

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

Enaira Jaques Menegaz

**Avaliação de modificações no teste colorimétrico Poli-NP para triagem da resistência às  
polimixinas em isolados de *Enterobacterales***

Florianópolis

2022

Enaira Jaques Menegaz

**Avaliação de modificações no teste colorimétrico Poli-NP para triagem da resistência às polimixinas em isolados 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 obtenção do título de Farmacêutico(a).

Orientadora: Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro.

Florianópolis

2022

Enaira Jaques Menegaz

**Avaliação de modificações no teste colorimétrico Poli-NP para triagem da resistência às polimixinas em isolados 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, 13 de dezembro 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

---

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

---

Prof<sup>o</sup>. Marcos José Machado  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Menegaz, Enaira Jaques

Avaliação de modificações no teste colorimétrico Poli-NP para triagem da resistência às polimixinas em isolados de Enterobacteriales / Enaira Jaques Menegaz ; orientador, Jussara Kasuko Palmeiro, 2022.

44 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. Enterobacteriales. 3. Método de eluição. 4. Teste colorimétrico. 5. Teste Rápido de Polimixina NP. I. Palmeiro, Jussara Kasuko. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

*Este trabalho é dedicado à minha família, amigos e todas as pessoas que me apoiaram ao longo da graduação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a mim mesma por ter determinação e não ter desistido do meu sonho de me formar uma profissional farmacêutica, e por sempre entregar o melhor de mim em todas as etapas dessa jornada acadêmica, finalizando-a com sentimentos de gratidão e satisfação.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela oportunidade de fazer parte de uma das melhores universidades federais do país, e aos mestres e funcionários, pelo acolhimento, dedicação, qualidade de ensino e por todos os momentos e experiências obtidos nessa trajetória.

À minha mãe, Marli, e às minhas irmãs, Ariane e Yanka, que são minhas melhores amigas, meus exemplos de mulheres guerreiras e batalhadoras. Obrigada por estarem sempre por perto e por sempre me apoiarem e incentivarem a ser melhor a cada dia.

Ao meu pai, Joelson, por sempre me ensinar o caminho correto, a ser honesta e trabalhadora, sempre com muito amor, incentivo e apoio.

À minha namorada, Jaqueline, por estar ao meu lado nos últimos 3 anos da graduação, sempre compreensiva e sempre incentivando minha evolução acadêmica. Obrigada por todo carinho, amor e apoio durante essa caminhada, e por sempre me escutar e me aconselhar em todos os momentos.

À minha amiga, Tuany, que conheci no início da graduação e que se tornou uma amiga querida e uma ótima companheira nesta jornada. Obrigada por me incentivar e estar comigo durante a graduação, sendo parceira nos momentos bons e ruins.

Aos meus demais amigos, por estarem sempre por perto, trazendo diversão e bons momentos, que ficarão guardados para sempre comigo. Vocês foram essenciais nesta trajetória, tornando-a mais leve e divertida.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Jussara Kasuko Palmeiro, por ter aceitado me orientar neste trabalho, me sugerindo este tema tão importante atualmente, e também por ter me auxiliado da melhor maneira possível, tanto na parte experimental como na produção escrita.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), principalmente à Luany e ao Matheus, por todo auxílio e disponibilidade para realização dos experimentos deste Trabalho de Conclusão de Curso.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes, ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcos José Machado, e ao Farmacêutico Gustavo Oliveira dos Reis, por terem aceitado o convite para participar da Banca Avaliadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

## RESUMO

O aumento da resistência antimicrobiana em bacilos gram-negativos é um motivo de preocupação na saúde mundial, devido a escassez de opções terapêuticas. As polimixinas são utilizadas na prática clínica como último recurso no tratamento dessas bactérias multirresistentes, porém já são relatadas altas taxas de mortalidade por bactérias gram-negativas resistentes às polimixinas, tornando um desafio para os profissionais da saúde, tanto na conduta terapêutica quanto na detecção dessas resistências. Testar a sensibilidade de bactérias às polimixinas é extremamente difícil, pois métodos comuns como o teste epsilométrico (Etest) e disco-difusão não são confiáveis, e a microdiluição em caldo, que é o método de referência, é trabalhosa e pouco viável para a maioria dos laboratórios clínicos. A proposta deste estudo é avaliar modificações em um método colorimétrico de triagem para detecção de resistência às polimixinas em *Enterobacteriales*, e comparar com os resultados do método de referência. O Teste Rápido de Polimixina NP (Nordmann-Poirel) foi realizado conforme protocolo original e modificado, incorporando as polimixinas por eluição dos discos. Foram testados 147 isolados clínicos de *Enterobacteriales*. A maioria dos isolados foram *Klebsiella pneumoniae* (51%), seguida por *Enterobacter cloacae* (21%) e *Escherichia coli* (15%). Os resultados demonstraram um total de 97 isolados sensíveis e 50 resistentes, pela microdiluição em caldo. Em comparação com os resultados obtidos pela microdiluição em caldo, o método Poli-NP original obteve valor de Kappa de 0,76 e intervalo de confiança de 95% de 0,649 a 0,874 para a polimixina B. Para os métodos Poli-NP modificados os valores obtidos de Kappa foram de 0,72 e 0,70, enquanto os intervalos de confiança de 95% foram 0,609 a 0,844 e 0,586 a 0,829 para colistina e polimixina B, respectivamente. Esses resultados sugerem que o método pode ser utilizado para identificar rapidamente portadores de isolados resistentes à polimixina, sendo um método de triagem útil na rotina clínica laboratorial, principalmente em ambientes com recursos limitados.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriales*. Método de eluição. Teste colorimétrico. Teste Rápido de Polimixina NP.

## ABSTRACT

The increase in antimicrobial resistance in gram-negative bacilli is a matter of concern in world health, due to the scarcity of therapeutic options. Polymyxins are used in clinical practice as a last resort in the treatment of these multiresistant bacteria, but high mortality rates due to polymyxin-resistant gram-negative bacteria have already been reported, making it a challenge for health professionals, both in the therapeutic approach and in the detection of these bacteria. resistances. Testing the sensitivity of bacteria to polymyxins is extremely difficult, as common methods such as the epsilometric test (Etest) and disc diffusion are unreliable, and microdilution in broth, which is the reference method, is laborious and not feasible for most of clinical laboratories. The purpose of this study is to evaluate changes in a colorimetric screening method for detecting resistance to polymyxins in *Enterobacterales*, and compare it with the results of the reference method. The Polymyxin NP Rapid Test (Nordmann-Poirel) was performed according to the original and modified protocol, incorporating the polymyxins by elution from the disks. 147 clinical isolates of *Enterobacterales* were tested. Most isolates were *Klebsiella pneumoniae* (51%) followed by *Enterobacter cloacae* (21%) and *Escherichia coli* (15%). The results showed a total of 97 sensitive and 50 resistant isolates, by broth microdilution. In comparison with the results obtained by broth microdilution, the original Poly-NP method obtained a Kappa value of 0.76 and a 95% confidence interval of 0.649 to 0.874 for polymyxin B. For the modified Poly-NP methods, the values Kappa values were 0.72 and 0.70, while the 95% confidence intervals were 0.609 to 0.844 and 0.586 to 0.829 for colistin and polymyxin B, respectively. These results suggest that the method can be used to quickly identify carriers of polymyxin-resistant isolates, being a useful screening method in clinical laboratory routine, especially in environments with limited resources.

**Keywords:** *Enterobacterales*. Elution method. Colorimetric method. Rapid test Polymyxin NP.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - A estrutura da polimixina B e E (colistina) e o provável mecanismo de ação.....	16
<b>Figura 2</b> - Regulação da sinalização envolvida no mecanismo de resistência às polimixinas.	18
<b>Figura 3</b> - Imagem ilustrativa da metodologia.....	27
<b>Figura 4</b> - Desenho da placa de teste dos métodos Poli-NP original e Poli-NP modificado...	28
<b>Figura 5</b> - Representação dos resultados de detecção de resistência à polimixina pelos métodos colorimétricos Poli-NP original e Poli-NP modificado.....	31

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Valores de coeficiente de concordância Kappa entre os métodos testados.....	32
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Medidas de concordância para dados categóricos .....	29
<b>Tabela 2</b> - Resultados obtidos na microdiluição em caldo e nos testes Poli-NP original e Poli-NP modificado para as 147 bactérias testadas.....	30
<b>Tabela 3</b> - Comparação dos resultados obtidos nos testes Poli-NP original e modificados com a microdiluição em caldo para as 147 bactérias testadas.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
IRAS	Infecções Adquiridas na Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeos
MDR	Resistente à múltiplas drogas
POLI-NP	Polimixina NP [Nordmann/Poirel]
RAM	Resistência antimicrobiana
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1	POLIMIXINAS: MECANISMOS DE AÇÃO E DE RESISTÊNCIA .....	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS.....	19
2.3	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS.....	20
<b>2.3.1</b>	<b>Testes colorimétricos de triagem .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
4.1	DELINEAMENTO E LOCAL DE ESTUDO .....	24
4.2	ISOLADOS BACTERIANOS .....	24
4.3	TESTE COLORIMÉTRICO POLI-NP [NORDMANN-POIREL] .....	25
4.4	TESTE COLORIMÉTRICO POLI-NP [NORDMANN-POIREL] MODIFICADO	26
4.5	MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....	27
4.6	ANÁLISE DE INTERFERÊNCIAS .....	28
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
	<b>APÊNDICE A – TABELA COM RESULTADOS OBTIDOS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) é um dos maiores desafios para a saúde pública mundial, pois põe em risco a eficácia da prevenção e do tratamento de infecções por microrganismos (WHO, 2020). Embora o desenvolvimento da RAM seja um fenômeno natural, nos últimos 50 anos houve uma disseminação crescente devido ao uso inadequado e excessivo de antimicrobianos em pessoas, animais e plantas (EL-SAYED AHMED *et al.*, 2020).

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* tornaram-se globalmente resistentes a múltiplos antimicrobianos (do inglês, multidrug resistant, MDR), abrigando diversos mecanismos de resistência. Consequentemente, as infecções causadas por esses bacilos gram-negativos são responsáveis por altas taxas de mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, se tornando um desafio para os profissionais da saúde (MOTA, OLIVEIRA, SOUTO, 2018; AIRES *et al.*, 2017).

Devido a essa ampla disseminação de resistência, nos últimos anos a indústria farmacêutica tem desenvolvido novos antimicrobianos ativos contra infecções por bactérias MDR, principalmente gram-negativas, no intuito de prevenir futuras endemias, porém isolados resistentes já foram identificados (BREIJYEH, JUBEH, KARAMAN, 2020; SHIRLEY, 2018; SORIANO *et al.*, 2021).

Sendo assim, a utilização das polimixinas (polimixina B e colistina) como um dos últimos recursos continua indispensável para o tratamento de bactérias gram-negativas MDR (OTSUKA, 2020; NANG, LI, VELKOV, 2019), ainda que estejam relacionadas a nefrotoxicidade e neurotoxicidade (OLAITAN, LI, 2016).

Apesar dos mecanismos de resistência às polimixinas não estarem totalmente elucidados, estudos apontam o envolvimento de diversos genes e sistemas regulatórios. Em geral, a maioria desses mecanismos promovem uma alteração na superfície da célula bacteriana, geralmente por alteração ou perda do LPS (lipopolissacarídeo) ou hiperprodução de cápsula, impedindo a ligação do fármaco (POIREL, JAYOL *et al.*, 2017; MOFFATT, HARPER *et al.*, 2010).

A resistência às polimixinas mediada por plasmídeo (*mcr*) é uma das principais preocupações, devido ao potencial de transferência horizontal rápida, o que afeta diretamente na utilidade clínica das polimixinas (NORGAARD *et al.*, 2019; OTSUKA, 2020; EL-SAYED AHMED *et al.*, 2020). Neste contexto, é essencial que os laboratórios apresentem resultados corretos, pois um resultado falso sensível é evidentemente um erro muito grave, contudo, no

caso de um antimicrobiano de último recurso, como as polimixinas, um resultado falso resistente deve ser considerado igualmente crítico (MATUSCHEK *et al.*, 2017).

Testar a sensibilidade de bactérias às polimixinas é extremamente difícil, pois métodos como o teste epsilométrico (Etest) e disco-difusão não são confiáveis, devido principalmente à má difusão das polimixinas em ágar (POIREL *et al.*, 2017). Portanto, o método de referência recomendado pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* para determinar a sensibilidade às polimixinas é a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o padrão ISO-20776 (BrCAST, 2022).

Apesar da técnica ser considerada um método padrão-ouro, a microdiluição em caldo é bastante trabalhosa, sendo que a preparação manual pode levar a erros significativos, não sendo viável a rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia clínica. Além disso, é uma técnica custosa e exige um tempo de resposta relativamente prolongado (WANG, BERGLUND, ZHU, LUO, XIAO, 2021; KULENGOWSKI *et al.*, 2018).

Considerando a complexidade na execução do método de referência para determinar a sensibilidade de bactérias às polimixinas, o desenvolvimento e validação de testes de triagem para a rotina do laboratório clínico é fundamental, principalmente devido ao menor tempo de resposta, e por não demandar de muitas habilidades ou tecnologia custosa (GISKE, KAHLMETER, 2017; BOUVIER *et al.*, 2021).

A proposta deste estudo é avaliar uma modificação em um método colorimétrico de triagem de resistência às polimixinas recentemente desenvolvido, com intuito de possibilitar uma melhor aplicabilidade na rotina laboratorial, com rápida categorização de sensibilidade e resistência, essencial para otimizar o tratamento empírico, beneficiando o prognóstico do paciente.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

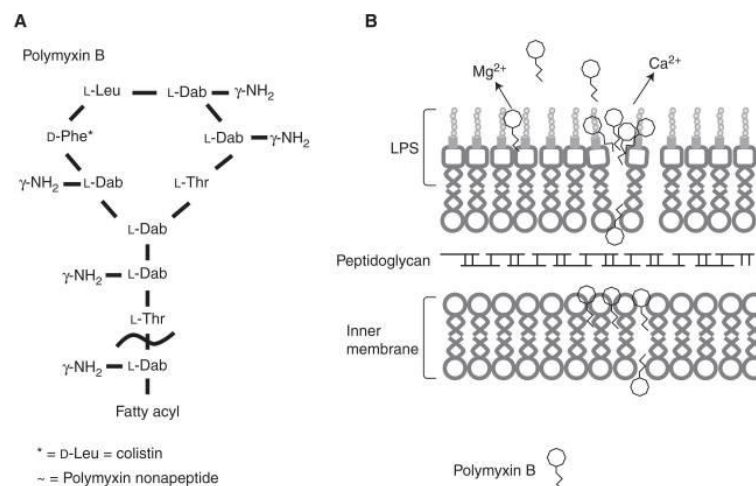
### 2.1 POLIMIXINAS: MECANISMOS DE AÇÃO E DE RESISTÊNCIA

As polimixinas são antimicrobianos lipopeptídicos catiônicos, isolados pela primeira vez na década de 1940 a partir de *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*), uma bactéria gram-positiva encontrada no solo. A molécula de polimixina consiste em uma cadeia lateral de ácidos graxos ligada a um anel peptídico policatiônico composto de dez aminoácidos (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2018).

As duas formas da classe da polimixina utilizadas na prática clínica são a polimixina B e a colistina (polimixina E), essas moléculas se diferem apenas em um aminoácido dentro do anel peptídico, ou seja, na colistina a fenilalanina é substituída por uma leucina (Figura 1) (TRIMBLE *et al.*, 2016; SATLIN *et al.*, 2019; BERGEN *et al.*, 2006; KWA, KASIAKOU, TAM, FALAGAS, 2014).

O mecanismo de ação das polimixinas ainda não foi totalmente elucidado, porém acredita-se que envolve a ruptura da membrana celular externa para consequente morte da bactéria, por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas iniciais com o lipídio A de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa de bactérias gram-negativas (TRAN *et al.*, 2016) (Figura 1).

**Figura 1** - Estrutura da polimixina B e E (colistina) e o provável mecanismo de ação



Fonte: Tradução de Trimble *et al.* Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance (2016).  
 Legenda: (A) A estrutura geral do peptídeo catiônico cíclico polimixina B. A colistina (polimixina E) substituiu a fenilalanina (d - Phe\*) na polimixina B por uma leucina. O nonapeptídeo de polimixina B atenuado tem a cauda de acil graxo removida adjacente à treonina fora da estrutura do anel (~). (B) A polimixina B interage com a porção lipídica A da membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS). Os peptídeos atravessam a membrana externa através de um mecanismo de “captação auto-promovida” e, em seguida, interagem com a membrana citoplasmática para inibir a energização celular e possivelmente causar inibição da divisão celular e/ou permeabilização da membrana citoplasmática e subsequente morte celular.



As polimixinas são ativas contra uma grande variedade de bacilos gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (*Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.). Estes microrganismos são responsáveis por diversas infecções nosocomiais, como pneumonias associadas à assistência à saúde, infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres, infecções de sítio cirúrgico e infecções do trato urinário, o que resulta no crescente uso das polimixinas no âmbito hospitalar (ANVISA, 2022; NANG *et al.*, 2021).

Conforme as diretrizes de consenso internacional para o uso ideal das polimixinas, recomenda-se a polimixina B como agente preferencial para uso sistêmico de rotina em infecções invasivas. A justificativa para esta recomendação é que a polimixina B tem características farmacocinéticas superiores em humanos, bem como um potencial reduzido de causar nefrotoxicidade. Já a colistina é recomendada como a polimixina preferida para o tratamento de infecções do trato urinário inferior, dada a depuração renal do pró-fármaco CMS (colistimetato ou metanossulfonato de colistina) que então se converte na porção ativa colistina no trato urinário (TSUJI *et al.*, 2019)

O efeito tóxico mais freqüente das polimixinas é a lesão renal, que se caracteriza por necrose tubular aguda, já que as polimixinas causam um aumento na permeabilidade das células do epitélio tubular renal com influxo de cátions, ânions e água, com conseqüente morte celular. Entretanto, as formulações de colistina e polimixina B disponíveis hoje apresentam maior grau de pureza e com isso menor toxicidade (ZAVASCKI, NATION, 2017; POGUE, TAM, 2019; ANVISA, 2022;)

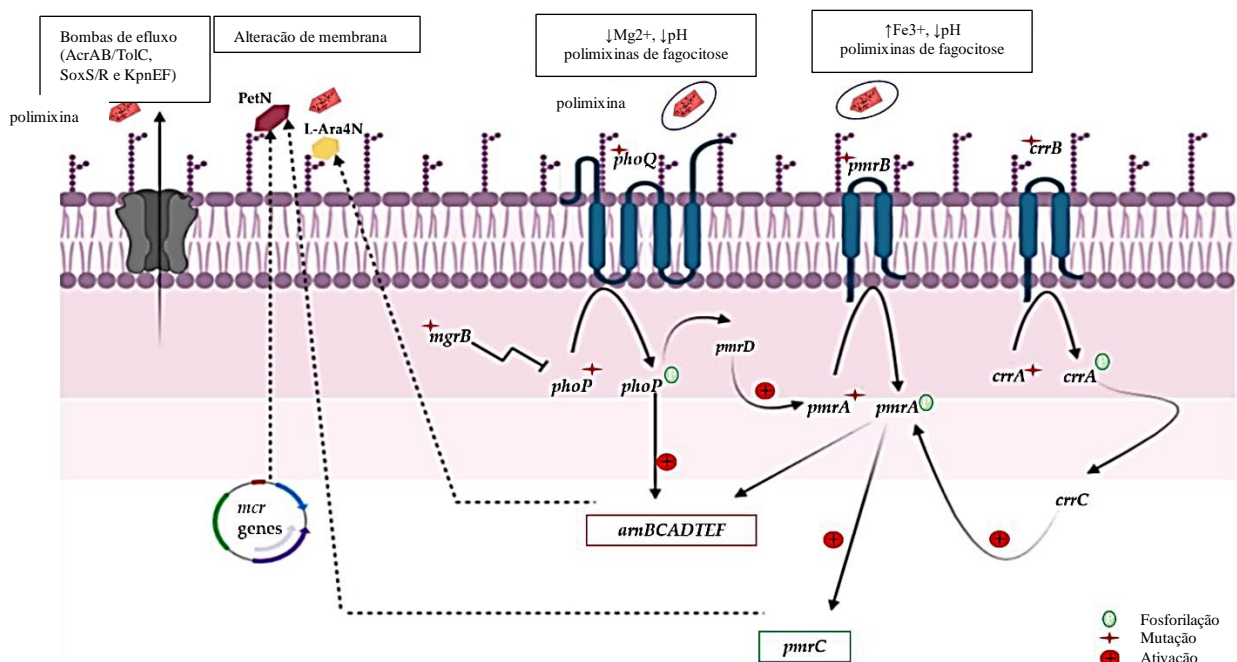
Os mecanismos de resistência às polimixinas desenvolvidos pelas bactérias incluem a produção de cápsula, perda do LPS, modificação de LPS e bombas de efluxo (HUANG *et al.*, 2020; MOFFATT, HARPER, BOYCE, 2019; EICHENBERGER, THADEN 2019).

A resistência à polimixina é regulada essencialmente pelos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB, que respondem às concentrações de cálcio, ferro e magnésio e às variações de pH. Esses sistemas estão envolvidos nas modificações do LPS, especificamente na modificação da composição química do lipídio A via biossíntese e adição de fosfoetanolamina e 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) (OLAITAN, MORAND, ROLAIN, 2014; SILVA, ROSSATO, LEITE, SIMIONATTO, 2022) (Figura 2).

Em *Enterobacterales*, a resistência à polimixina pode ser transmitida de forma horizontal, por meio de plasmídeos que carregam o gene *mcr*, o qual codifica a enzima fosfoetanolamina transferase, responsável por alterar o LPS e, conseqüentemente, diminuir a ligação da polimixina (LIU *et al.*, 2016; GIAMARELLOU, 2016).

Em *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* essa resistência é mais comumente mediada por cromossomos, principalmente por mutações cromossômicas de genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos, como o truncamento do gene *mgrB* (regulador de feedback negativo do sistema PhoPQ), levando à regulação negativa da atividade quinase de PhoQ e diminuição da produção de fosfoetanolamina (NANG, LI, VELKOV, 2019; NØRGAARD *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2021; POIREL *et al.*, 2015).

**Figura 2** – Representação ilustrativa da regulação da sinalização envolvida no mecanismo de resistência às polimixinas



Fonte: Tradução e adaptação de HAMAME *et al.* Mobile Colistin Resistance (*mcr*) Genes in Cats and Dogs and Their Zoonotic Transmission Risks (2022).

Legenda: O gene *mgrB* exerce feedback negativo no sistema de dois componentes (TCS) PhoP/PhoQ. Uma mutação do gene *mgrB* (indicado por símbolos de estrelas de cor vermelha) leva a uma indução constitutiva do sistema PhoP/PhoQ. A ativação de PhoP/PhoQ ativa *pmrD* e o operon *arnBCADIEF*; *pmrD* por sua vez ativa *pmrA*. O TCS *pmrA/pmrB* também pode ser ativado por uma mutação nos genes *pmrA/pmrB*; essa ativação ativa tanto *arnBCADIEF* quanto *pmrC*, que modificam coletivamente os lipopolissacarídeos (LPSs) por meio da adição de 4-amino-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ou fosfoetanolamina (PetN). PetN também pode ser adicionado a LPSs por fosfoetanolamina transferase expressa pelos genes *mcr*. As substituições de aminoácidos em CrrB/CrrA induzem a expressão de *crrC* induzindo a expressão elevada de *pmrC* através da ativação de *pmrA*. Por outro lado, as bombas de efluxo (AcrAB/TolC, SoxS/R e KpnEF) permitem ejetar a colistina para fora da bactéria.

No contexto da expansão mundial de carbapenemases, ressurgiu o uso clínico de polimixinas, assumindo um papel importante como terapia de resgate para infecções gram-negativas intratáveis, principalmente cepas MDR. Porém, a resistência à polimixina está aumentando em todo o mundo, com diversos relatos recentes de falha clínica e surgimento de resistência durante a antibióticoterapia (TSUJI *et al.*, 2019; NANG *et al.*, 2021).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

De acordo com a Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM, 2017), anualmente cerca de 700 mil mortes são ocasionadas por infecções derivadas de bactérias multirresistentes e estima-se que até 2050 esse número aumente para cerca de 10 milhões de mortes por ano no mundo.

Embora estejam presentes na natureza e façam parte da microbiota normal do hospedeiro, *Enterobacterales* são isoladas em cerca de 50% dos pacientes com infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e compreendem 80% de todos os isolados entre bactérias gram-negativas, estando relacionadas ao desenvolvimento de doenças graves (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2022; KELESIDIS, FALAGAS, 2015).

As polimixinas foram categorizadas pela OMS como antimicrobianos “criticamente importantes”, pois cumprem os critérios de serem uma das poucas terapias disponíveis para tratar infecções bacterianas graves (OMS, 2017). As polimixinas, de forma geral, apresentam ação adequada contra bacilos gram-negativos MDR. Um estudo recente sugere eficácia satisfatória e um perfil de segurança aceitável sobre o uso clínico de polimixina B intravenosa para o tratamento de pacientes com infecções bacterianas gram-negativas MDR e constata que a mortalidade de pacientes tratados com polimixina B intravenosa é comparável à mortalidade geral de pacientes com infecções multirresistentes tratados com outros antibióticos estabelecidos (ROSSI *et al.*, 2016; FALAGAS *et al.*, 2021).

A colistina intravenosa tem sido usada em alguns países, incluindo Europa, Austrália, Japão e África do Sul, especialmente em pacientes hospitalares com infecções bacterianas gram-negativas MDR. Nos EUA, Brasil, Malásia e Cingapura, tanto a colistina quanto a polimixina B estão disponíveis para administração intravenosa. Por outro lado, países, como Japão e África do Sul, nem a colistina nem a polimixina B estão disponíveis (FALAGAS *et al.*, 2021).

A prevalência mundial de resistência às polimixinas é de aproximadamente 10% entre as bactérias gram-negativas, sendo mais alta nos países mediterrâneos e no Sudeste Asiático. O aumento do uso de polimixina para infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR tem levado ao surgimento de resistência em vários países do mundo, e sua prevalência pode variar entre as regiões (SILVA *et al.*, 2022).

*K. pneumoniae* resistente a carbapenem é a espécie mais comumente envolvida no desenvolvimento de resistência à polimixina, por estar relacionada ao maior uso clínico de polimixinas. Um estudo epidemiológico constatou que entre 963 cepas de *Enterobacterales*

produtores de carbapenemases e resistentes às polimixinas presentes nas Américas, 95,3% são *K. pneumoniae*, e os 4,7% restantes estão distribuídos entre *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Citrobacter* spp. (RODRÍGUEZ-SANTIAGO, CORNEJO-JUÁREZ, SILVA-SÁNCHEZ, GARZA-RAMOS, 2021).

No Brasil, de acordo com dados do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), a proporção de detecção de enterobactérias resistentes à polimixina subiu de 42% em 2019 para 58% em 2021, considerando-se o conjunto de amostras recebidas para identificação ao longo deste período. Nos hospitais brasileiros, houve aumento da taxa de *K. pneumoniae* resistente à polimixina de 1,8% em 2009 para 15% em 2013 e 35,5% em 2015, sendo, portanto, considerada endêmica e frequentemente associada à altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes (GIAMARELLOU, 2016; SILVA *et al.*, 2020).

O primeiro caso brasileiro de uma infecção humana causada por uma bactéria portadora do gene *mcr* foi observado no estado do Rio Grande do Norte. Uma cepa de *E. coli* produtora de ESBL foi isolada da amostra de ferida do pé de um paciente diabético. Outras publicações identificaram o gene *mcr* em seres humanos no estado de São Paulo, Espírito Santo, Pernambuco e Rio Grande do Sul, e existem ainda relatos sem descrição do local do isolamento (FABRIN, VIZZOTTO, 2019; OLIVEIRA, 2020).

Diante do atual cenário é de suma importância a acurácia de métodos que detectam resistência às polimixinas em bactérias gram-negativas, pois se tratando de um antimicrobiano de último recurso, é absolutamente essencial que os laboratórios relatem resultados confiáveis (MATUSCHEK *et al.*, 2018).

### 2.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS

Avaliar a sensibilidade de bactérias às polimixinas é uma prática laboriosa, pois métodos mais fáceis de executar no laboratório, como o teste epsilométrico (Etest) e disco-difusão não são confiáveis, devido principalmente à má difusão das polimixinas em ágar (POIREL *et al.*, 2017), sendo o uso desses métodos inadequados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (CLSI, 2017; BrCAST, 2016; LESHABA, MBELLE, OSEI, 2021). Atualmente, o único método recomendado pelo BrCAST/EUCAST para a avaliação da sensibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo não automatizada, de acordo com o

padrão ISO-20776 (BRCAST, 2022; BAKTHAVATCHALAM et al., 2018).

A microdiluição em caldo é uma técnica na qual uma suspensão bacteriana de concentração padrão ( $10^4$  UFC/mL) é testada contra diferentes concentrações do agente antimicrobiano em um caldo Mueller-Hinton ajustado para cátions ( $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ), sendo realizado em pequenos volumes. Os resultados são registrados como concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo, e é expressa em mg/L ou  $\mu\text{g/mL}$  (EUCAST, 2022).

Apesar da técnica ser considerada um método padrão-ouro devido à sua reprodutibilidade e confiabilidade, a microdiluição em caldo é bastante trabalhosa, sendo que a preparação manual pode levar a erros técnicos, não sendo tão viável sua execução na rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia clínica (WANG, BERGLUND, ZHU, LUO, XIAO, 2021; KULENGOWSKI et al., 2018).

Existem outros métodos não automatizados disponíveis comercialmente, como o Policimbac® (Probac do Brasil) e Sensititre™ (Thermo Scientific), porém, além de apresentarem um custo elevado, um dos poucos estudos sobre o método Policimbac® evidencia que o mesmo fornece resultados confiáveis apenas para classificação categórica de resistência à polimixina, pois as CIMs obtidas foram maiores do que as obtidas com a microdiluição em caldo (DALMOLIN et al., 2020).

### **2.3.1 Testes colorimétricos de triagem**

Para facilitar a rotina laboratorial, foram desenvolvidos testes rápidos colorimétricos utilizados como triagem para detecção de resistência às polimixinas, diminuindo o tempo de resposta. Entretanto, estes testes ainda são recentes e possuem poucos estudos que detalham sua eficácia em relação ao método referência.

O teste rápido de polimixina NP [Nordmann/Poirel] (Poli-NP), desenvolvido por Nordmann, Jayol e Poirel (2016), consiste em detectar o crescimento bacteriano através da metabolização da glicose, na presença de uma determinada concentração de polimixina B ou colistina. Quando ocorre o crescimento (isolado resistente), a formação do metabolismo ácido altera o pH do meio, que é evidenciado visualmente pela mudança de cor de um indicador de pH, o vermelho de fenol. O resultado final do teste rápido Poli-NP é obtido em até 4 h, embora a maioria dos isolados resistentes apresentem resultados positivos em torno de 2 h (NORDMANN et al., 2016; DALMOLIN et al., 2019a).

Nordmann, Jayol e Poirel (2016) relataram que seu teste apresentou uma sensibilidade

de 99,3% e uma especificidade de 95,4% para 200 isolados de *Enterobacterales*. Outro estudo mais recente avaliou o desempenho do teste rápido de Polimixina NP como excelente na detecção de resistência às polimixinas (GERM *et al.*, 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar modificações no método colorimétrico Poli-NP, comparando com o método original e o método de microdiluição em caldo triagem da resistência às polimixinas em isolados de *Enterobacterales*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a modificação no procedimento de Poli-NP, pela adição de polimixina por disco eluição;
- Determinar classificação categórica (erro muito grave e erro grave) e concordância Kappa dos métodos Poli-NP e Poli-NP modificado, em relação ao método padrão (microdiluição em caldo);
- Definir sensibilidade e especificidade do método Poli-NP modificado.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO E LOCAL DE ESTUDO

O estudo apresenta um modelo de pesquisa experimental e analítica. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, situado no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), que está localizado na cidade de Florianópolis-SC.

### 4.2 ISOLADOS BACTERIANOS

Para este estudo foram selecionadas 147 amostras de espécies bacterianas pertencentes à ordem *Enterobacterales*, isoladas entre o período de 2016 a 2021 no setor de Microbiologia da Unidade do Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do HU/UFSC/EBSERH.

Os isolados de *Enterobacterales* selecionados para este estudo foram: *Klebsiella pneumoniae* (75), complexo *Enterobacter cloacae* (31), *Escherichia coli* (22), *Enterobacter amnigenus* (1), *Citrobacter freundii* (5), *Klebsiella aerogenes* (5), *Klebsiella oxytoca* (2), *Klebsiella* spp. (2) e *Citrobacter* spp. (4).

As bactérias criopreservadas foram semeadas em meio ágar sangue ou ágar chocolate, com incubação por 24 horas a 37 °C. Posteriormente ao crescimento primário, colônias isoladas foram subcultivadas em ágar tríptico de soja (TSA), incubando por mais 24 horas a 37 °C. As suspensões bacterianas foram preparadas para cada isolado testado, bem como para os isolados utilizados como controles sensíveis e resistentes às polimixinas, conforme será descrito no item 4.3.

Para o controle de qualidade, foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle sensível, conforme recomendado pelo BrCAST. Para controles resistentes, foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* produtor de *mcr-1* (NANG; LI; VELKOV, 2019) e *Klebsiella pneumoniae* produtor do gene *mgrB* truncado por sequência de inserção (KpC9) (PALMEIRO *et al.*, 2019; POIREL *et al.*, 2015).



#### 4.3 TESTE COLORIMÉTRICO POLI-NP [NORDMANN-POIREL]

O teste rápido de polimixina NP foi reproduzido conforme a metodologia original, iniciando-se pelo preparo de 500 mL da solução indicadora Poli-NP, na qual foi misturado o meio de cultura ágar Mueller-Hinton cátion ajustado (MHB-CA) com o indicador de pH vermelho de fenol e água destilada, tendo o pH ajustado para 6,7 com ácido clorídrico 1 mol/L. A esterilização dessa solução foi feita em autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente ao resfriamento da solução à temperatura ambiente, foi adicionada d-glicose anidra 10%, esterilizada por filtração em membrana de 0,22µm. As concentrações finais na solução Poli-NP foram de 2,5% de pó de MHB-CA, 0,005% de indicador vermelho de fenol e 1% de d-glicose. A solução foi aliqüotada em tubos de 50 mL e armazenada congelada a -20°C. Antes de cada experimento, a solução foi pré-aquecida a 37 °C para evitar retardo no crescimento bacteriano, que pode ocasionar mudança de cor tardia (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016).

A solução de sulfato de poliximina foi previamente preparada pela dissolução de sal puro de sulfato de polimixina (Sigma-Aldrich) em salina, com concentração de 32 µg/mL. Essa solução foi então incorporada à solução indicadora Poli-NP imediatamente antes da realização do experimento, de modo que a concentração final de polimixina na solução seja de 5 µg/mL (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016). Portanto, para um volume final de 4 mL de solução Poli-NP, adicionou-se 625 µL de solução de sulfato de polimixina a 32 µg/mL.

De acordo com Nordmann, Jayol e Poirel (2016), o preparo dos inóculos bacterianos consiste na ressuspensão das bactérias a serem testadas, incluindo os controles, em NaCl estéril (0,85%) para obter densidade óptica de 3,0-3,5 na escala McFarland, que corresponde à, aproximadamente, 10<sup>9</sup> UFC/mL. Porém, ao reproduzir o teste nesta concentração bacteriana, observou-se elevado número de cepas resistentes, cuja explicação pode estar na alta concentração de bactérias na solução. Para a maioria dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, utiliza-se o padrão de densidade óptica da solução bacteriana de 0,5 na escala McFarland (~10<sup>8</sup> UFC/mL), inclusive em outros métodos similares descritos na literatura. Portanto, adotou-se este padrão de densidade óptica para as suspensões bacterianas utilizadas neste experimento, as quais foram inoculadas em até 15 minutos após preparação, conforme recomendado pelas diretrizes do BrCAST para testes de suscetibilidade (BRCAST, 2022).

O experimento foi realizado em microplaca de poliestireno de 96 poços estéril, e para cada isolado, a suspensão bacteriana foi inoculada, paralelamente, em dois poços, com polimixina (5µg/mL) e sem polimixina (0 µg/mL), para controle de crescimento bacteriano.

Foi adicionado, em cada poço teste, 150 µL de solução Poli NP e 50 µL de suspensão

bacteriana ou salina (poço para controle de contaminação do meio), e incubado a  $35 \pm 2$  °C em ar ambiente, por até 4 horas (Figura 3).

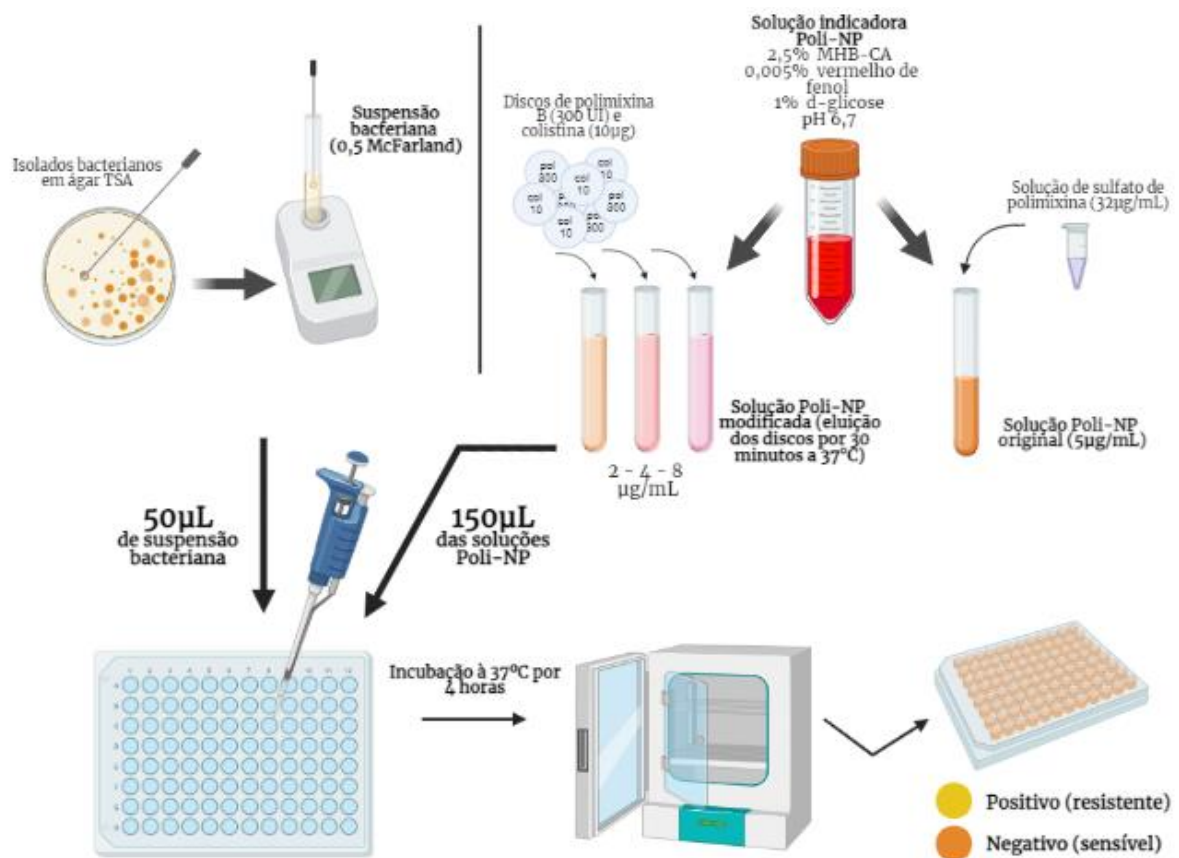
A leitura do teste foi feita após os primeiros 10 minutos e depois a cada hora por 4 horas. O resultado foi considerado positivo, ou seja, resistente à polimixina, quando houve crescimento do isolado na presença de polimixina, alterando a cor do meio de laranja para amarelo (metabolismo da glicose), o qual observa-se também no poço sem polimixina. O resultado foi considerado negativo, ou seja, sensível à polimixina, quando não houve crescimento do isolado na presença de polimixina, não alterando a cor do meio (laranja), o que também deve ocorrer nos poços sem suspensão bacteriana

#### 4.4 TESTE COLORIMÉTRICO POLI-NP [NORDMANN-POIREL] MODIFICADO

A modificação do teste consistiu em preparar a solução Poli-NP através da eluição de discos de polimixina B e colistina, conforme a metodologia descrita por Dalmolin *et al.* (2019b) e Simner *et al.* (2019). Foram utilizados discos de colistina e de polimixina B com concentrações de 10 µg e 300 UI, respectivamente, que foram adicionados a solução tampão original, com posterior incubação de 30 minutos a 37 °C para eluição dos antimicrobianos. Para este teste, foram preparadas soluções com concentrações de 2, 4 e 8 µg/mL, tanto para polimixina B quanto para colistina (SIMNER *et al.*, 2019). Como o controle de crescimento em concentração 0 µg/mL (sem discos) está incluso no método original, não foi necessário reproduzir novamente no método modificado, visto que ambos foram realizados concomitantemente.

Os inóculos bacterianos foram preparados de acordo com o descrito no teste rápido Poli-NP original. Este teste modificado foi realizado juntamente ao original, na mesma microplaca de poliestireno de 96 poços, sendo que para cada isolado, a suspensão bacteriana foi inoculada, paralelamente, nas três concentrações de polimixinas preparadas (2, 4 e 8 µg/mL). A leitura do teste modificado seguiu as mesmas condições do teste original.

**Figura 3** – Representação ilustrativa da metodologia do teste colorimétrico Poli-NP, conforme Nordmann-Poirel e Poli-NP modificado por disco eluição



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para polimixina B das 147 bactérias utilizadas neste estudo foram determinadas por microdiluição em caldo. O método foi realizado para todos os isolados, em placas de poliestireno de 96 poços, seguindo o procedimento ISO 20776-1, usando caldo Mueller-Hinton ajustado a cátions (Oxoid) e sal sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich) (CLSI, 2006). O teste foi executado pela acadêmica do curso de Farmácia, Kharol Neves, em seu Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Avaliação de modificações em dois métodos fenotípicos com menor tempo de resposta para triagem da resistência às polimixinas em isolados clínicos de *Enterobacterales*” aprovado no ano de 2022.

A CIM foi definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano, por meio de inspeção visual. Os isolados foram considerados suscetíveis quando as CIMs foram  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  e resistentes quando as CIMs foram  $> 2 \mu\text{g/mL}$ .

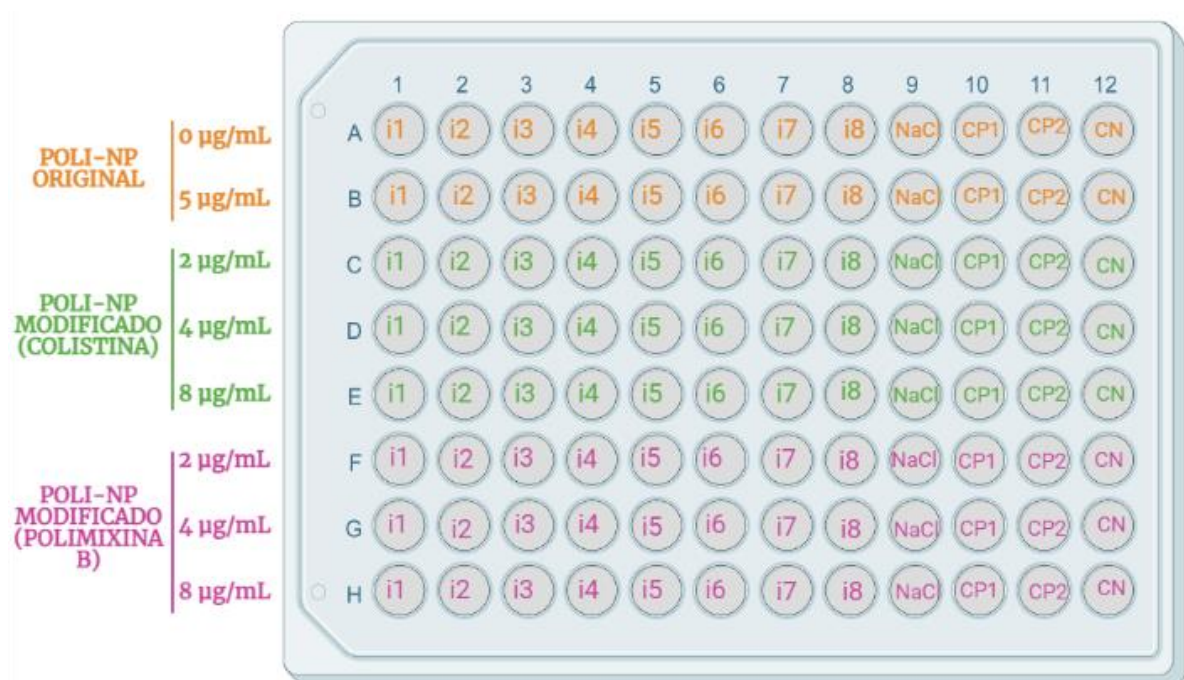
(BRCAST, 2021).

Sendo assim, os resultados obtidos nos experimentos deste estudo foram confrontados com os resultados da microdiluição em caldo previamente executada, tendo este método padrão-ouro como segurança de comparação entre os métodos.

#### 4.6 ANÁLISE DE INTERFERÊNCIAS

O controle de interferência foi realizado para ambos os experimentos, utilizando um controle negativo (isolado sensível à polimixina) e dois controles positivos (isolados resistentes à polimixina). Todos os isolados também foram inoculados com solução indicadora sem polimixina, para confirmar o metabolismo de carboidratos pelas bactérias. Além disso, para cada teste, foi preparado um poço com solução indicadora e salina apenas (sem suspensão bacteriana), a fim de comprovar a ausência de contaminação do meio (Figura 4).

**Figura 4** – Desenho da placa de teste dos métodos Poli-NP original e Poli-NP modificado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Isolado (i). Números arábicos correspondem a cada isolado inoculado na placa. Solução salina estéril 0,85% (NaCl). Isolados controles positivos (CP): *Klebsiella pneumoniae* KpC9 (CP1) e *Escherichia coli* produtores de *mcr-1* (CP2). Isolado controle negativo (CN): *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos com Poli-NP original e Poli-NP modificado foram comparados com os resultados da microdiluição em caldo. A mensuração da concordância para dados categóricos foi realizada através do coeficiente de concordância Kappa. O coeficiente Kappa mede a concordância além da causalidade, variando em uma escala de 0 (zero), quando não há concordância além do esperado, a 1 (um) quando há concordância perfeita, conforme Tabela 1 (LANDIS, J.R.; KOCH, G.G., 1977). Utilizando como referência o método de microdiluição em caldo, a estatística Kappa foi aplicada a fim de responder se há concordância de suscetibilidade ou resistência entre os métodos testados e o padrão. Os valores de concordância Kappa e os intervalos de confiança foram calculados por meio de uma calculadora disponível na internet (<http://vassarstats.net/>). A sensibilidade e especificidade diagnóstica foram calculadas usando dados plotados em planilhas do Excel.

**Tabela 1** - Medidas de concordância para dados categóricos.

Estatística Kappa	Força da concordância
< 0,00	Pobre
0,00 – 0,20	Pouca
0,21 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeita

Fonte: Tradução de Landis, J.R.; Koch, G.G. *The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data* (1977).

As discrepâncias foram determinadas para avaliar o desempenho do teste na detecção de resistência à colistina, sendo classificadas da seguinte forma: (i) erro muito grave (VME, do inglês *Very Major Error*) quando os isolados foram considerados sensíveis pelos métodos testados, porém resistentes pelo método padrão (resultado falso-sensível); (ii) erro grave (ME, do inglês *Major Error*) quando os isolados foram considerados resistentes pelos métodos testados, mas categorizados sensíveis usando o método padrão (resultado falso-resistente) (JAYOL et al., 2018).

## 5 RESULTADOS

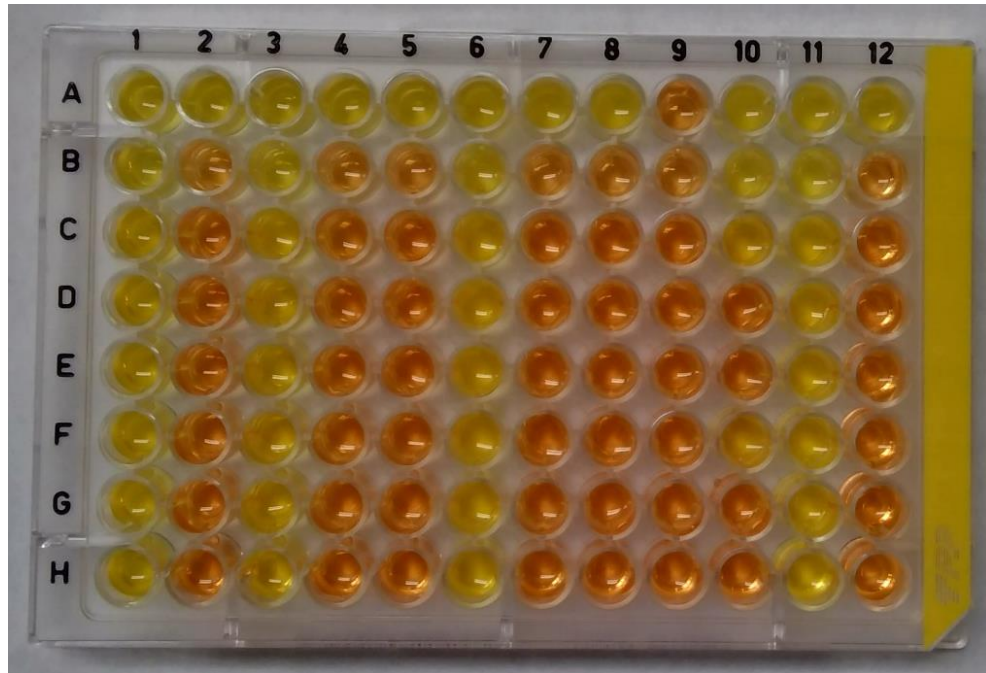
A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para polimixina B das 147 bactérias foi obtida através do método de microdiluição em caldo. O resultado do teste demonstrou resistência à polimixina B em 50 das cepas testadas, sendo 37 *Klebsiella pneumoniae*, 6 do complexo *Enterobacter cloacae*, 3 *Klebsiella aerogenes*, 2 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter amnigenus* e 1 *Klebsiella oxytoca*, conforme apresentado na Tabela 2. Os testes colorimétricos Poli-NP original e modificado foram realizados com as mesmas 147 cepas bacterianas, e os resultados de resistência ou sensibilidade (Tabela 2) foram determinados pela observação de mudança na coloração do meio (Figura 5).

**Tabela 2** - Resultados obtidos na microdiluição em caldo e nos testes Poli-NP original e Poli-NP modificado para as 147 bactérias testadas

Isolados	Microdiluição em caldo		Poli-NP Original		Poli-NP Modificado Colistina		Poli-NP Modificado Polimixina B	
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 (50,7)	37 (49,3)	41 (54,7)	34 (45,3)	36 (48)	39 (52)	37 (49,3)	38 (50,7)
<i>Enterobacter cloacae</i>	25 (80,6)	6 (19,4)	27 (87,1)	4 (12,9)	27 (87,1)	4 (12,9)	27 (87,1)	4 (12,9)
<i>Escherichia coli</i>	20 (90,9)	2 (9,1)	21 (95,5)	1 (4,5)	20 (90,9)	2 (9,1)	20 (90,9)	2 (9,1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)
<i>Citrobacter freundii</i>	5 (100)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	3 (60)	2 (40)	5 (100)	0 (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2 (40)	3 (60)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	1 (20)
<i>Citrobacter spp.</i>	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)
<i>Klebsiella spp.</i>	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
<i>Enterobacter amnigenus sp.</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
<b>TOTAL</b>	<b>97 (66)</b>	<b>50 (34)</b>	<b>106 (72,1)</b>	<b>41 (27,9)</b>	<b>97 (66)</b>	<b>50 (34)</b>	<b>100 (68)</b>	<b>47 (32)</b>

Fonte: Elaborado pelo autor.  
Legenda: Resistente (R). Sensível (S).

**Figura 5** - Representação dos resultados de detecção de resistência à polimixina pelos métodos colorimétricos Poli-NP original e Poli-NP modificado



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Isolados sensíveis correspondem às colunas 2, 4, 5, 7, 8 e 12 (Controle Negativo); Isolados resistentes correspondem às colunas 1, 3, 6, 10 (Controle Positivo 1) e 11 (Controle Positivo 2). Controle de contaminação corresponde à coluna 9 (Salina 0,85%); Controle de crescimento bacteriano correspondente à linha A (sem polimixina).

Os resultados dos testes Poli-NP original e Poli-NP modificado foram comparados com os resultados da microdiluição em caldo, conforme apresentado na Tabela 3.

Considerando estes resultados, os três métodos testados apresentaram um coeficiente Kappa de concordância muito similar ao método padrão-ouro. O método Poli-NP original obteve valor de Kappa de 0,76 e intervalo de confiança de 95% de 0,649 a 0,874 para a polimixina B, sendo considerada uma concordância substancial, de acordo com a classificação definida por Landis e Koch (1977). Para os métodos Poli-NP modificados os valores obtidos de Kappa foram de 0,72 e 0,70, enquanto os intervalos de confiança de 95% foram 0,609 a 0,844 e 0,586 a 0,829 para colistina e polimixina B, respectivamente, resultando também em uma concordância substancial entre esses métodos e a microdiluição em caldo.

O método Poli-NP original apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 89%. O método Poli-NP modificado para colistina apresentou sensibilidade de 82% e especificidade de 91%, enquanto para polimixina B a sensibilidade foi de 83% e especificidade de 89%.

**Tabela 3** - Comparação dos resultados obtidos nos testes Poli-NP original e modificados com a microdiluição em caldo para as 147 bactérias testadas

MÉTODO	Nº DE ISOLADOS		CONCORDÂNCIA KAPPA (95IC)	VME (%)	ME(%)
	R (%)	S (%)			
Microdiluição em caldo	50 (34,0)	97 (66,0)	-	-	-
Poli-NP original	41 (27,9)	106 (72,1)	0,76 (0,649-0,874)	12 (24)	3 (3,09)
Poli-NP mod. Colistina	50 (34,0)	97 (66,0)	0,72 (0,609-0,844)	9 (18)	9 (9,28)
Poli-NP mod. Polimixina B	47 (32,0)	100 (68,0)	0,70 (0,586-0,829)	11 (22)	8 (8,25)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Resistente (R). Sensível (S). Intervalo de confiança 95% (95IC). Erro muito grave (VME). Erro grave (ME).

Além da comparação com a microdiluição em caldo, os resultados dos testes realizados neste estudo também foram confrontados entre si. Quando comparou-se o método Poli-NP original e com os dois métodos Poli-NP modificados, tanto com colistina como com polimixina B, obteve-se um coeficiente Kappa de concordância quase perfeita, assim como foi observado quando comparado os dois métodos Poli-NP modificados (colistina e polimixina B), cujo coeficiente de concordância Kappa foi de 0,92 (Quadro 1).

**Quadro 1** – Valores de coeficiente de concordância Kappa entre os métodos testados

MÉTODOS TESTADOS	CONCORDÂNCIA KAPPA (95IC)
Poli-NP original X Poli-NP modificado (colistina)	0,8574 (0,768 - 0,946)
Poli-NP original X Poli-NP modificado (Polimixina B)	0,8705 (0,784 - 0,957)
Poli-NP modificado (Colistina) X Poli-NP modificado (Polimixina B)	0,9231 (0,857 - 0,989)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de concordância Kappa também foi calculado por espécie bacteriana e os resultados demonstraram maior concordância, em comparação com a microdiluição em caldo, para os isolados de *K. pneumoniae* (Poli-NP original = 0,7597 (95IC = 0,612 – 0,907); Poli-NP modificado colistina = 0,7868 (95IC = 0,647 – 0,926); e Poli-NP modificado polimixina B = 0,7067 (95IC = 0,547 – 0,867) e *E. cloacae* (0,7634 (95IC = 0,446 – 1) para todos os testes), enquanto para os isolados de *E. coli* a concordância foi substancial para o teste Poli-NP original e moderada para o teste Poli-NP modificado. As demais espécies obtiveram concordâncias moderada (Poli-NP original) à razoável (Poli-NP modificado).



## 6 DISCUSSÃO

As infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR são cada vez mais preocupantes, devido a limitação terapêutica e conseqüente aumento das taxas de resistência às polimixinas, que são utilizadas como uma das últimas opções de tratamento (LI *et al.*, 2019).

A microdiluição em caldo é o método de referência para a determinação a CIM para polimixinas, porém é uma técnica laboriosa, custosa e demorada. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, simples e seguros para detectar a resistência à polimixina (DALMOLIN, 2016).

Nordmann *et al.* (2016) desenvolveram o teste rápido de polimixina NP, que consiste em detectar resistência à polimixina em *Enterobacterales*, cujo resultado é obtido em até 4 horas, ou seja, pelo menos 16 h mais cedo que o método de microdiluição em caldo, sendo uma grande vantagem em relação ao método de referência.

Estudos recentes já avaliaram adaptações no teste Poli-NP para ser utilizado para bactérias com outras vias metabólicas, como as gram-negativas não fermentadoras. Um total de 21 isolados de *Acinetobacter baumannii* e 17 de *Pseudomonas aeruginosa* foram incluídos para avaliar o desempenho deste teste, e os resultados demonstraram uma identificação correta de todos os isolados sensíveis e resistentes, em comparação com a microdiluição em caldo, resultando em uma especificidade e uma sensibilidade de 100% (LESCAT *et al.*, 2018).

O teste Poli-NP é de fácil execução, rápido, sensível e específico. Ele detecta isolados sensíveis e resistentes à polimixina de qualquer espécie de *Enterobacterales*, independentemente do mecanismo de resistência apresentado, a partir de culturas bacterianas de amostras infectadas ou de meios seletivos (NORDMANN *et al.*, 2016).

A sensibilidade e especificidade do teste rápido de polimixina NP original foram altas (93% e 89%, respectivamente), mostrando ser uma técnica útil para a triagem de primeira etapa da resistência à polimixina. Esse teste é tão confiável quanto a microdiluição em caldo, mas com a vantagem de ser menos trabalhoso. No entanto, mesmo sendo menos custosa que o método de referência, a utilização do sulfato de polimixina pode ser uma limitação na aplicabilidade do teste na rotina laboratorial, principalmente em pequenos laboratórios, devido a falta de recursos e dificuldade na aquisição do antimicrobiano. Portanto, a substituição do sal pelos discos de polimixinas no teste poli-NP é ainda mais aplicável na triagem da determinação do perfil de sensibilidade da bactéria, visando a definição de um antibioticoterapia mais eficiente e segura para o paciente.

A concordância categórica entre os métodos de triagem e o método padrão é essencial para determinar a aplicabilidade de método de triagem. A partir dos valores de Kappa calculados entre os testes, observou-se que a concordância foi melhor para o teste Poli-NP original do que para o teste poli-NP modificado, quando comparado ao método de referência. Ainda assim, ambos apresentaram uma concordância significativa.

Quando comparado o método poli-NP modificado com o teste original, observou-se uma concordância quase perfeita, bem como observado quando comparado o método modificado para as diferentes polimixinas. Portanto, apesar de haver pequenas diferenças entre os testes Poli-NP modificado com polimixina B e o Poli-NP modificado com colistina, a concordância foi altamente significativa. Além disso, muitos autores já relataram sobre a existência de diferenças entre colistina e polimixina B, principalmente entre as CIMs, que apesar de muito semelhantes, não são idênticas (CHEW et al., 2017; CIELO et al., 2020).

Os resultados de VME e ME observados em ambos os testes significam que a grande maioria dos isolados considerados resistentes pelos métodos testados são verdadeiramente resistentes, sendo aplicáveis para triagem de resistência. Por outro lado, resultados considerados suscetíveis não são confiáveis e precisam ser validados pelo método de referência.

O teste poli-NP modificado foi realizado com três concentrações diferentes, conforme descrito por Dalmolin *et al.* (2016), porém considerando o ponto de corte de sensibilidade preconizado pelo BrCAST, que é de 2 ug/mL, o teste pode ser realizado apenas nesta concentração, tornando o método ainda mais prático e rápido. Outro ponto positivo é alta estabilidade da solução indicadora poli-NP, a qual pode ser armazenada por até um ano à -20°C, possibilitando que uma grande quantidade dessa solução seja produzida em maiores intervalos de tempo, viabilizando ainda mais o teste na rotina laboratorial.

Uma limitação observada neste estudo é que o teste rápido de polimixina NP envolve uma mudança de cor laranja para amarelo, que é instantaneamente aparente para bactérias resistentes, mas para organismos com baixo nível de resistência a interpretação pode exigir mais atenção.

Em resumo, ainda que sejam necessários estudos em maior escala para avaliar a confiabilidade do desempenho do teste Poli-NP modificado, esse método pode ser utilizado para identificar rapidamente portadores de isolados resistentes à polimixina, levando à rápida implementação da terapia a fim de controlar sua disseminação.

## 7 CONCLUSÃO

Os testes realizados neste estudo mostraram uma boa concordância, indicando que o teste Poli-NP modificado é um método colorimétrico que pode ser facilmente implementado em um laboratório de microbiologia de rotina, como teste de triagem inicial, a fim de detectar a resistência à polimixina da grande maioria dos isolados de *Enterobacterales*, sendo um método de preparo rápido e simples, com insumos de baixo custo e resposta ótima em 4 horas.

Apesar de ser necessário o desenvolvimento de mais estudos, a fim de aperfeiçoar o teste e diminuir os erros, principalmente em relação aos casos de falsa-sensibilidade, este estudo possibilitou avaliar o uso de novos métodos de detecção de resistência à polimixina, resultando em uma melhor performance laboratorial, com uma ótima concordância, e o mais importante, exigindo materiais já disponíveis nos laboratórios, assim como um curto tempo de preparo associado a uma fácil execução, tendo como ponto crucial seu potencial de resposta em um curto período de tempo em relação ao método de referência.

Por fim, a aplicabilidade do teste Poli-NP modificado em uma rotina microbiológica permite a possibilidade de uma triagem eficaz, reduzindo o tempo e o trabalho ao realizar a microdiluição em caldo, além de antecipar a tomada de decisão para a imposição da terapia, favorecendo o paciente, visto que o tempo é um critério extremamente importante para um melhor prognóstico.

## 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. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 89, n. 4, p. 324-327, 2017.
- AL-TAWFIQ, J. A.; LAXMINARAYAN, R.; MENDELSON, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 77-84, 2017.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opus\\_web/modulo1/polimixinas6.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opus_web/modulo1/polimixinas6.htm).
- BAKTHAVATCHALAM, Y. D. *et al.* Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 124-136, 2018.
- BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.
- BOUVIER, M. *et al.* RapidResa Polymyxin Acinetobacter NP® Test for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, N. 5, p. 558, 2021.
- BRCAS. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST**, v. 12, p. 88, 2022.
- BRCAS. Controle Interno de Qualidade de Rotina e Estendido para a Determinação da CIM e Disco-Difusão Conforme Recomendações do BrCAST-EUCAS. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST**, v. 11, p. 19, 2021.
- CONCEIÇÃO-NETO, O. C., *et al.* Polymyxin Resistance in Clinical Isolates of *K. pneumoniae* in Brazil: Update on Molecular Mechanisms, Clonal Dissemination and Relationship With KPC-Producing Strains. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 12, p. 898125, 2022.
- DALMOLIN, T. V. *et al.* Detection of Enterobacterales resistant to polymyxins using Rapid Polymyxins NP test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 425-428, 2019a.
- DALMOLIN, T. V. *et al.* Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96, n. 1, p. 114910, 2019b.
- EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 2, p. 37, 2019.
- EL-SAYED AHMED, M. A. E. *et al.* Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance:

an extended review (2000-2019). **Emerg Microbes Infect.**, v. 9, n. 1, p. 868-885, 2020.

EUCAST. EUCAST reading guide for broth microdilution. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST**, v. 4, p. 20, 2022.

EZADI, F.; ARDEBILI, A.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: challenges, issues, and recommendations. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1-20, 2018.

FABIN, G.; VIZZOTTO, B. S. Resistência bacteriana a polimixinas: Uma Revisão dos atuais panoramas Brasileiros e Mundial. **Revista eletrônica Disciplinarium Scientia**, v. 20, n. 2, p. 321-339, 2019.

FALAGAS, M. E.; KYRIAKIDOU, M.; VOULGARIS, G. L. *et al.* Clinical use of intravenous polymyxin B for the treatment of patients with multidrug resistant Gram-negative bacterial infections: An evaluation of the current evidence. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 342–359, 2021.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Brasil). Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>.

GERM, J.; SEME, K.; CERAR, T.; KRIZAN HERGOUTH, V.; PIRS, M. Evaluation of two rapid phenotypical tests-Alifax rapid AST colistin test and Rapid Polymyxin NP test-for detection of colistin resistance in Enterobacterales. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 8, p. 1749-1753, 2021.

GISKE, C. G.; KAHLMETER, G. Colistin antimicrobial susceptibility testing-can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient? **Clin Microbiol Infect.**, v. 24, n. 2, p. 93-94, 2018.

HAMAME *et al.* Mobile Colistin Resistance (*mcr*) Genes in Cats and Dogs and Their Zoonotic Transmission Risks. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 698, 2022.

HUANG, J.; LI, C.; SONG, J.; VELKOV, T.; WANG, L.; ZHU, Y.; LI, J. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. **Future Microbiol.**, v. 15, n. 6 p. 445-459, 2020.

JAYOL, A. *et al.* Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the 333 detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 90–94, 2018.

KED, S.; ROSSATO, L.; LEITE, A. F.; SIMIONATTO, S. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2022.

KELESIDIS, T.; FALAGAS, M. E. The safety of polymyxin antibiotics. **Expert Opin Drug Saf.**, v. 14, n. 11, p. 1687-701, 2015.

KULENGOWSKI, B. *et al.* Effect of increasing meropenem MIC on the killing activity of meropenem in combination with amikacin or polymyxin B against MBL- and KPC-producing

- Enterobacter cloacae. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 92, n. 3, p. 262-266, 2018.
- KWA, A.; KASIAKOU, S. K; TAM, V. H; FALAGAS, M. E. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 5, p. 811-821, 2007.
- LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.
- LESCAT, M.; POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Performances of the Rapid Polymyxin Acinetobacter and Pseudomonas Tests for Colistin Susceptibility Testing. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, 2018.
- 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.
- LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X. *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. 161–168, 2016.
- MATUSCHEK, E. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter spp. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 8, p. 865–870, 1 ago. 2018.
- MOFFATT, J. H.; HARPER, M.; BOYCE, J. D. Mechanisms of Polymyxin Resistance. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1145, p. 55-71, 2019.
- MOTA, F. S.; OLIVEIRA H. A.; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, v. 50, n. 3 p. 270-277, 2018.
- NANG, S. C.; LI, J.; VELKOV T. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. **Crit Rev Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 131-161, 2019.
- NANG, S.C., AZAD M. A. K.; VELKOV, T.; ZHOU, Q.; LI, J. Rescuing the Last-Line Polymyxins: Achievements and Challenges. **Pharmacol Rev.**, v. 73, n. 2, p. 679-728, 2021.
- NORDMANN, Patrice; JAYOL, Aurélie; POIREL, Laurent. 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>.
- NØRGAARD, S. M. *et al.* Choice of therapeutic interventions and outcomes for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative pathogens: a systematic review. **Antimicrob Resist Infect Control.**, v. 4, n. 8, p. 170, 2019.

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

PALMEIRO, J. K. *et al.* Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2019.

PFENNIGWERTH, N. *et al.* Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacterales. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1385–1389, 1 nov. 2019.

POIREL, L. *et al.* The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 75–80, 2015.

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.

OLAITAN, A. O.; LI, J. Emergence of polymyxin resistance in Gram-negative bacteria. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 6, p. 581-582, 2016.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.**, v. 5, n. 643, 2014.

OLIVEIRA, F. A. **Detecção do gene MCR-1 em enterobactérias resistentes à colistina isoladas de amostras clínicas provenientes do complexo hospitalar da UNICAMP.** Dissertação (Mestrado) do Programa de estudos na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2020.

OTSUKA, Y. Potent Antibiotics Active against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 68, n. 3, 182-190, 2020.

POGUE, J. M.; TAM, V.H. Toxicity in Patients. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1145, p. 289-304, 2019.

RODRÍGUEZ-SANTIAGO, J.; CORNEJO-JUÁREZ, P.; SILVA-SÁNCHEZ, J.; GARZARAMOS, U. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 1, n. 58, 2021.

SBM - Sociedade Brasileira de Microbiologia. A ameaça das super Bactérias. **Rev Microb In Foco**, v. 8, n. 31, p. 11-16, 2017.

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.; THI NGUYEN, T. N.; BOINETT, C. J.; BAKER, S.; SIMIONATTO, S. Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Brazil with multiple mgrB gene mutations. **Int J Med Microbiol.**, v. 310, n. 7, p. 151448, 2020.

SILVA, K. E.; ROSSATO, L.; LEITE, A. F.; SIMIONATTO, S. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 55, 2022.

SIMNER, P. J. *et al.* Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 1–7, 2019.

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.

TORRES, D.A. *et al.* Colistin resistance in Gram-negative bacteria analysed by five phenotypic assays and inference of the underlying genomic mechanisms. **BMC Microbiol.**, v. 21, n. 1, p. 321, 2021.

TRAN, T. B. *et al.* Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 6, p. 592-597, 2016.

TSUJI, B. T., *et al.* International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). **Pharmacotherapy**, v. 1, p. 10-39, 2019.

WHO. **World antimicrobial awareness week**. 2020.

WANG, Y.; BERGLUND, B.; ZHU, Y.; LUO, Q.; XIAO, Y. Performance of different methods for testing polymyxin B: comparison of broth microdilution, agar dilution and MIC test strip in mcr-1 positive and negative Escherichia coli. **Lett Appl Microbiol**, v. 73, n. 2, p. 197-205, 2021.

ZAVASCKI, A. P.; NATION, R. L. Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B? **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 3, 2017.



## APÊNDICE A - TABELA COM RESULTADOS OBTIDOS

**Tabela 4** - Resultados obtidos na microdiluição em caldo e nos testes Poli-NP original e Poli-NP modificado para as 147 bactérias testadas

Isolados	MIC (µg/mL)	Microdiluição em caldo	Interpretação dos resultados (R/S)		
			Poli-NP Original	Poli-NP Modificado Colistina	Poli-NP Modificado Polimixina B
<i>K. pneumoniae</i>	0,5	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	S	R	R
<i>E. coli</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	16	R	S	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	16	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,125	S	S	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S

<i>K. pneumoniae</i>	0,5	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	0,5	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	0,125	S	S	R	S
<i>E. coli</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	0,125	S	S	R	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	R	R	R
<i>E. aerogenes</i>	0,25	S	S	S	S
<i>E. aerogenes</i>	16	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	0,25	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	0,25	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	0,12	S	S	S	S
<i>Citrobacter youngae</i>	0,5	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	S
<i>E. coli</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	0,12	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	R	R
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>Citrobacter spp.</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>K. oxytoca</i>	> 32	R	S	S	S
<i>E. coli</i>	< 0,006	S	S	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S

<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	R	R	R
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0,25	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,006	S	S	S	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>E. amnigenus sp.</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	< 0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	32	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	0,125	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	16	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	< 0,06	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	16	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	16	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	0,25	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	32	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	32	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i>	0,125	S	S	S	S
<i>Citrobacter spp.</i>	0,25	S	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	8	R	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	<0,006	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	8	R	S	S	S
<i>E. aerogenes</i>	> 32	R	S	S	S

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

---

<i>K. pneumoniae</i>	> 32	R	S	S	S
----------------------	------	---	---	---	---

---