

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TÁSSIA PÉRES FERNANDES

MÉTODO DE MICROELUIÇÃO COLORIMÉTRICO: DETECÇÃO DA
RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS

MANAUS

2022

TÁSSIA PÉRES FERNANDES

**MÉTODO DE MICROELUIÇÃO COLORIMÉTRICO: DETECÇÃO DA
RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso a ser
apresentado no Curso de Farmácia como
requisito obrigatório para obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a Dr^a Karen Regina Carim da Costa Magalhães

Coorientadora: Prof^a Dr^a Tanise Vendruscolo Dalmolin

MANAUS

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F363m Fernandes, Tássia Péres
Método de microeluição colorimétrico: detecção da resistência à polimixina B em bacilos Gram-negativos / Tássia Péres Fernandes . 2022
25 f.: 31 cm.

Orientadora: Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Coorientadora: Tanise Vendruscolo Dalmolin
TCC de Graduação (Farmácia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Polimixina B. 2. Enterobacteriaceae. 3. Resistência Bacteriana a Antibióticos. . 4. Polymyxins. I. Magalhães, Karen Regina Carim da Costa. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

TÁSSIA PÉRES FERNANDES

**MÉTODO DE MICROELUIÇÃO COLORIMÉTRICO: DETECÇÃO DA
RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso a ser
apresentado no Curso de Farmácia como
requisito obrigatório para obtenção do título de
Farmacêutico.

Aprovado em 27 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Tanise Vendruscolo Dalmolin
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo
Universidade Federal do Amazonas

RESUMO

Nos últimos anos a resistência as polimixinas têm aumentado consideravelmente, portanto é de extrema importância métodos eficientes, confiáveis, rápidos e de fácil interpretação para determinar a suscetibilidade às polimixinas. O presente estudo objetivou desenvolver e avaliar o desempenho de um método de microeluição colorimétrico para detecção da resistência à polimixina B em isolados clínicos de bacilos Gram-negativos. Foram testadas 11 isolados clínicos, sendo 8 *E. coli* e 3 *K. pneumoniae*. O método colorimétrico de microeluição da polimixina B foi uma adaptação do método da eluição da colistina, adicionando resazurina no final do processo. Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos para polimixina B pelo BrCAST. Quando avaliados os resultados da microeluição com e sem a resazurina, 7 isolados estavam em concordância categórica e 9 e 10 isolados, respectivamente, em concordância essencial com o método de referência. Diante do exposto, podemos concluir que tanto o teste da microeluição como o teste colorimétrico de microeluição da polimixina B demonstraram facilidade de realização, além de requerer materiais comumente encontrados em laboratórios de microbiologia de rotina. Ademais, um método envolvendo a polimixina B, a qual é a polimixina utilizada no Brasil, vem fomentar o estudo de novos testes de suscetibilidade frente às polimixinas.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*. Polimixina B. Polimixinas. Resistência Bacteriana a Antibióticos.

ABSTRACT

In the last years, the reports of polymyxins resistance have increased considerably, so efficient, reliable, fast and easily interpreted testing to determine polymyxins susceptibility is necessary. The present study aimed to develop and evaluate the performance of a colorimetric microelution method for detecting polymyxin B resistance in clinical isolates of Gram-negative bacilli. The tests were performed with 11 clinical isolates, including 8 *E. coli* and 3 *K. pneumoniae*. The colorimetric polymyxin B microelution method was an adaptation of the colistin broth disk elution test, adding resazurin at the end of the process. The results were interpreted using the breakpoints of the BrCAST. When evaluating the microelution results with and without resazurin, 7 isolates presented categorical agreement and 9 and 10 isolates, respectively, presented essential agreement with the reference method. In conclusion, both polymyxin B microelution test and the colorimetric polymyxin B microelution test were easy to perform, requiring materials commonly found in routine microbiology laboratories. Furthermore, a method involving polymyxin B, which is the polymyxin used in Brazil, encourages the study of new susceptibility tests against polymyxins.

Keywords: *Enterobacteriaceae*. Polymyxins. Polymyxin B. Bacterial resistance to antibiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teste da microeluição da polimixina B.....	14
Figura 2 - Leitura do teste colorimétrico da microeluição da polimixina B..	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos isolados clínicos de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> utilizados no estudo.....	12
Tabela 2 - Teste da microeluição da polimixina B e teste colorimétrico da microeluição da polimixina B.....	17
Tabela 3 - Resultados do teste da microeluição da polimixina B e teste colorimétrico da microeluição da polimixina B comparados ao método de referência (microdiluição em caldo).....	18

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
METODOLOGIA	12
Isolados bacterianos	12
Teste da microeluição da polimixina B	12
Teste colorimétrico da microeluição da polimixina B	15
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23

INTRODUÇÃO

Os bacilos Gram-negativos fermentadores são frequentemente associados a infecções hospitalares e nos últimos anos esses micro-organismos vêm apresentando resistência a vários antimicrobianos (DELIBERALI et al.; 2011). Essa resistência gera uma grande preocupação devido à sua rápida disseminação, limitando as opções terapêuticas e representando uma ameaça aos antimicrobianos já existentes na prática clínica. Os carbapenêmicos são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos, porém o aumento da sua utilização na prática clínica tem influenciado a disseminação de micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos (GARG et al., 2017).

Atualmente, as polimixinas são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos e a outros antibióticos (GALES et al.; 2011). As polimixinas são comercializadas como polimixina B e polimixina E (também denominada colistina), ambas derivadas do micro-organismo *Bacillus polymyxa* (KVITKO, 2010).

As polimixinas compreendem antibióticos polipeptídicos básicos com uma cadeia lateral terminada por ácidos graxos característicos. As pequenas diferenças entre a polimixina B e colistina se encontram na sua estrutura, enquanto a polimixina B apresenta D-fenilalanina, na mesma posição, na colistina, está presente o aminoácido D-leucina. Ambas demonstram atividade antimicrobiana significativa contra a maioria das enterobactérias, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (KVITKO, 2010).

A colistina foi descoberta em 1947, tendo sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1959. Até 1962 observou-se que seu uso parenteral por longos períodos causava nefrotoxicidade e neurotoxicidade, portanto, a partir da década de 80, a administração das polimixinas ficou restrita à usos oftálmicos e tópicos. No entanto, com a crescente prevalência de bactérias Gram-negativas multirresistentes, as polimixinas foram reintroduzidas para uso clínico como valiosas opções terapêuticas (POIREL et al., 2017). A colistina é administrada como um pró-fármaco inativo, o metanossulfonato de colistina, o qual é convertido *in vivo* em sua forma ativa, a colistina (EUCAST,

2010; GALES et al.; 2011). Já a polimixina B é administrada diretamente, por via intravenosa, como o antibacteriano ativo, sulfato de polimixina B (MOUBARECK, 2020).

Devido à sua natureza de carga positiva, as polimixinas se ligam aos grupos fosfatos dos lipídios da membrana dos bacilos Gram-negativos, que estão carregados negativamente. Essa ligação desloca cátions divalentes Ca^2 e Mg^2 e desestabiliza o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, consequentemente alterando a permeabilidade das membranas, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e causando a morte bacteriana. A modificação das moléculas de LPS bacteriano é o principal mecanismo responsável pela resistência às polimixinas em bactérias Gram-negativas, resultado de mutações cromossômicas e ocorre frequentemente pela síntese, transporte transmembrana e ligação de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PEtN) à um grupo fosfato no lipídio A do LPS bacteriano. Posteriormente, o lipídio A modificado reduz a afinidade das polimixinas levando à resistência (EZADI et al., 2019).

Em 2015, Liu e colaboradores reportaram a descoberta de resistência às polimixinas mediada por plasmídeos carregando o gene denominado *mcr-1*. Esta descoberta modificou o cenário acerca das resistências às polimixinas e gerou grande preocupação mundial (LIU et al., 2016). O gene *mcr-1* promove a adição da fração PEtN ao lipídeo A, similarmente ao que ocorre nas mutações cromossomais, resultando na redução da afinidade às polimixinas e resistência, porém em um grau inferior quando comparado à resistência cromossomal (EZADI et al., 2019).

Sader e colaboradores (2011), durante o período de 2006 a 2009, analisaram 9774 isolados de *Klebsiella* spp. coletados em 157 centros médicos provenientes de 31 nações da América do Norte, Europa, América Latina e Ásia. Os resultados demonstram que houve um aumento contínuo da resistência às polimixinas nos últimos 4 anos na América do Norte (de 1,2% para 2,0%), América Latina (de 1,3% para 3,0%) e Ásia (de 0,3% para 1,6%). Além disso, foi observada a associação da resistência às polimixinas com isolados resistentes ao imipenem (n = 406).

Os testes de suscetibilidade frente às polimixinas apresentam diversos obstáculos, dentre eles a baixa difusão das polimixinas no ágar e propriedades

catiônicas inerentes (POIREL et al.; 2017). Os comitês internacionais *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), bem como o comitê brasileiro (BrCAST) preconizam a microdiluição em caldo como o método de referência para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das polimixinas (BAKTHAVATCHALAM et al., 2010; BrCAST, 2021).

O aumento do uso de polimixinas em pacientes críticos exige rapidez, precisão e, principalmente, um método confiável para determinar a suscetibilidade às polimixinas. Portanto, diversos testes têm sido relatados como alternativas ao teste de referência, dentre eles o método de eluição da colistina (SIMNER et al., 2019).

Diante disso, este estudo objetiva desenvolver e avaliar o desempenho de um método de microeluição colorimétrico para detecção da resistência à polimixina B em isolados clínicos de bacilos Gram-negativos.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos

Foram utilizados isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, caracterizados quanto a sua identificação e perfil de suscetibilidade frente a polimixina B por microdiluição em caldo. Os isolados foram cedidos do banco de bactérias do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS, o qual dispõe de uma coleção de aproximadamente 6000 amostras de bacilos Gram-negativos, provenientes de estudos de vigilância (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* utilizados no estudo.

Nº do isolado	Espécie	CIM para polimixina B (microdiluição em caldo)	Gene de resistência para polimixinas
13891	<i>E. coli</i>	2 µg/mL	<i>mcr-1</i>
3431	<i>E. coli</i>	4 µg/mL	<i>mcr-1</i>
1519	<i>E. coli</i>	64 µg/mL	-
6699	<i>E. coli</i>	4 µg/mL	<i>mcr-1</i>
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	0,25 µg/mL	-
234	<i>E. coli</i>	2 µg/mL	<i>mcr-1</i>
17185	<i>E. coli</i>	2 µg/mL	<i>mcr-1</i>
14065	<i>E. coli</i>	2 µg/mL	<i>mcr-1</i>
2242	<i>K. pneumoniae</i>	32 µg/mL	-
2076	<i>K. pneumoniae</i>	32 µg/mL	-
2702	<i>K. pneumoniae</i>	0,25 µg/mL	-

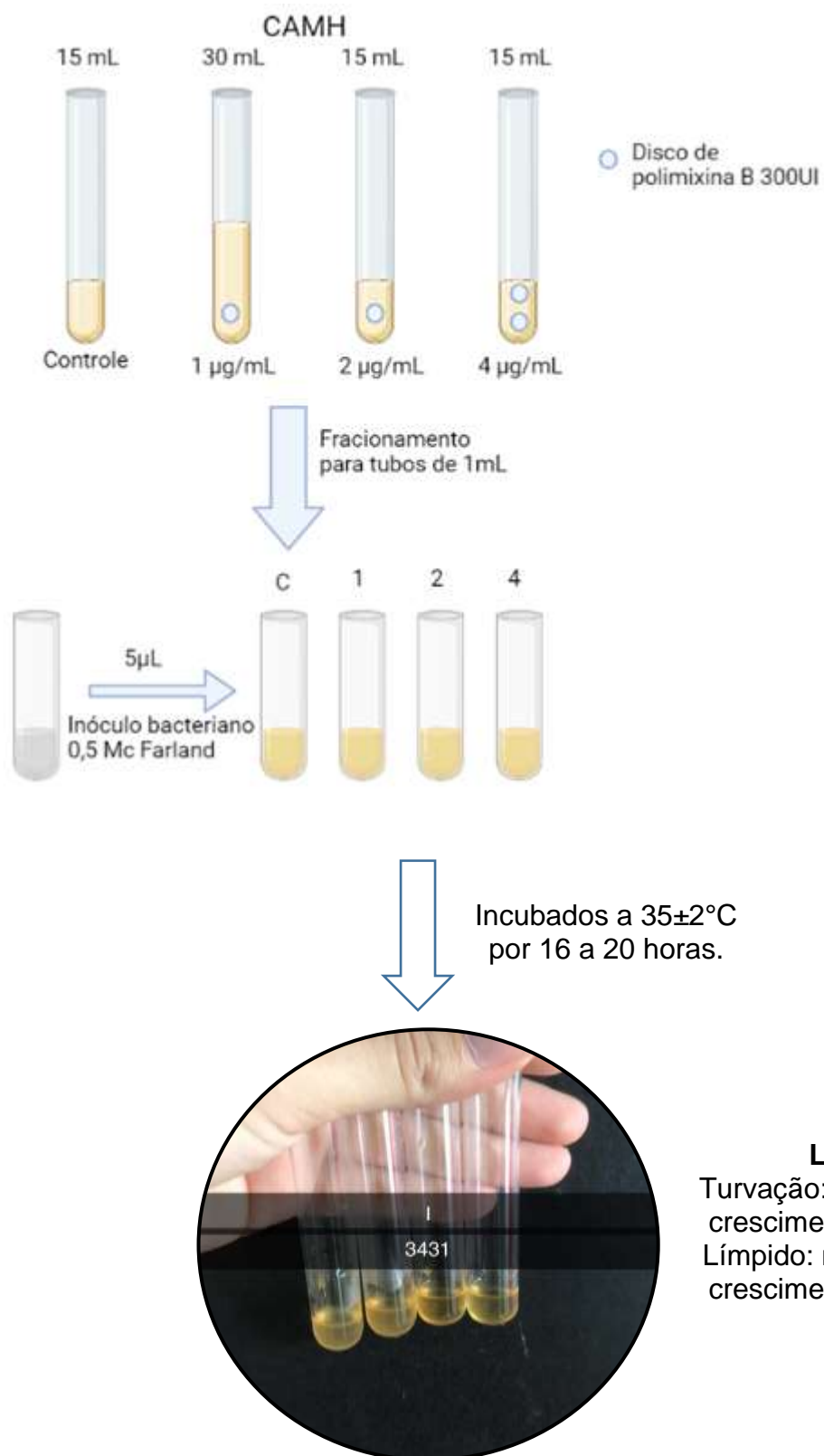
Teste da microeluição da polimixina B

O teste de microeluição da polimixina B foi adaptado de Simner e colaboradores (2019). Para execução do teste foram utilizados discos de antibiótico contendo polimixina B (300 UI) e quatro tubos de vidro com capacidade para 30 mL. No primeiro tubo foi adicionado somente o meio de cultura Mueller Hinton Cation Ajustado (CAMH), o qual foi utilizado para o

controle de viabilidade do micro-organismo teste. No segundo tubo foram adicionados 30 mL de meio de cultura CAMH acrescido de um disco de polimixina B, obtendo-se uma concentração de 1 µg/mL. No terceiro tubo foram adicionados 15 mL do meio de cultura CAMH, com um disco de polimixina B resultando na concentração de 2 µg/mL e no quarto e último tubo foram acrescentados 15 mL do meio CAMH e dois discos de polimixina B, resultando em uma concentração de 4 µg/mL. Após a adição dos discos de antibióticos, aguardou-se 1 hora para eluição da polimixina B dos discos. Em seguida o volume dos tubos foi fracionado para 1 mL com o objetivo de otimizar o teste.

A suspensão do inóculo foi preparada a partir de colônias de 24 h crescidas em Ágar Triptona de Soja e padronizadas para escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Uma alíquota de 5 µL da suspensão bacteriana padronizada foi adicionada em cada um dos 4 tubos e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas, conforme figura 1.

Figura 1 - Teste da microeluição da polimixina B



Fonte: Os autores (2022).

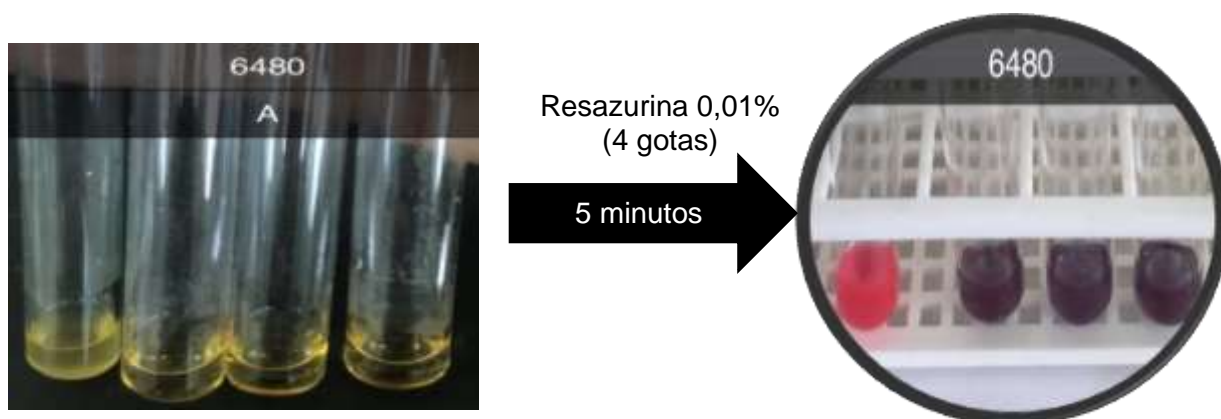
Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos para polimixina B pelo BrCAST observando a ocorrência ou não da turbidez nos tubos. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visivelmente detectável. Isolados bacterianos com CIM $\leq 2\mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis e CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes à polimixina B. Os testes foram realizados em duplicatas.

Teste colorimétrico da microeluição da polimixina B

Com a finalidade de otimizar a visualização da técnica de microeluição, propomos o teste colorimétrico de microeluição da polimixina B. O teste foi realizado igualmente ao da microeluição da polimixina B, porém na etapa de leitura dos resultados foi adicionado 4 gotas do indicador resazurina (0,01%), uma vez que permite a detecção de crescimento microbiano em volumes extremamente pequenos sem o uso de espectrofotômetro (SARKER et al., 2007).

Após 5 minutos da adição do indicador foi realizada a leitura dos testes. O tubo contendo coloração azul/roxo foi considerado negativo para o crescimento bacteriano, enquanto o tubo com coloração avermelhada/rosa foi considerado positivo para o crescimento bacteriano. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visivelmente detectável. Os pontos de corte adotados foram os estabelecidos para polimixina B pelo BrCAST. Isolados bacterianos com CIM $\leq 2\mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis e CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes à polimixina B. Os testes foram realizados em duplicatas (Figura 2).

Figura 2 - Leitura do teste colorimétrico da microeluição da polimixina B



Fonte: Os autores (2022).

Os resultados obtidos nos testes de microeluição com e sem a resazurina foram comparados com os valores obtidos na microdiluição em caldo (método de referência). Foram avaliadas a concordância categórica, a qual é definida como isolados que produzem o mesmo resultado de categoria sensível ou resistente em comparação com o método de referência; e concordância essencial, a qual é definida como isolados que produzem CIM que estão dentro de ± 1 diluição do método de referência.

RESULTADOS

Foram utilizados 11 isolados bacterianos, dentre os quais, 3 eram *K. pneumoniae* e 8 eram *E. coli*. Dentre os isolados, 6 eram sensíveis à polimixina B e 5 eram resistentes, de acordo com o método de referência microdiluição em caldo. Além disso, 6 isolados apresentavam o gene de resistência *mcr-1*, sendo que em apenas 2 isolados este gene realmente conferiu resistência à polimixina B. Os resultados para o teste de microeluição da polimixina B e o teste colorimétrico da microeluição da polimixina B estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Teste da microeluição da polimixina B e teste colorimétrico da microeluição da polimixina B.

Isolado	Espécie	CIM (µg/mL) por microdiluição em caldo/ categorização	CIM (µg/mL) por microeluição da polimixina B/categorização	CIM (µg/mL) por teste colorimétrico da microeluição da polimixina B/categorização
13891	<i>E. coli</i>	2/S	4/R	4/R
3431	<i>E. coli</i>	4/R	>4/R	>4/R
1519	<i>E. coli</i>	64/R	>4/R	>4/R
6699	<i>E. coli</i>	4/R	4/R	4/R
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	0,25/S	≤1/S	2/S
234	<i>E. coli</i>	2/S	4/R	4/R
17185	<i>E. coli</i>	2/S	4/R	>4/R
14065	<i>E. coli</i>	2/S	>4/R	>4/R
2242	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	>4/R	4/R
2076	<i>K. pneumoniae</i>	32/R	>4/R	>4/R
2702	<i>K. pneumoniae</i>	0,25/S	≤1/S	2/S

S: sensível. R: resistente.

Quando avaliado os resultados da microeluição com e sem a resazurina, 7 isolados estavam em concordância categórica e 9 e 10 isolados,

respectivamente, em concordância essencial com o método de referência, conforme Tabela 3.

Cabe ressaltar que os 3 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram concordância categórica e concordância essencial de 100% na microdiluição com e sem a resazurina.

Tabela 3: Resultados do teste da microeluição da polimixina B e teste colorimétrico da microeluição da polimixina B comparados ao método de referência (microdiluição em caldo.)

CIM – Microdiluição em caldo (teste de referência)					
CIM – microeluição da polimixina B		≤1	2	4	>4
	≤1	2			
	2				
	4		3 ^a	1	
	>4		1 ^a	1	3
CIM – Microdiluição em caldo (teste de referência)					
CIM – teste colorimétrico de microeluição da polimixina B		≤1	2	4	>4
	≤1				
	2	2			
	4		2 ^a	1	1
	>4		2 ^a	1	2

Destaque em cinza: CIM idêntica com CIM do método de referência.

^a: Divergência na classificação sensível/resistente.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos a utilização das polimixinas tem aumentado consideravelmente, assim como o número de micro-organismos resistentes a estes antimicrobianos. A criação de testes rentáveis, rápidos e confiáveis para verificar a suscetibilidade de isolados a esse grupo de antimicrobianos se faz necessária. O teste de referência para determinar a CIM é a microdiluição em caldo, a qual é uma técnica facilmente reproduzível, segura, sendo a mecanização uma possibilidade. Porém, a microdiluição em caldo é muito trabalhosa e quando suas soluções são feitas de forma manual, erros consideráveis podem ocorrer (DALMOLIN et al., 2018).

Testes alternativos para verificação da suscetibilidade as poliximinas já existem, dentre eles podemos citar a técnica denominada eluição da colistina, a qual foi utilizada como referência para esse trabalho, com algumas modificações como a substituição da colistina pela polimixina B e a adição da resazurina para facilitar a visualização e leitura dos resultados, anteriormente observada somente através da turbidez do meio de cultura. Os testes de eluição têm como vantagens a facilidade de acesso e baixo custo dos materiais utilizados, bem como a substituição do pó do antimicrobiano por discos (SIMNER et al., 2019).

Além disso, a utilização de tubos de vidro em substituição às placas de microtitulação objetiva obter a diminuição da adesão das polimixinas nas placas de poliestireno, devido a sua propriedade policatiônica. Essa adesão acarreta uma diminuição da concentração dos antibióticos durante os experimentos *in vitro*, como os ensaios de avaliação da suscetibilidade, resultando em dados não confiáveis de procedimentos laboratoriais padrão (SHARAFI; ARDEBILI, 2019).

O método de eluição da colistina, descrito por Simner e colaboradores, obteve uma concordância categórica de 98% e concordância essencial de 99% em comparação com o método de referência. Foram observados “*Very major erros - VME*” (resultado sensível pelo novo método e resistente pelo método de referência) em cepas produtoras do gene *mcr-1*, os quais produziram CIM de 2µg/mL no teste de eluição da colistina e 4µg/mL por microdiluição em caldo. A partir desses resultados, recomenda-se que resultados de CIM de 2µg/mL para colistina obtidos pelo teste da eluição devam ser confirmados pelo método de

referência (microdiluição em caldo) e avaliados quanto à presença do gene *mcr-1*.

Em nosso estudo, obtivemos 4 isolados com categorização divergente quando comparados ao método de referência. Todos esses isolados apresentavam o gene *mcr-1* e CIM de 2µg/mL por microdiluição em caldo e ≥4µg/mL pelos testes de microeluição. Isso demonstra e reforça a fragilidade dos testes de eluição próximo ao *breakpoint* tanto para colistina, como para polimixina B.

Humphries e colaboradores (2019) encontraram que 94,4% dos resultados de eluição da colistina estavam em concordância essencial e 97,9% em concordância categórica com a CIM de microdiluição em caldo. Foram observados 3,2% VME e 0,9% “Major erros - ME” (resultados resistentes pelo novo método e sensíveis pelo método de referência). Quando observadas apenas enterobactérias, o teste de eluição da colistina obteve 98,6% de concordância categórica (2,5% VME, 0% ME), 99,3% para *P. aeruginosa* (0% VME, 0,7% ME) e 93,1% para *Acinetobacter* spp. (5,6% VME, 3,3% ME) (HUMPHRIES et al., 2019).

Cielo e colaboradores (2020), avaliaram 196 enterobactérias, as quais 17,3% dos isolados apresentavam CIMs limítrofes (2 ou 4µg/mL). A eluição do disco de polimixina B demonstrou um excelente desempenho, com concordância categórica com a microdiluição em caldo de 99,5%, e apresentando 1,1% de VME e nenhum ME. Apenas um isolado de *K. pneumoniae* foi resistente na microdiluição em caldo e sensível pela eluição do disco de polimixina B (CIELO et al., 2020).

Dalmolin e colaboradores (2020) realizaram os seguintes testes: microeluição da colistina (CBM), microeluição da colistina em placa (MPT) e tubo único de suscetibilidade à colistina (CSTT). Todos testes apresentaram boa concordância categórica, concordância essencial, sensibilidade e especificidade. Os resultados para isolados não fermentadores não foram satisfatórios. Os métodos propostos, principalmente o tubo único, podem ser usados como testes de triagem para detectar resistência à colistina, uma vez que são opções fáceis e baratas frente ao método de referência (DALMOLIN et al., 2020).

Cabe salientar que este trabalho trata de um estudo piloto para desenvolvimento e avaliação inicial de um novo método. Novos estudos com um maior número de isolados clínicos devem ser realizados para aferir os parâmetros do método proposto, dentre eles sensibilidade, especificidade, VME e ME. Além disso, bacilos Gram-negativos não fermentadores devem ser adicionados a posteriores estudos a fim de avaliar a eficiência desta técnica neste grupo de micro-organismos.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, tanto o teste da microeluição como o teste colorimétrico de microeluição da polimixina B demonstraram facilidade de realização, além de requerer materiais comumente encontrados em laboratórios de microbiologia de rotina.

Ademais, a maioria dos testes alternativos ao método de referência de suscetibilidade das polimixinas são relacionados à colistina e não à polimixina B. Portanto um método envolvendo a polimixina B, a qual é a polimixina utilizada no Brasil, vem fomentar o estudo de novos testes de suscetibilidade frente às polimixinas.

REFERÊNCIAS

BAKTHAVATCHALAM, Yamuna Devi; PRAGASAM, Agila Kumari; BISWAS, Indranil; VEERARAGHAVAN, Balaji. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: an update. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 124-136, mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>.

BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versão 2.0. 2021.

CIELO, Naiany 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, p. 115099, out. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115099>.

DALMOLIN, Tanise Vendruscolo; et al. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 96, n. 1, p. 114910, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910>.

DALMOLIN, Tanise Vendruscolo; LIMA-MORALES, Daiana; BARTH, Afonso Luis. Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? **Journal of Infectiology**, v. 1, n. 2, p. 16-22, 2018.

DELIBERALI, Bruno; et al. Prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de pacientes internados em Porto Alegre-RS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 529-534, out. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442011000500006>.

EUCAST. Colistin. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.0. n. October, p. 1–14, 2010.

EZADI, Fereshteh; ARDEBILI, Abdollah; MIRNEJAD, Reza. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: challenges, issues, and recommendations. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1-20, abr. 2019. <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). **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2070-2074, 29 jun. 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr239>.

GARG, Suneel Kumar; et al. Resurgence of Polymyxin B for MDR/XDR Gram-Negative Infections: an overview of current evidence. **Critical Care Research And Practice**, v. 2017, p. 1-10, 2017. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3635609>.

HUMPHRIES, Romney M.; et al. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a report from the clinical and laboratory standards institute. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 1-10, nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01269-19>.

KVITKO, Carlos Henrique Cezimbra. **Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa***. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LIU, Yi-Yun; et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, fev. 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7).

MOUBARECK, Carole Ayoub. Polymyxins and Bacterial Membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. **Membranes**, v. 10, n. 8, p. 181, 8 ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/membranes10080181>.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00064-16>.

SADER, Helio S.; FARRELL, David J.; JONES, Ronald N. Susceptibility of Klebsiella spp. to colistin and polymyxin B: results from the sentry antimicrobial surveillance program (2006-2009). **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 2, p. 174-175, fev. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.10.005>.

SARKER, Satyajit D.; NAHAR, Lutfun; KUMARASAMY, Yashodharan. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, ago. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>.

SHARAFI, Toktam; ARDEBILI, Abdollah. Plastic binding feature of polymyxins: the effect on mic susceptibility measurements. **Infection And Drug Resistance**, v. 12, p. 2649-2653, ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s219130>.

SIMNER, Patricia J.; et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 1-7, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01163-18>.