------------|---|
| ANVISA      | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                          |
| ASAT        | <i>Andrade Screening Antimicrobial Test</i>                       |
| ASAT-M      | <i>Andrade Screening Antimicrobial Test</i> modificado            |
| CIM         | Concentração inibitória mínima                                    |
| CLSI        | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>                |
| EUCAST      | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| KPC         | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase                        |
| OMS         | Organização Mundial da Saúde                                      |
| POLI-NP     | Polimixina NP [Nordmann/Poirel]                                   |
| POLI-NP-MOD | Polimixina NP [Nordmann/Poirel] modificado                        |
| RAM         | Resistência antimicrobiana  |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                | <b>13</b> |
| <b>2</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>                         | <b>19</b> |
| <b>3</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                       | <b>39</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                | <b>40</b> |
|          | <b>APÊNDICE A - FIGURAS COMPLEMENTARES.....</b>        | <b>44</b> |
|          | <b>APÊNDICE B - TABELA COM RESULTADOS OBTIDOS.....</b> | <b>49</b> |
|          | <b>ANEXO – PARECER GEP .....</b>                       | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma problemática urgente na saúde pública global. É um fenômeno natural, que atualmente está se disseminando rapidamente pelo uso inadequado e em larga escala de antimicrobianos em humanos, animais e no meio ambiente. No ano de 2019, foram estimadas 4,97 milhões de mortes por infecções associadas a patógenos resistentes aos antimicrobianos no mundo. Dessas, 1,27 milhão de mortes foram diretamente atribuídas a RAM (MURRAY *et al.*, 2022). Sem intervenção, estima-se que serão anualmente 10 milhões de mortes até 2050, com um custo global associado de \$100 trilhões (O'NEILL, 2016). Tendo em vista este cenário, em 2019 a resistência aos antimicrobianos foi listada como uma das dez principais ameaças à saúde mundial (WHO, 2019), estando entre os 46 indicadores listados como prioridade do 13º Programa Geral de Trabalho da OMS (Organização Mundial da Saúde) (WHO, 2020).

Dentre os microrganismos envolvidos nessa problemática, destaca-se o grupo denominado ESKAPE, acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, o qual ocupou as posições criticamente e altamente prioritárias na lista global de bactérias resistentes aos antimicrobianos para investigação de novos medicamentos, publicada em 2017 pela OMS (WHO, 2017). Infecções causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes (enterobactérias, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*) são responsáveis por altas taxas de mortalidade e têm sido causa de vários surtos hospitalares (AIRES *et al.*, 2017; CRONIN *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; LEUNG *et al.*, 2017; MAIDA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

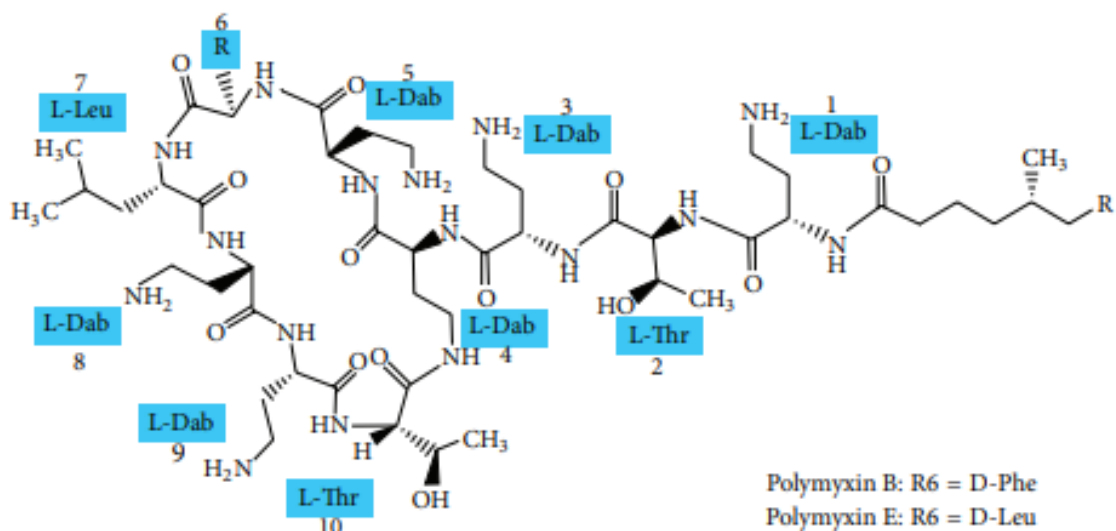
A indústria farmacêutica ao longo do tempo tem desenvolvido novos antimicrobianos, principalmente para tratar infecções por bactérias multirresistentes. Alguns desses novos antimicrobianos foram liberados para uso clínico no Brasil, como ceftarolina, ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam, entretanto, isolados resistentes já foram identificados nacionalmente (SHIRLEY, 2018; SORIANO *et al.*, 2021; VAN DUIN, BONOMO, 2016; VIDAILLAC *et al.*, 2009). Além disso, entre os novos antimicrobianos liberados, ceftazidima-avibactam não têm atividade contra *A. baumannii* produtores de OXA-23, que apresentam fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, bem como enterobactérias e *P. aeruginosa* produtores de metalo-beta-lactamases (ALAMRI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*,

2018). Sendo assim, as polimixinas continuam sendo importantes opções terapêuticas, não podendo ser substituídas até o momento.

No Brasil, a partir de 2009, com a disseminação endêmica em diversos hospitais de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, as polimixinas passaram a ser uma das únicas opções terapêuticas contra esses isolados (MONTEIRO *et al.*, 2009). Nesse panorama, com o crescente uso do antimicrobiano, embora ainda possua boa atividade, tem-se observado aumento nas taxas de resistência ao longo dos anos, principalmente em enterobactérias (BRAUN *et al.*, 2018; GALES, JONES, SADER, 2011; ROSSI *et al.*, 2017; SADER, FARRELL, JONES, 2011).

As polimixinas, utilizadas na prática clínica nas formas de polimixina B e E (essa última também chamada de colistina), são antimicrobianos polipeptídicos que tiveram sua atividade contra bactérias gram-negativas reconhecidas pela primeira vez na década de 1940 (SATLIN *et al.*, 2019). Descobertos em 1947, são considerados metabólitos do microrganismo de solo *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2018). A principal diferença entre as polimixinas B e E está relacionada às estruturas químicas, mais precisamente na alteração de um único aminoácido na posição 6, D-Leucina na molécula de colistina e D-Fenilalanina na molécula de polimixina B (BERGEN *et al.*, 2006) (Figura 1). A molécula de polimixina consiste em uma cadeia lateral de ácidos graxos ligada a um anel peptídico policatiônico composto de dez aminoácidos.

**Figura 1** - Representação da estrutura química das polimixinas B e E (colistina)

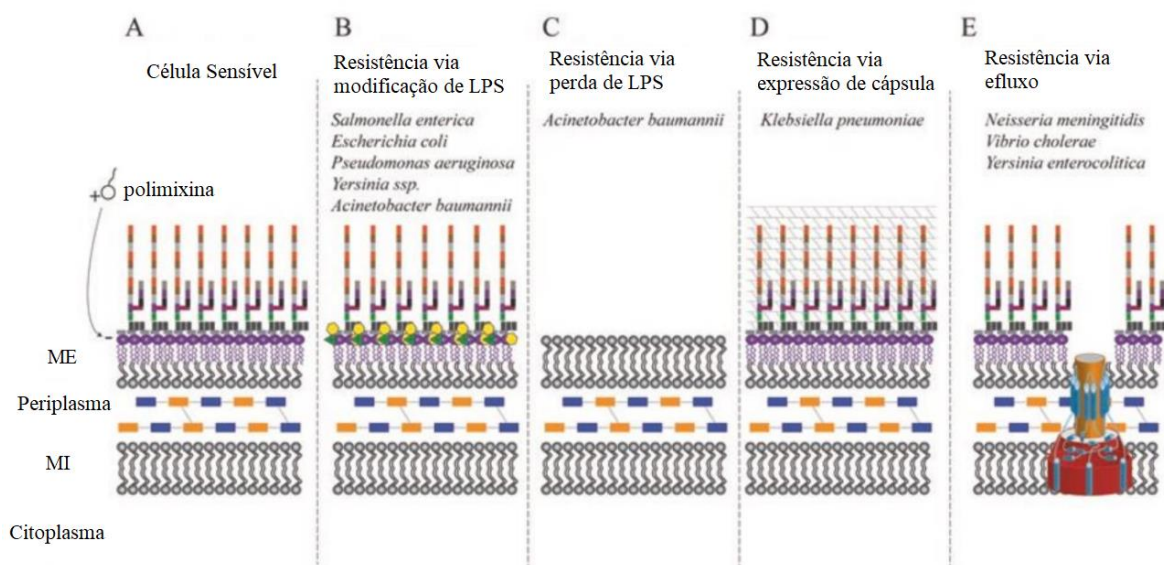


Fonte: Zhiliang Yu et al. (2015)

A característica catiônica das polimixinas faz com que esse fármaco possua alta afinidade por superfícies de carga negativa, como o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa bacteriana. Os antimicrobianos dessa classe irão agir na membrana celular externa da parede celular bacteriana, deslocando os íons de cálcio e magnésio que estabilizam o LPS, promovendo o aumento da permeabilidade celular à polimixina. Logo após, esses fármacos interagem da mesma forma com a membrana interna da célula, promovendo a liberação dos componentes celulares e levando à morte celular bacteriana (HANCOCK, 1997).

Os mecanismos de resistência às polimixinas ainda não estão totalmente elucidados. Até o momento, diversos genes e sistemas regulatórios têm sido descritos como causadores de resistência às polimixinas (Figura 2).

**Figura 2** - Representação esquemática dos mecanismos de resistência às polimixinas identificados em diferentes espécies bacterianas



Legenda: (A) Célula sensível mostrando a membrana interna - IM, externa - OM e a camada de peptidoglicano (retângulos laranja e azul) no periplasma. O lipopolissacarídeo (LPS) que forma a camada externa da célula Gram negativa é carregado negativamente e é o alvo de ligação inicial da polimixina carregada positivamente; (B) Resistência via modificação do LPS, pela adição de L-Ara4N (hexágonos amarelos), PEtn (triângulos verdes) e/ou galactosamina, além de alterações nas cadeias de ácidos graxos, relacionada às espécies bacterianas listadas na imagem; (C) Resistência via perda completa do LPS, relacionada com *Acinetobacter baumannii*; (D) Resistência via aumento da expressão de cápsula, visualizada em *Klebsiella pneumoniae*; (E) Resistência via expressão de um sistema de efluxo, visualizado nas espécies bacterianas listadas na imagem.

Fonte: Tradução e adaptação de MOFFATT, J. H.; HARPER, M.; BOYCE, J. D. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, p. 55-71 (2019).

Em geral, a maioria dos mecanismos promove uma alteração na superfície celular bacteriana, geralmente por (i) alteração do lipídeo A do LPS bacteriano por adição de 4-amino-4deoxi-L-arabinose (L-Ara4N), fosfoetanolamina (pEtN) e/ou galactosamina (BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2018), (ii) perda total do LPS (MOFFATT *et al.*, 2010) ou (iii) hiperprodução de cápsula (POIREL, JAYOL, NORDMANN, 2017), resultando na redução da afinidade da superfície celular pelo fármaco. No entanto, episódios de falha terapêutica com polimixinas têm sido observados em infecções por microrganismos que ainda não têm o mecanismo de resistência conhecido (GIRARDELLO *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016; ZAVASCKI *et al.*, 2018). Em 2016, Liu *et al.* (2016) descobriu um gene mediado por plasmídeo denominado *mcr-1*, envolvido com resistência às polimixinas. O gene *mcr-1* codifica para a enzima fosfoetanolamina transferase, a qual é responsável pela adição de uma molécula de fosfoetanolamina ao lipídeo A do LPS bacteriano (LIU *et al.*, 2016).

Ampliando essa problemática, vem sendo observado uma grande dificuldade na execução e falta de acurácia dos testes de sensibilidade utilizados no laboratório clínico, quando se trata de polimixinas (BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2018; GIRARDELLO *et al.*, 2018). Conforme descrito por Ezadi, Ardebili e Mirnejad (2018) em seu estudo, devido ao uso clínico crescente, a otimização e padronização dos testes de sensibilidade à polimixina *in vitro*, assim como a definição dos pontos de corte corretos pelos laboratórios, são necessidades urgentes na rotina (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2018).

Vários estudos que avaliaram o desempenho de métodos para teste de sensibilidade à polimixina obtiveram resultados divergentes. Ezadi *et al.* (2018) listaram como dificuldades a natureza catiônica das polimixinas, o desenvolvimento de heteroresistência, a difusão em ágar dificultada (levando a altas taxas de falsa-sensibilidade) (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017) e a interpretação do resultado em casos de isolados com concentração inibitória mínima próxima do ponto de corte (entre 2-4 µg/mL), nos quais os critérios interpretativos (sensibilidade ou resistência) ficam incertos (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2018).

O método de disco difusão, muito utilizado para outros antimicrobianos, não apresenta bom desempenho para determinação da sensibilidade às polimixinas, assim como o método da fita de gradiente de concentração, sendo o uso desses métodos reprovado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (CLSI, 2017; EUCAST, 2016; LESHABA, MBELLE, OSEI, 2021). Dessa forma, o único método recomendado para o teste de sensibilidade às polimixinas é a



microdiluição em caldo conforme padrão ISO-20776-1 (BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2018; LESHABA, MBELLE, OSEI, 2021).

Embora a microdiluição em caldo seja atualmente o método referência devido à reprodutibilidade e confiabilidade, o preparo é muito trabalhoso e dispendioso, considerando a rotina dos laboratórios clínicos. Além disso, foram evidenciados alguns problemas técnicos de execução, como a aderência das polimixinas às placas de plástico, levando à diminuição da concentração do antimicrobiano presente no meio. Embora a adição de um surfactante, como o polissorbato 80 (P-80), limite a adesão do antimicrobiano aos painéis de microdiluição, seu uso foi abandonado por ter demonstrado efeito sinérgico com as polimixinas (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2018).

Já existem painéis não-automatizados baseados em microdiluição em caldo disponíveis comercialmente, porém ainda apresentam um custo muito elevado, não sendo possível sua aquisição pela grande maioria dos laboratórios no Brasil. Segundo informação extraída dos registros da ANVISA, até 2021, foram aprovados para uso o teste comercial Policimbac® (Probac do Brasil) e o teste CIM (concentração inibitória mínima) de Polimixina B da Laborclin, ambos com poucos estudos de sua performance laboratorial, como o realizado por Dalmolin *et al.* (2020). Os autores desse estudo mostraram que, apesar da boa concordância categórica (100%), observaram uma tendência do teste Policimbac® superestimar a CIM em comparação com o método de referência, assim como uma concordância absoluta bem abaixo do esperado, demonstrando uma possível falsa-resistência (DALMOLIN *et al.*, 2020).

Ao considerar testes com menor tempo de resposta, os testes rápidos colorimétricos, como o Polimixina NP [Nordmann/Poirel] (POLI-NP) (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016) e o *Andrade Screening Antimicrobial Test* (ASAT) (RODRIGUEZ *et al.*, 2019) foram desenvolvidos como testes de triagem, porém ainda são recentes e possuem poucos estudos que detalham sua acurácia. Nesses testes, a detecção (ou ausência) do crescimento bacteriano em meio com polimixina é baseada no metabolismo de carboidratos na presença de um indicador de pH. Estudos prévios que avaliaram o teste rápido POLI-NP demonstraram excelente detecção de resistência às polimixinas, com sensibilidade e especificidade de 100% e 95,9%, respectivamente (YAINOY *et al.* 2018), inclusive com bons resultados quando empregado diretamente em hemoculturas (JAYOL *et al.*, 2016; MALLI *et al.*, 2019). Já o teste rápido ASAT alcançou valores de sensibilidade e especificidade de 90,7% e 100%, respectivamente (RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

Considerando o aumento do uso e as dificuldades de execução do método referência para determinar a sensibilidade às polimixinas, torna-se interessante o desenvolvimento e validação de testes de triagem para a rotina do laboratório clínico. A proposta deste trabalho foi avaliar modificações nos protocolos dos métodos colorimétricos ASAT e Polimixina NP (Nordmann-Poirel) para triagem de resistência às polimixinas em isolados clínicos de *Enterobacterales* e comparar com o método referência. Com o intuito de buscar testes alternativos à microdiluição em caldo que apresentem um menor tempo de resposta e preparo, além de baixo custo com insumos.

## **2 ARTIGO CIENTÍFICO**

Este trabalho foi apresentado na forma de artigo com intuito de publicação no periódico internacional *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (DMID), fator de impacto 2.803, QUALIS CAPES 2019, A3.

1 **Title**

2 Performance of rapid colorimetric methods for detection of polymyxin resistance in  
3 carbapenem-resistant *Enterobacterales*

4

5 **Authors**

6 Kharol Neves<sup>a</sup>, Mara Cristina Scheffer<sup>b</sup>, Thaís Cristine Marques Sincero<sup>c</sup>, Jussara Kasuko  
7 Palmeiro<sup>c, #</sup>

8

9 **Affiliations**

10 <sup>a</sup> Curso de graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,  
11 Santa Catarina, Brazil

12 <sup>b</sup> Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, Universidade Federal de Santa  
13 Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

14 <sup>c</sup> Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina  
15 (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

16

17 **#Address correspondence to:**

18 Jussara Kasuko Palmeiro. Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde,  
19 Universidade Federal de Santa Catarina. Rua, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

20 Tel. 55 (48) 37213467; Email: jussara.kasuko@ufsc.br; jukasuko@gmail.com

21

22 **Running title:** Detection of polymyxin resistance in *Enterobacterales*

23

24 **Abstract**

25 This study aimed to evaluate modifications in protocols of two colorimetric methods for  
26 screening resistance to polymyxins in *Enterobacterales* and to compare with the reference  
27 method. For this, in the rapid test Andrade Screening Antimicrobial Test Modified (ASAT-M)  
28 the form of sterilization of its glucose solution had adaptations, while the rapid test Polymyxin  
29 NP (Nordmann-Poirel) Modified, in this work called POLI-NP-MOD, was adapted with  
30 changes in the pH indicator used and some components incorporated from a known  
31 colorimetric method for detecting resistance to carbapenemases, Blue-Carba. Both methods  
32 had adaptations in the form of antimicrobial incorporation and were tested for both  
33 polymyxins B and colistin. In total, 149 bacterial isolates were used. The Kappa coefficient  
34 showed a categorical agreement of 0.77 for the ASAT-M rapid test with colistin and 0.80 with  
35 polymyxin B. The POLI-NP-MOD rapid test showed a categorical agreement of 0.89 for both  
36 polymyxins B and colistin. ASAT-M with colistin and with polymyxin B demonstrated a  
37 VME of 25% and 19.23%, respectively. For POLI-NP-MOD, the VME results were 13% for  
38 polymyxin B and colistin. ASAT-M obtained ME of 2.06% and 3.09% for colistin and  
39 polymyxin B, respectively, while POLI-NP-MOD showed no ME. Both tests have the  
40 advantages of being quick, easy, and cheap to prepare, in addition to the response in a few  
41 hours, reducing the time needed to detect polymyxin-resistant isolates from 20 hours to 4  
42 hours. Taken together, the results suggest useful and viable applicability of the ASAT and  
43 Poly NP colorimetric tests for screening for polymyxin resistance in the clinical laboratory  
44 routine, requiring confirmation with the reference method in cases of isolates considered  
45 susceptible in the screening with the rapid colorimetric tests.

46

47 **Keywords:** Colorimetric method. Elution method. *Enterobacterales*. Broth microdilution.

## 48 1. Introduction

49

50 Antimicrobial resistance (AMR) is an urgent issue in global public health. In 2019,  
51 an estimated 4.97 million deaths from infections associated with antimicrobial-resistant  
52 pathogens were estimated worldwide. Of these, 1.27 million deaths were directly attributed to  
53 AMR (MURRAY *et al.*, 2022). Infections caused by multiresistant gram-negative bacilli are  
54 responsible for high mortality rates and have been the cause of several hospital outbreaks  
55 (AIRES *et al.*, 2017; CRONIN *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; LEUNG *et al.*, 2017; MAIDA  
56 *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). With the increasing use of the polymyxins as the last  
57 therapeutic options, although there is still good activity, an increase in resistance rates has  
58 been observed over the years, especially in *Enterobacterales* (BRAUN *et al.*, 2018; GALES,  
59 JONES, SADER, 2011; ROSSI *et al.*, 2017; SADER, FARRELL, JONES, 2011).

60 Extending this problem, it has been observed a great difficulty in the execution and  
61 lack of accuracy of the sensitivity tests used in the clinical laboratory, when it comes to  
62 polymyxins (BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2018; GIRARDELLO *et al.*, 2018). Recently  
63 CLSI and EUCAST concluded that the only recommended technique for testing sensitivity to  
64 polymyxins is broth microdilution (BMD) (BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2018;  
65 LESHABA, MBELLE, OSEI, 2021). However, it is a laborious and time-consuming method,  
66 which makes its use in laboratory routine difficult (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2018).

67 When considering tests with a shorter response time, rapid colorimetric tests were  
68 developed, such as the Poli NP [Nordmann/Poirel] (Polymyxin-NP) (NORDMANN; JAYOL;  
69 POIREL, 2016) and the Andrade Screening Antimicrobial Test (ASAT) (RODRIGUEZ *et al.*,  
70 2019). The objective of this study was to evaluate the performance of these two rapid  
71 colorimetric tests for screening resistance to polymyxins with protocol modifications. The  
72 results obtained through modified ASAT (ASAT-M) and modified Polymyxin-NP (POLI-NP-

73 MOD) were compared with the standard broth microdilution method to identify a more  
74 interesting test for application in laboratory routine. These methods allow results at least 16  
75 hours before conventional ones, in addition to the low cost and fast preparation.

## 76 2. Methods

77

### 78 *Bacterial Isolates*

79 All isolates were collected from the collection of microorganisms from the  
80 Microbiology sector of the Clinical Analysis Laboratory Unit (ULAC) of the University  
81 Hospital Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), located in the city of  
82 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. A collection of selected 149 non-duplicated isolates of  
83 *Enterobacterales*: *Klebsiella pneumoniae* (76), *Enterobacter cloacae* complex (31),  
84 *Escherichia coli* (22), *Enterobacter amnigenus* (1), *Citrobacter freundii* (6), *Klebsiella*  
85 *aerogenes* (5), *Klebsiella oxytoca* (1), *Klebsiella* spp. (2) and *Citrobacter* spp. (4) were  
86 chosen for this article.

87

### 88 *Bacterial inoculum preparation*

89 The isolates from the ULAC collection of microorganisms are stored in cryotubes in  
90 a freezer at -80°C. To use them, for each isolate, a metal loop was passed through the ice of  
91 the cryotube and grooved on a plate containing chocolate agar (CA). After incubating for 18  
92 to 24 hours at 37°C, cultures were subcultured on tryptic soy agar (TSA), to avoid interfering  
93 with the colorimetric tests. The plate was incubated for 20 hours at 37°C. The way of  
94 inoculation of each test will be explained in each method described later.

95

### 96 *Broth Microdilution Method*

97 MICs for polymyxin B were determined by broth microdilution (reference method).  
98 The method was performed for all isolates as a reference method in 96-well polystyrene  
99 plates, following ISO 20776-1 procedure, using cation-adjusted Mueller-Hinton broth (Sigma-  
100 Aldrich) and polymyxin B sulfate salt (Sigma-Aldrich) (CLSI, 2006).



101 MIC was defined as the lowest concentration of antimicrobial capable of inhibiting  
102 bacterial growth, through visual inspection. Isolates were considered susceptible when MICs  
103 were  $\leq 2$  mg/mL and resistant when MICs were  $> 2$  mg/mL (BRCAST, 2021).

104

#### 105 *Andrade Screening Antimicrobial Test Modified*

106 The Andrade Screening Antimicrobial Test (ASAT) is a colorimetric test for  
107 detecting colistin resistance in Enterobacterales (LESHABA; MBELLE; OSEI, 2021). ASAT  
108 was performed according to Rodrigues et al. (2019), with modifications. To solve this method  
109 in-house, peptone, NaCl, meat extract, and Andrade indicator were used, as described in the  
110 protocol. Furthermore, the protocol determines the preparation of a glucose stock solution in  
111 sterile distilled water, adding 1 mL of chloroform to every 10 mL of solution. It must be left  
112 to rest for five days before use and stored at room temperature (RODRIGUEZ *et al.*, 2019). In  
113 this adaptation, the glucose stock solution with a final concentration of 10% was sterilized  
114 using filtration with a 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore filter in a sterile container, instead of using  
115 chloroform for sterilization. Therefore, the solution does not need to stand for days and there  
116 is no risk of handling chloroform in the laboratory.

117 Colistin and Polymyxin B were added to the Andrade solution through disk-elution,  
118 according to methods performed by Dalmolin *et al.* (2020) and Simner *et al.* (2019). Colistin  
119 discs (10  $\mu\text{g}$ , Oxoid) and polymyxin B discs (300.000 UI, Cecon) were added to the solutions  
120 and incubated at 37°C for 30 minutes for colistin and polymyxin elutions. Four concentrations  
121 were prepared in Andrade solution for colistin and polymyxin: tube 1 (without discs), tube 2  
122 (colistin with a final concentration of 2  $\mu\text{g/ml}$ ), tube 3 (colistin with a final concentration of 4  
123  $\mu\text{g/ml}$ ) and tube 4 (colistin with a final concentration of 8  $\mu\text{g/mL}$ ).

124 The inoculation was done in the same way as the protocol of Rodriguez *et al.* (2019),  
125 where the test result was considered positive when the solution turned a magenta color,

126 revealing the same color as the positive control tube, that is, with bacterial growth (tube  
127 without colistin and with bacteria), indicating growth in the presence of colistin (resistant  
128 isolate), while the test result was negative when the solution remained light pink (susceptible  
129 isolate), revealing the same color as the negative control well (Figure 1a) (RODRIGUEZ *et*  
130 *al.*, 2019).

131

### 132 *Rapid Polymyxin NP [Nordmann-Poirel] Test Modified*

133 The Rapid Polymyxin NP (Polymyxin-NP) colorimetric method (NORDMANN;  
134 JAYOL; POIREL, 2016) has its principle the glucose metabolization and consequently  
135 production of acidic components, with a pH indicator, enabling the visualization of the color  
136 change (SADEK *et al.*, 2020). The POLI-NP-MOD was performed according to Nordmann,  
137 Jayol, and Poirel (2016), with modifications.

138 In this adaptation, the colorimetric solution was prepared with CAMHB,  
139 bromothymol blue, ZnSO<sub>4</sub>, and a glucose solution, with pH adjustment to 7.0. The principle  
140 of this adaptation is the fact that bromothymol blue presents a turning zone between 6.2 and  
141 7.6, being closer to the pH of the equivalence point expected in the metabolism of glucose  
142 (production of weak and strong acids), than phenol red (6.8 to 8.4). The closer to the pH at the  
143 equivalence point the color change occurs, the more accurate will be the determination of the  
144 endpoint (MATOS, 2016). In addition, bromothymol blue is the pH indicator present in one of  
145 the main methods of characterization of glucose metabolism, the glucose  
146 oxidation/fermentation (OF) broth, and is used in the same way in the Blue-Carba  
147 colorimetric test (SATTLER, J., BRUNKE, A., HAMPRECHT A., 2021; PIRES *et al.*, 2013).

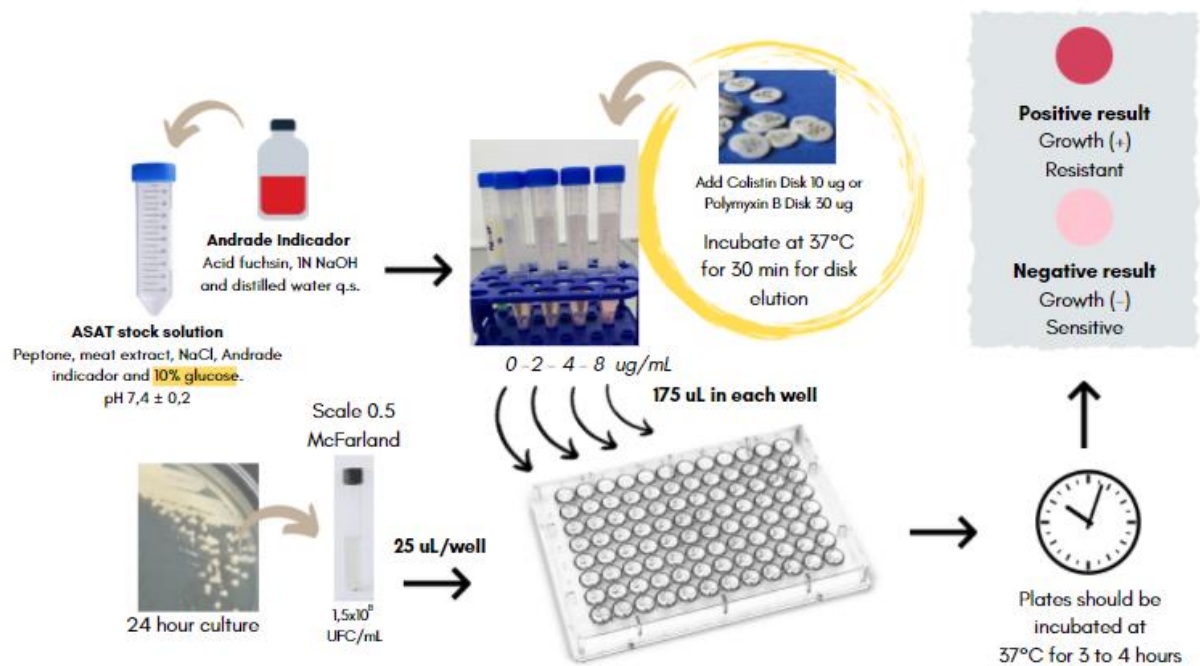
148 Also, in this modification, colistin and polymyxin B were added to the colorimetric  
149 solution by disk-elution, in the same way as described above for the ASAT method.

150 The inoculation was done in the same way as the study of Nordmann; Jayol; Poirel  
 151 (2016), where the test result was considered positive when the solution turned a yellow color,  
 152 revealing the same color as the positive control tube, that is, with bacterial growth (tube  
 153 without colistin and with bacteria), indicating growth in the presence of colistin (resistant  
 154 isolate), while the test result was negative when the solution remained green (susceptible  
 155 isolate), revealing the same color as the negative control well (Figure 1b) (NORDMANN;  
 156 JAYOL; POIREL, 2016).

157

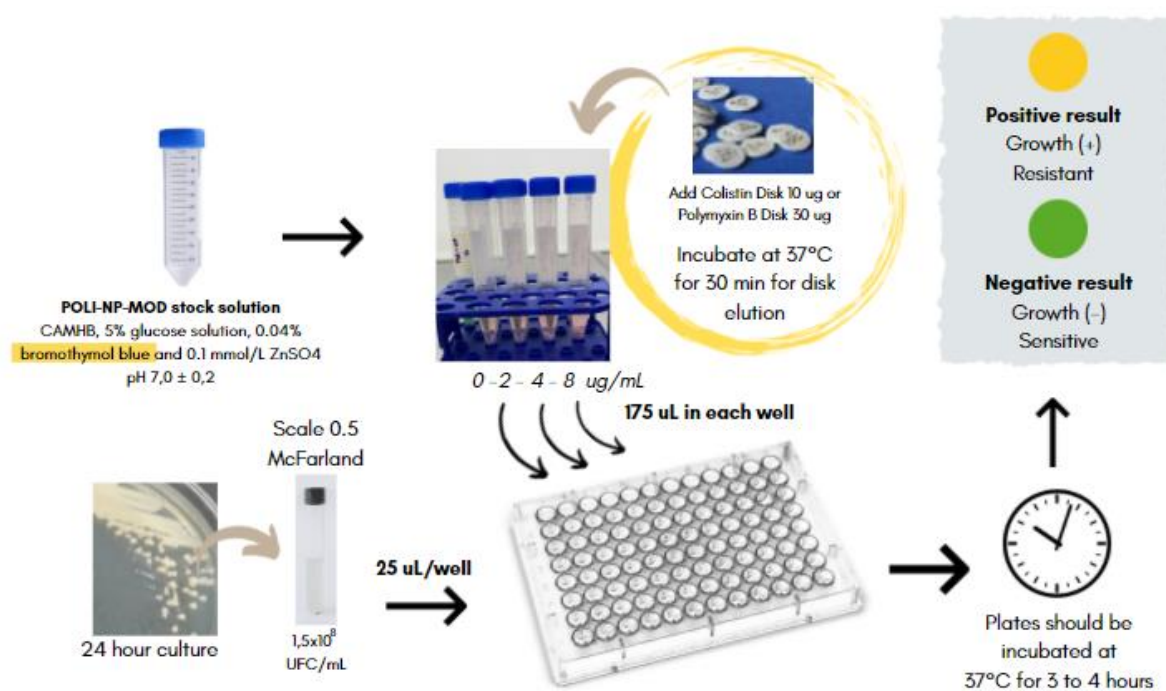
158 **Figure 1.** Illustrative representation of the ASAT-M and POLI-NP-MOD methodologies

159 **A. ASAT-M**



160

161 **B. POLI-NP-MOD**



162  
163

164 For all tests, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
165 strains were used as quality control, as recommended by the Brazilian Committee for  
166 Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Furthermore, *Escherichia coli* strains that  
167 produce *mcr-1.1* (ZAMPARETTE *et al.*, 2020) were also used, representing isolates with a  
168 resistant cut-off point, but low MIC, and *K. pneumoniae*, which presents the *mgrB* gene  
169 truncated by insertion sequence (*KpC9*) (PALMEIRO *et al.*, 2019), representing isolates with  
170 resistant cut-off and high MIC.

171

### 172 *Statistical analysis*

173 The results of the BMD reference method were compared with the results obtained  
174 for ASAT-M and POLI-NP-MOD. Errors were identified and calculated as follows: very  
175 major error (VME) defined by isolates categorized as susceptible using the rapid tests but  
176 resistant by the BMD reference method (false-susceptibility result), and major error (ME)  
177 defined by isolates categorized as resistant using the rapid tests but susceptible by the BMD

178 reference method (false-resistant result) (JAYOL *et al.*, 2018). Diagnostic sensitivity and  
179 specificity were calculated using data plotted in Excel spreadsheets.

180 The measurement of the agreement for categorical data was performed using the  
181 *Kappa coefficient of agreement*. The Kappa coefficient measures agreement in addition to  
182 causality. It varies from 0 (zero), when there is no agreement beyond what was expected, to 1  
183 (one) when there is perfect agreement. Taking BMD as a reference, kappa statistics were used  
184 to answer whether there is an agreement between sensitivity or resistance between standard  
185 and test methods (LANDIS, J.R.; KOCH, G.G., 1977). These values and confidence intervals  
186 were calculated using a calculator available on the internet (<http://vassarstats.net/>).

187

### 188 **3. Results**

189 Polymyxin B reference MICs were determined for 149 Gram-negative bacteria using  
190 broth microdilution and compared to the two colorimetric tests ASAT-M and POLI-NP-  
191 MOD. Of these strains, 52 strains exhibited polymyxin resistance (*Klebsiella pneumoniae*,  
192 n=38; *Enterobacter cloacae* complex, n=6; *Klebsiella aerogenes*, n=3; *Escherichia coli*, n=2;  
193 *Enterobacter amnigenus*, n=1; *Citrobacter freundii*, n=1; *Klebsiella oxytoca*, n=1). In the  
194 tests, the sensitivity profile was analyzed in concentrations of polymyxin B and Colistin. In  
195 both colorimetric tests, the optimal interpretation of positive results (antimicrobial-resistant  
196 isolates) was possible after 4 hours. Performance characteristics to polymyxin B and colistin  
197 between ASAT-M, POLI-NP-MOD, and BMD method for 149 isolates tested were showed in  
198 table 1.

199 Considering an analysis performed, all methods showed a similar *agreement Kappa*  
200 coefficient compared with BMD. The ASAT-M method obtained kappa values of 0.77 (95%  
201 confidence interval [95CI], 0.657 to 0.877) and 0.80 (95CI 0.699 to 0.904) for colistin and

202 polymyxin B, respectively, is considered a substantial agreement according to the  
 203 classification defined by Landis, J. R.; Koch, G. G. (1977).

204

205 **Table 1.** Comparison of performance characteristics to polymyxin B and colistin between  
 206 ASAT-M, POLI-NP-MOD, and BMD method for 149 isolates tested

| Method                     | Number of isolates |            | Kappa Agreement<br>(95CI) | VME (%)    | ME (%)   |
|----------------------------|--------------------|------------|---------------------------|------------|----------|
|                            | R (%)              | S (%)      |                           |            |          |
| Broth microdilution*       | 52 (34,9)          | 97 (65,1)  | -                         | -          | -        |
| ASAT-M<br>Colistin         | 41 (27,5)          | 108 (72,5) | 0,77 (0.657-0.877)        | 13 (25)    | 2 (2,06) |
| ASAT-M<br>Polymyxin B      | 44 (29,5)          | 105 (70,5) | 0.80 (0.699-0.904)        | 10 (19,23) | 3 (3,09) |
| POLI-NP-MOD<br>Colistin    | 45 (30,2)          | 104 (69,8) | 0,89 (0.817-0.97)         | 7 (13)     | 0 (0)    |
| POLI-NP-MOD<br>Polymyxin B | 45 (30,2)          | 104 (69,8) | 0,89 (0.817-0.97)         | 7 (13)     | 0 (0)    |

207 \* Reference method.

208 Legend: R, resistant; S, susceptible.

209

210 The ASAT-M-Colistin method had a sensitivity of 95% and a specificity of 88%  
 211 while the ASAT-M-Polymyxin B method had a sensitivity of 93% and a specificity of 90%.  
 212 For the POLI-NP-MOD method, the kappa value of 0.89 (95CI 0.817 to 0.97) was obtained,  
 213 both for colistin and polymyxin B, being classified as almost perfect. The sensitivity and  
 214 specificity obtained were 100% and 93%, respectively.

215

#### 216 4. Discussion

217 With the increasing number of infections cases caused by Gram-negative bacteria  
 218 with high resistance to antimicrobials, polymyxin has been used as one of the last therapeutic  
 219 alternatives. This has led to increased use and, unfortunately, increasing rates of polymyxin  
 220 resistance (LI *et al.*, 2019). Given this situation, it is essential to improve and develop  
 221 methods of sensitivity to polymyxins with a quick and safe response.

222 A good categorical agreement allows screening of the bacteria's sensitivity profile  
223 and definition of a more certain path in search of the correct antibiotic therapy for the patient.  
224 From this point, the categorical agreement between screening methods and the standard  
225 method is as essential for polymyxins as it is for many other antimicrobial agents.

226 From the calculated Kappa values between the tests, we can see that the agreement  
227 was better for the POLI-NP-MOD test than for the ASAT-M test, when compared to the  
228 standard method. Furthermore, the ASAT-M method has a very major error (VME) and major  
229 error (ME) more pronounced than the modified POLI-NP-MOD method, which did not  
230 demonstrate ME (Table 1). The tests detection was better for colistin-resistant isolates (MICs  
231  $>2$  mg/L) than for isolates that lacked colistin resistance mechanisms (MICs  $\leq 2$  mg/L).

232 In this point, some problems of false sensitivity were detected (VME with such high  
233 values are considered unacceptable) and, in the ASAT-M method, some cases of false  
234 resistance, which need to be considered when analyzing a result of these tests individually,  
235 without the presence of the standard method. Even though there was a good agreement  
236 between POLI-NP-MOD and BMD, which can be seen positively and further studies can be  
237 done to improve this method.

238 For POLI-NP-MOD, of the concordant results for resistance, the vast majority (80-  
239 85%, approximately) had the highest MIC of the standard method related to the highest MIC  
240 of the test method. In the other values, the MIC did not coincide but remained in the same  
241 resistance classification. With the results obtained, it is possible to consider the option of  
242 making the method even more practical and instead of testing 4 concentrations, testing only  
243 for the concentration of 2 ug/mL, the sensitivity cut-off point established by BrCAST.

244 In this study, were evaluated two colorimetric tests, both based on the visualization  
245 of glucose metabolism through a pH indicator. Although they have the same principle, each

246 one has particularities in their preparation that set them apart and can be key points in the use  
247 in a laboratory routine.

248         The fact that the ASAT-M method requires one more step in its process preparation  
249 (filtration of acid fuchsin to produce the indicator) makes it slightly more laborious than the  
250 POLI-NP-MOD method, which only consists of adding all the materials in CAMHB.

251         Regarding the preparation of the broth used for each of the methods, something that  
252 was observed equally for both was approximate stability of 6 months at -20°C. This allows for  
253 a greater quantity of broth to be produced at longer intervals of time.

254         Finally, an important point to consider is the differences in agreement between tests  
255 containing polymyxin B and tests containing colistin, with the standard method. In POLI-NP-  
256 MOD it did not show, however in the ASAT-M test we see a difference between the  
257 concordances of ASAT-M-Colistin and ASAT-M-Polymyxin B. Many authors have already  
258 written about the difficulty in using colistin in vitro tests (HUMPHRIES R. M., 2015;  
259 MATUSCHEK *et al.*, 2018; SADER *et al.*, 2012), and the discussion about the existence of  
260 differences between colistin and polymyxin B is also widely commented. Some authors have  
261 already demonstrated that MICs of Colistin and Polymyxin B are similar, but not identical.  
262 According to some authors, between these two antimicrobials of the same class, there may be  
263 differences in  $\pm 1$  dilution. This difference can lead to VME, ME, and, not so far, a therapeutic  
264 failure (CHEW *et al.*, 2017; CIELO *et al.*, 2020; SADER *et al.*, 2015).

265         In this study, all tests were performed with daily broth microdilution and quality  
266 control. All tests were performed on the same day, with the same inoculum suspension, to  
267 avoid possible limitations. A limitation of this study is the fact that the principle of  
268 colorimetry of evaluated tests involves glucose metabolism and it is not possible to test non-  
269 fermenting Gram Negatives.



270 In conclusion, even though the high VME and ME presented by ASAT-M and POLI-  
271 NP-MOD methods, the tests show a good agreement. Gathering the results, it appears that the  
272 isolates considered resistant by the method are resistant, being viable for resistance screening.  
273 However, results considered susceptible are not reliable and need to be confirmed by the  
274 reference method. The results of this study indicate that the colorimetric tests can be easily  
275 implemented in a routine microbiology laboratory, as an initial screening test, being a quick  
276 and simple method of preparation, with low-cost inputs an optimal response in 4 hours.  
277 However, further studies are needed to improve the test, to understand more deeply the lack of  
278 agreement, to understand the resistance mechanisms detected by the test and the cases that  
279 were not detected.

280

#### 281 **Author's contributions**

282 KN and JKP conceived the project. KN performed the analyses and wrote the original draft  
283 preparation. KN and JKP edited and reviewed the final manuscript. JKP supervised and  
284 managed the project. All authors have read and agreed to the published version of the  
285 manuscript.

286

#### 287 **Declaration of competing interest**

288 The authors have no conflicts of interest to disclose.

289

#### 290 **References**

291 AIRES, C. A. M. *et al.* Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-  
292 producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to ceftazidime-avibactam  
293 isolated in Brazil. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 89, n. 4, p.  
294 324-327, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.017>.

- 295 BAKTHAVATCHALAM, Y. D. et al. Polymyxin susceptibility testing, interpretative  
296 breakpoints and resistance mechanisms: An update. *Journal Of Global Antimicrobial*  
297 *Resistance*, [S.L.], v. 12, p. 124-136, mar. 2018. Elsevier BV.  
298 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>.
- 299 BRAUN, G. et al. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae*  
300 clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *Int J*  
301 *Antimicrob Agents*, v. 51, n. 3, p. 522-527, 2018.
- 302 BRCAS. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.  
303 **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST**, v. 11, p. 91,  
304 2021.
- 305 CHEW, K. L. *et al.* Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-  
306 Resistant and mcr -Positive Enterobacteriaceae: comparison of sensititre, microscan, vitek 2,  
307 and etest with broth microdilution. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 9, p.  
308 2609-2616, set. 2017. American Society for Microbiology.  
309 <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00268-17>.
- 310 CIELO, N. C. *et al.* Polymyxin B broth disk elution: a feasible and accurate methodology to  
311 determine polymyxin B susceptibility in Enterobacterales. **Diagnostic Microbiology and**  
312 **Infectious Disease**, v. 98, n. 2, 1 out. 2020.
- 313 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). ISO 20776-1:2006 -  
314 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial  
315 susceptibility test devices. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2006.
- 316 CRONIN, K. M. *et al.* Risk factors for KPC-producing Enterobacteriaceae acquisition and  
317 infection in a healthcare setting with possible local transmission: a case-control study. **J Hosp**  
318 **Infect**, v. 96, n. 2, p. 111-115, 2017.

- 319 EZADI, Fereshteh; ARDEBILI, Abdollah; MIRNEJAD, Reza. Antimicrobial Susceptibility  
320 Testing for Polymyxins: challenges, issues, and recommendations. **Journal Of Clinical**  
321 **Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 1-20, 12 dez. 2018. American Society for Microbiology.  
322 <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01390-18>.
- 323 GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and  
324 polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the  
325 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **J Antimicrob Chemother**, v. 66,  
326 n. 9, p. 2070-4, 2011.
- 327 GIRARDELLO, R. et al. Polymyxins susceptibility tests: we need talk about a solution.  
328 **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 94, n. 1, p. 103, 2018.
- 329 HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418-22, 1997.
- 330 HUMPHRIES, R.M. Susceptibility Testing of the Polymyxins: where are we  
331 now?. **Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 22-27, 20 out. 2014. Wiley.  
332 <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1505>.
- 333 JAYOL, A. et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the  
334 detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and**  
335 **Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 90–94, 1 out. 2018.
- 336 KIM, J. O. et al. Outbreak of KPC-2-producing Enterobacteriaceae caused by clonal  
337 dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST307 carrying an IncX3-type plasmid harboring a  
338 truncated Tn4401a. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease*, [S.L.], v. 87, n. 4, p.  
339 343-348, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.012>.
- 340 LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical  
341 Data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159–174, mar. 1977. <https://doi.org/10.2307/2529310>.

- 342 LESHABA, T. M. S.; MBELLE, N. M.; OSEI SEKYERE, J. Current and emerging  
343 polymyxin resistance diagnostics: a systematic review of established and novel detection  
344 methods. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.
- 345 LEUNG, L. M. et al. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing  
346 *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 11, p. 3035-3042, 2017.
- 347 LI, Z. et al. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? **Open Forum Infectious**  
348 **Diseases**, v. 6, n. 10, p. ofz368, 1 out. 2019.
- 349 MAIDA, C. M. *et al.* Outbreak of ST395 KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a  
350 Neonatal Intensive Care Unit in Palermo, Italy. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 39, n. 4,  
351 p. 496-498, 2018.
- 352 MATOS, M. A. C. **Titulação Ácido-Base**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de  
353 Fora, 2016. 10 slides, color. Disciplina de Introdução a Análise Química.
- 354 MATUSCHEK, E. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven  
355 commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*,  
356 *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. **Clinical**  
357 **Microbiology and Infection**, v. 24, n. 8, p. 865–870, 1 ago. 2018.
- 358 MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in  
359 Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.
- 360 MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a  
361 systematic analysis. **The Lancet**, [S.L.], p. 1-27, jan. 2022. Elsevier BV.  
362 [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).
- 363 NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in  
364 Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 1038-1043, jun.  
365 2016. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).  
366 <http://dx.doi.org/10.3201/eid2206.151840>.

- 367 PALMEIRO, J. K. et al. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella*  
368 pneumoniae Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n.  
369 July, p. 1–11, 2019.
- 370 PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Bluecarba, an easy biochemical test for detection of  
371 diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of clinical**  
372 **microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281–3, 1 dez. 2013.
- 373 RODRIGUEZ, C. H. *et al.* In-house rapid colorimetric method for detection of colistin  
374 resistance in Enterobacterales: A significant impact on resistance rates. **Journal of**  
375 **Chemotherapy**, v. 31, n. 7–8, p. 432–435, 2019.
- 376 ROSSI, F. *et al.* Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of  
377 Sao Paulo, Brazil, over five years. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 98-101, 2017.
- 378 SADEK, M. *et al.* Rapid Polymyxin/Pseudomonas NP test for rapid detection of polymyxin  
379 susceptibility/resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Clinical**  
380 **Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 1657–1662, 2020.
- 381 SADER H. S. *et al.* Differences in potency and categorical agreement between colistin and  
382 polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. **Diagnostic**  
383 **Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 83, n. 4, p. 379-381, dez. 2015. Elsevier  
384 BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.013>.
- 385 SADER H. S. *et al.* Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing  
386 results for polymyxin B and colistin. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**,  
387 [S.L.], v. 74, n. 4, p. 412-414, dez. 2012. Elsevier BV.  
388 <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.025>.
- 389 SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; JONES, R. N. Susceptibility of *Klebsiella* spp. to colistin  
390 and polymyxin B: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-  
391 2009). **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 2, p. 174-5, 2011.

- 392 SATTLER, J.; BRUNKE, A.; HAMPRECHT, A. Systematic Comparison of Three  
393 Commercially Available Combination Disc Tests and the Zinc-Supplemented Carbapenem  
394 Inactivation Method (zCIM) for Carbapenemase Detection in Enterobacterales  
395 Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 1-13, 18 ago. 2021.  
396 American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03140-20>
- 397 SILVA, K. E. *et al.* A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter*  
398 *baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. **Plos One**,  
399 [S.L.], v. 13, n. 12, p. 209-367, 28 dez. 2018. Public Library of Science (PLoS).  
400 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0209367>
- 401 ZAMPARETTE, C. P. *et al.* IncX4 Plasmid-Mediated mcr-1.1 in Polymyxin-Resistant  
402 *Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. **Microbial drug**  
403 **resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 26, n. 11, p. 1326–1333, 2020.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes colorimétricos foram capazes de detectar com ótima resposta a resistência da grande maioria dos isolados bacterianos testados, com leituras ótimas 4 horas após incubação, ou seja, em torno de 16 horas antes do método referência. Aplicado a uma rotina hospitalar, esses resultados permitem a possibilidade de uma triagem com os testes colorimétricos a fim de reduzir o volume de trabalho ao realizar a microdiluição em caldo, além de adiantar a tomada de decisão para antibioticoterapia, o que torna este trabalho ainda mais favorável pois, para pacientes críticos, o tempo é critério importantíssimo para melhor prognóstico.

Este estudo indicou que dos testes colorimétricos em análise – ASAT-M e POLI-NP-MOD – POLI-NP-MOD apresentou resultados de melhor performance laboratorial, melhor concordância e menor presença de erros em relação ao teste ASAT-M, podendo ser facilmente adaptado e implementado a rotina de um laboratório de microbiologia, exigindo materiais simples, já disponíveis no laboratório, assim como um curto tempo de preparo associado a uma fácil produção, tendo como ponto crucial seu potencial de resposta em um curto período de tempo em relação ao método.

Em relação aos casos de falsa-sensibilidade e alto VME, serão necessários mais estudos e confirmação de alguns resultados para compreender o que pode estar envolvido, aprimorar os testes e diminuir esses erros.

## REFERÊNCIAS

AIRES, C. A. M. *et al.* Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to ceftazidime-avibactam isolated in Brazil. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 89, n. 4, p. 324-327, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.017>.

ALAMRI, A. M. *et al.* Molecular Surveillance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 335-342, 12 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01836-z>.

BAKTHAVATCHALAM, Y. D. *et al.* Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, [S.L.], v. 12, p. 124-136, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>.

BERGEN, P. J. *et al.* Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 6, p. 1953-8, 2006.

BRAUN, G. *et al.* Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, n. 3, p. 522-527, 2018.

BRCAS. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST, v. 11, p. 91, 2021.

CHEW, K. L. *et al.* Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr -Positive Enterobacteriaceae: comparison of sensititre, microscan, vitek 2, and etest with broth microdilution. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 9, p. 2609-2616, set. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00268-17>.

CIELO, N. C. *et al.* Polymyxin B broth disk elution: a feasible and accurate methodology to determine polymyxin B susceptibility in Enterobacterales. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 98, n. 2, 1 out. 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). ISO 20776-1:2006 - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100. 27th Edition. CLSI, Wayne, PA, 2017.

CRONIN, K. M. *et al.* Risk factors for KPC-producing Enterobacteriaceae acquisition and infection in a healthcare setting with possible local transmission: a case-control study. **Journal Of Hospital Infection**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 111-115, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2017.02.010>.



DALMOLIN, T.V. *et al.* Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. **Brazilian Journal Of Microbiology**, Porto Alegre, n. 51, p. 1135-1137, mar. 2020.

EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E): As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. Disponível em: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf).

EZADI, F.; ARDEBILI, A.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: challenges, issues, and recommendations. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 1-20, 12 dez. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01390-18>.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 2070-4, 2011.

GIRARDELLO, R. *et al.* Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 87, n. 1, p. 37-44, 2017.

GIRARDELLO, R. *et al.* Polymyxins susceptibility tests: we need talk about a solution. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 94, n. 1, p. 103, 2018.

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418-22, 1997.

HUMPHRIES, Romney M.. Susceptibility Testing of the Polymyxins: where are we now?. **Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 22-27, 20 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1505>.

JAYOL, A. *et al.* Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 90–94, 1 out. 2018.

KIM, J. O. *et al.* Outbreak of KPC-2-producing Enterobacteriaceae caused by clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST307 carrying an IncX3-type plasmid harboring a truncated Tn4401a. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 87, n. 4, p. 343-348, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.012>.

LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n.1, p. 159–174, 1977. <https://doi.org/10.2307/2529310>.

LEE, J. Y. *et al.* Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 1, p. 609-12, 2016.

LESHABA, T. M. S.; MBELLE, N. M.; OSEI S. J. Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: a systematic review of established and novel detection methods. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

LEUNG, L. M. *et al.* Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 11, p. 3035-3042, 2017.

LI, Z. *et al.* Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 368, 1 out. 2019.

LIU, Y. Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 161-8, 2016.

MAIDA, C. M. *et al.* Outbreak of ST395 KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Palermo, Italy. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 39, n. 4, p. 496-498, 2018.

MALLI, E., *et al.* Implementation of the Rapid Polymyxin NP test directly to positive blood cultures bottles. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 95, n 4, 114889. 2019.

MATOS, M. A. C. Titulação Ácido-Base. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016. 10 slides, color. Disciplina de Introdução a Análise Química.

MOFFATT, J. H. *et al.* Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 4971-7, 2010.

MONTEIRO, J. *et al.* First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 333-334, jan. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00736-08>.

MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [S.L.], p. 1-27, jan. 2022. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 1038-1043, jun. 2016. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2206.151840>.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, London, UK, v. 1, p. 84, 2016.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Rev**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

RODRIGUEZ, C. H. *et al.* In-house rapid colorimetric method for detection of colistin resistance in Enterobacterales: A significant impact on resistance rates. **Journal of Chemotherapy**, v. 31, n. 7-8, p. 432-435, 2019.

ROSSI, F. *et al.* Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of Sao Paulo, Brazil, over five years. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 98-101, 2017.

SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; JONES, R. N. Susceptibility of *Klebsiella* spp. to colistin and polymyxin B: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-2009). **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 2, p. 174-5, 2011.

SATLIN, M. J. *et al.* Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Position Statements on Polymyxin B and Colistin Clinical Breakpoints. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 9, p. E523–E529, 1 nov. 2020.

SHIRLEY, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 78, n. 6, p. 675-692, 2018.

SILVA, K. E. *et al.* A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 209-367, 28 dez. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0209367>.

SORIANO, A. *et al.* Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Serious Gram-Negative Infections with Limited Treatment Options: A Systematic Literature Review. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 4, p. 1989–2034, 2021.

VAN DUIN, D.; BONOMO, R. A. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation beta-Lactam/beta-Lactamase Inhibitor Combinations. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 2, p. 234-41, 2016.

VIDAILLAC, C. *et al.* In vitro activity of ceftaroline alone and in combination against clinical isolates of resistant gram-negative pathogens, including beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2360 -2366, 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.01452-08>.

WHO. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf).

WHO. World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.

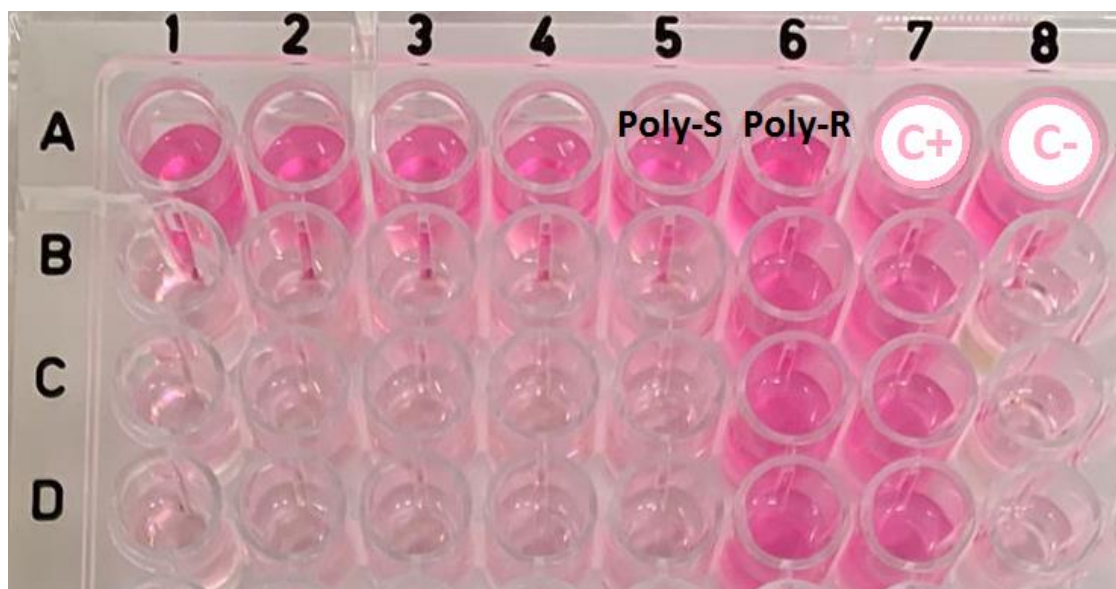
WHO. World Health Organization. Thirteenth General Programme of Work (GPW13): Methods for impact measurement. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: [https://www.who.int/publications/m/item/thirteenth-general-programme-of-work-\(gpw13\)-methods-for-impact-measurement](https://www.who.int/publications/m/item/thirteenth-general-programme-of-work-(gpw13)-methods-for-impact-measurement).

YAINOY, S. *et al.* Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test for detection of colistin susceptibility in Enterobacteriaceae isolated from Thai patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 92, n. 2, p. 102-106, 2018.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 90, n. 2, p. 134-138, 2018.

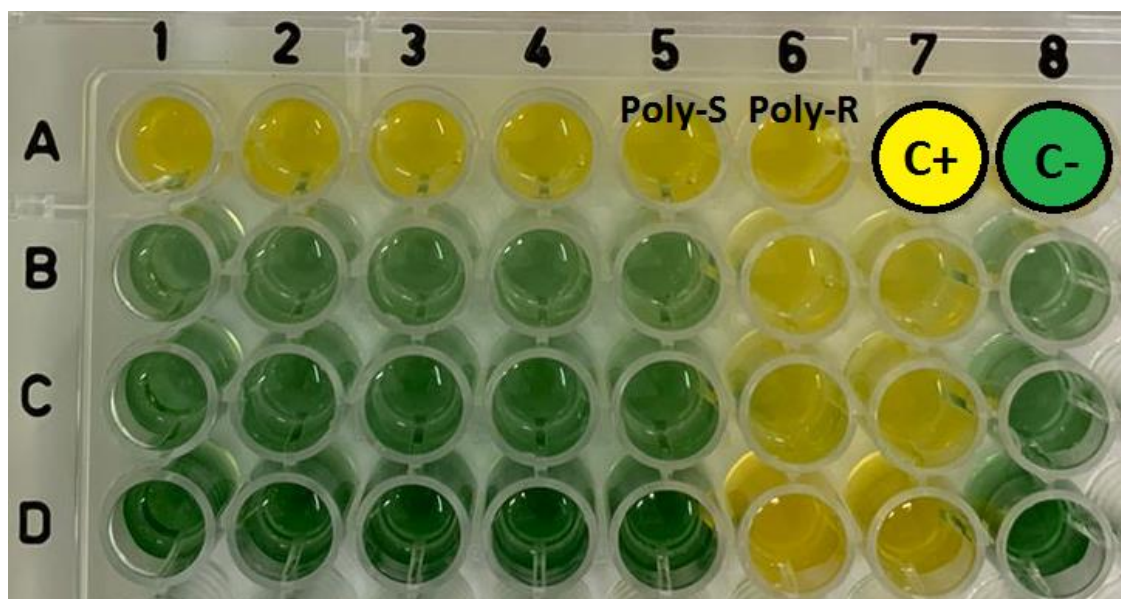
## APÊNDICE A - FIGURAS COMPLEMENTARES

**Figura 3.** Representação dos resultados de detecção de resistência à polimixina pelo método colorimétrico ASAT-M.



Legenda: C-, controle negativo (Solução ASAT-M), correspondente à coluna 8; C+, controle positivo (sem antimicrobiano), correspondente à linha A; Poli-R, isolado resistente a polimixina/colistina, coluna 6; Poli-S, isolado sensível a polimixina/colistina, coluna 5.

**Figura 4.** Representação dos resultados de detecção de resistência à polimixina usando o método colorimétrico de teste rápido POLI-NP-MOD.



Legenda: C-, controle negativo (Solução POLI-NP-MOD), correspondente à coluna 8; C+, controle positivo (sem antimicrobiano), correspondente à linha A; Poli-R, isolado resistente a polimixina/colistina, coluna 6; Poli-S, isolado sensível a polimixina/colistina, coluna 5.

**Figura 5.** Concordância Kappa obtida para o método ASAT com colistina em comparação com método padrão (BMD)

**A. Matriz de entrada de dados da Concordância Kappa**

|        |   | B    |      |      |      |      |      |      |      | Totals |
|--------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
|        |   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |        |
| A      | 1 | 39   | 13   | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 52     |
|        | 2 | 2    | 95   | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 97     |
|        | 3 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 5 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 6 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 7 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
| Totals |   | 41   | 108  | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 149    |

Legenda: 1, Resistência; 2, Sensibilidade; A, Microdiluição em Caldo; B, ASAT-M com colistina. Os números correspondem ao número de isolados que tiveram a classificação determinada para cada quadrante.

**B. Resultados Concordância Kappa**

| Unweighted Kappa         |  |                         |             |
|--------------------------|--|-------------------------|-------------|
| Observed Kappa           | Standard Error   | .95 Confidence Interval |             |
| 0.767                    |  | Lower Limit             | Upper Limit |
| <a href="#">Method 1</a> | 0.057  | 0.6552                  | 0.8788      |
| <a href="#">Method 2</a> | 0.0561   | 0.657                   | 0.877       |
| 0.8291                   | maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies |                         |             |
| 0.9251                   | observed as proportion of maximum possible                                 |                         |             |

Legenda: Método 1, Microdiluição em caldo; Método 2, ASAT-M com colistina.

**Figura 6.** Concordância Kappa obtida para o método ASAT com polimixina B em comparação com método padrão (BMD)

**A. Matriz de entrada de dados da Concordância Kappa**

|        |   | B    |      |      |      |      |      |      |      | Totals |
|--------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
|        |   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |        |
| A      | 1 | 42   | 10   | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 52     |
|        | 2 | 3    | 94   | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 97     |
|        | 3 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 5 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 6 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 7 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
| Totals |   | 45   | 104  | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 149    |

Legenda: 1, Resistência; 2, Sensibilidade; A, Microdiluição em Caldo; B, ASAT-M com polimixina B. Os números correspondem ao número de isolados que tiveram a classificação determinada para cada quadrante.

**B. Resultados Concordância Kappa**

| Unweighted Kappa |  |                         |             |
|------------------|--|-------------------------|-------------|
| Observed Kappa   | Standard Error   | .95 Confidence Interval |             |
| 0.8018           |  | Lower Limit             | Upper Limit |
| <u>Method 1</u>  | 0.0525   | 0.6989                  | 0.9047      |
| <u>Method 2</u>  | 0.0521   | 0.6996                  | 0.904       |
| 0.8933           | maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies |                         |             |
| 0.8976           | observed as proportion of maximum possible                                 |                         |             |

Legenda: Método 1, Microdiluição em caldo; Método 2, ASAT-M com polimixina B.

**Figura 7.** Concordância Kappa obtida para o método POLI-NP-MOD com colistina e polimixina B em comparação com método padrão (BMD)

**A. Matriz de entrada de dados da Concordância Kappa**

|        |   | B    |      |      |      |      |      |      |      | Totals |
|--------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
|        |   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |        |
| A      | 1 | 45   | 7    | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 52     |
|        | 2 | 0    | 97   | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 97     |
|        | 3 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 5 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 6 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 7 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
|        | 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ----   |
| Totals |   | 45   | 104  | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 149    |

Legenda: 1, Resistência; 2, Sensibilidade; A, Microdiluição em Caldo; B, POLI-NP-MOD. Os números correspondem ao número de isolados que tiveram a classificação determinada para cada quadrante.

**B. Resultados Concordância Kappa**

| Unweighted Kappa |  |                         |             |
|------------------|--|-------------------------|-------------|
| Observed Kappa   | Standard Error   | .95 Confidence Interval |             |
| 0.8933           |  | Lower Limit             | Upper Limit |
| Method 1         | 0.0394   | 0.8161                  | 0.9705      |
| Method 2         | 0.0391   | 0.8166                  | 0.97        |
| 0.8933           | maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies |                         |             |
| 1                | observed as proportion of maximum possible                                 |                         |             |

Legenda: Método 1, Microdiluição em caldo; Método 2, POLI-NP-MOD.



## APÊNDICE B - TABELA COM RESULTADOS OBTIDOS

**Tabela 1.** Resultados obtidos dos métodos colorimétricos ASAT-M e POLI-NP-MOD em comparação com a microdiluição em caldo

| Isolados             | MIC BMD<br>(ug/mL) | Interpretação dos resultados (R/S) |                     |                        |                              |                                 |
|----------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
|                      |                    | BMD                                | ASAT-M<br>Colistina | ASAT-M<br>Polimixina B | POLI-NP-<br>MOD<br>Colistina | POLI-NP-<br>MOD<br>Polimixina B |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,5                | S                                  | R                   | R                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>E. coli</i>       | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. cloacae</i>    | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. cloacae</i>    | 0,125              | S                                  | R                   | R                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,25               | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | < 0,006            | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,25               | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. coli</i>       | < 0,006            | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | < 0,006            | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 16                 | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. cloacae</i>    | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>E. cloacae</i>    | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 16                 | R                                  | R                   | R                      | R                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,25               | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,25               | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. cloacae</i>    | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. oxytoca</i>    | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | > 32               | R                                  | R                   | R                      | R                            | R                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0,5                | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. coli</i>       | 0,5                | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. coli</i>       | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |
| <i>E. cloacae</i>    | 0,125              | S                                  | S                   | S                      | S                            | S                               |

|                                 |         |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|---------|---|---|---|---|---|
| <i>E. coli</i>                  | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>               | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>                  | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>                  | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. aerogenes</i>             | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. aerogenes</i>             | 16      | R | S | S | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>            | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>                  | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i>                  | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,12    | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter youngae</i>      | 0,5     | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i>                  | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>               | 0,12    | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>                  | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>               | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>                  | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter spp.</i>         | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. oxytoca</i>               | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i>                  | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>            | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>                  | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | 0,125   | S | S | S | S | S |

|                             |         |   |   |   |   |   |
|-----------------------------|---------|---|---|---|---|---|
| <i>K. pneumoniae</i>        | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. amnigenus</i> sp.     | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i>              | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>              | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter freundii</i> | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i>              | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 16      | R | S | S | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | S | S | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 16      | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | S | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | S | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 16      | R | S | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>              | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>Citrobacter spp.</i>     | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 8       | R | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i>              | 8       | R | S | S | S | R |
| <i>K. aerogenes</i>         | > 32    | R | S | R | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | R | S | S |

|                             |         |   |   |   |   |   |
|-----------------------------|---------|---|---|---|---|---|
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>Klebsiella spp.</i>      | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>Klebsiella spp.</i>      | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>              | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>K. aerogenes</i>         | 8       | R | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>K. aerogenes</i>         | 2       | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 32      | R | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>              | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,5     | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,125   | S | S | S | S | S |
| <i>E. cloacae</i>           | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>Citrobacter freundii</i> | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>E. cloacae</i>           | 0,25    | S | S | S | S | S |
| <i>E. coli</i>              | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | < 0,006 | S | S | S | S | S |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 32      | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | R | R | R | R |
| <i>K. pneumoniae</i>        | > 32    | R | S | S | R | R |

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima; BMD, microdiluição em caldo (padrão); R, isolado resistente; S, isolado sensível.



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Rua Profa. Maria Flora Pausewang, s/nº - Bairro Trindade  
Florianópolis-SC, CEP 88036-800  
- <http://hu-ufsc.ebserh.gov.br>

Despacho - SEI

Processo nº 23820.008573/2021-66

Interessado: Kharol Neves

Venho por meio deste divulgar parecer **favorável** a Solicitação de desenvolvimento de pesquisa na Unidade de Laboratório de Análises Clínicas/HU/UFSC/EBSEH do Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação de métodos fenotípicos para triagem da resistência às polimixinas**”, registrado na Gerência de Ensino e Pesquisa desta instituição sob protocolo **1010/2021**.

O projeto de pesquisa não prevê custos diretos à Unidade de Laboratório de Análises Clínicas.

Os detalhes da pesquisa deverão ser discutidos entre o pesquisador e o setor de Microbiologia da ULAC.



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Quadros Mademann, Técnico(a) em Análises Clínicas**, em 26/10/2021, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexsandro Rafael Beseke, Chefe de Unidade**, em 26/10/2021, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ebserh.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ebserh.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **17167802** e o código CRC **6D5F695A**.

**Referência:** Processo nº 23820.008573/2021-66 SEI nº 17167802