

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
INSTITUTO BIOMÉDICO  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**BEATRIZ DIAS LIMA**

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA A POLIMIXINAS ENTRE AMOSTRAS CLÍNICAS  
DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS ATRAVÉS DO TESTE DA GOTA E  
DO SISTEMA COMERCIAL POLICIMBAC®**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ANÁLISES CLÍNICAS**

**NITERÓI  
2023**

BEATRIZ DIAS LIMA

DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS ENTRE AMOSTRAS CLÍNICAS  
DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS, ATRAVÉS DO TESTE DA GOTA E  
DO SISTEMA COMERCIAL POLICIMBAC®

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal  
Fluminense como requisito para obtenção  
do Grau de Bacharel. Área de  
Concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Rezende Vieira de Mendonça Souza

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas

NITERÓI  
2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

L732d Lima, Beatriz Dias  
Detecção da resistência a polimixinas entre amostras clínicas de bacilos Gram-negativos através do teste da Gota e do sistema comercial Policimbac® / Beatriz Dias Lima. - 2023.  
69 f.

Orientador: Claudia Rezende Vieira de Mendonça Souza.  
Coorientador: Thiago Pavoni Gomes Chagas.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)-Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Niterói, 2023.

1. Microbiologia. 2. Testes de sensibilidade bacteriana. 3. Polimixina. 4. Resistência a antibióticos. 5. Produção intelectual. I. Souza, Claudia Rezende Vieira de Mendonça, orientadora. II. Chagas, Thiago Pavoni Gomes, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD - XXX

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CURSO DE BIOMEDICINA

FOLHA DE APROVAÇÃO

BEATRIZ DIAS LIMA

DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS ENTRE AMOSTRAS CLÍNICAS  
DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS ATRAVÉS DO TESTE DA GOTA E  
DO SISTEMA COMERCIAL POLICIMBAC®

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Biomedicina da  
Universidade Federal Fluminense como requisito  
para obtenção do Grau de Bacharel. Área de  
Concentração: Análises Clínicas

Aprovado em: 14 de julho de 2023

Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Cláudia R. V. de Mendonça Souza/ Universidade Federal Fluminense  
(Membro Titular)

---

Dra. Nathalia de Arruda Costa Camacho Rebello/ Hospital Universitário Antônio Pedro  
(Membro Titular)

---

Me. André Luís dos Santos/ Hospital Universitário Antônio Pedro  
(Membro Titular)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a vida e sempre estiveram ao meu lado.

À Cléo (*in memoriam*), por toda a sua lealdade, amor e companhia.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, a fé foi minha força motriz.

Aos meus pais, Áurea, Beto e Odair, dispostos a qualquer sacrifício em prol do meu futuro. Sem vocês eu não conseguiria ter chegado aqui! Obrigada por todo o apoio, amor e força!

Aos meus irmãos e à minha família, que sempre acreditaram e torceram por mim.

Aos professores doutores Cláudia Souza e Thiago Chagas, pela orientação, confiança e apoio para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço por aceitarem me acompanhar nesta jornada!

À Larissa, que sempre esteve comigo nos momentos que mais precisei. A sua amizade e o seu apoio incondicional foram cruciais nessa minha trajetória.

À Rainiela, sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, o seu incentivo foi muito importante para que eu chegasse até aqui.

À Pâmella, a sua força também me inspirou a ser mais forte e me encorajou a seguir meus sonhos e a não desistir.

À Stefani e a Vivi, com vocês não tem tempo ruim, vocês tornam a minha vida mais especial!

À Paula e a Gabi, por todos os momentos de risadas e diversão que compartilhamos juntas, a alegria contagiante de vocês iluminou meus dias no ECO I.

Aos meus amigos de ensino médio, pelas palavras encorajadoras e apoio!

À Cátia, professora de Microbiologia do ensino médio, que fez eu me encantar pela Microbiologia e foi a minha inspiração para a escolha do curso.

À Yasmin e à Letícia, por toda a ajuda durante este processo. Vocês foram muito importantes para que este trabalho ganhasse vida!

À turma 2017.1, a melhor turma da Biomedicina!

Aos profissionais do Hospital Universitário Antônio Pedro, que me apoiaram e me ajudaram para esta etapa tão importante.

Aos professores da UFF, pelos ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho profissional ao longo do curso.

À Coordenação do Curso de Biomedicina, que me guiou nesse caminho.

A PROAES e a UFF que me acolheram e me auxiliaram para a permanência no curso.

Agradeço a todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho!

*“Ei, eu vou continuar em frente,  
porque os vencedores não  
desistem de si mesmos.”*

(Knowles, Beyoncé)

## RESUMO

Entre os bacilos Gram-negativos (BGN), *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* se destacam como importantes patógenos oportunistas, especialmente no ambiente hospitalar. Esses patógenos são causas importantes de infecções associadas à assistência à saúde, tais como as da corrente sanguínea, do trato respiratório e as urinárias, relacionadas principalmente com *Klebsiella pneumoniae*, bem como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A resistência bacteriana tem se tornado um problema de saúde pública mundial, resultando em uma maior dificuldade no tratamento de infecções, uma vez que restringe o arsenal terapêutico disponível. Nesse contexto, as polimixinas foram reintroduzidas na clínica médica, sendo considerada uma das poucas opções para o tratamento de infecções graves causadas por BGN multirresistentes. Porém, a emergência de amostras resistentes às polimixinas tem sido observada nos últimos anos. O método de referência para a detecção de resistência a polimixina é o da microdiluição em caldo, entretanto esse método é custoso e laborioso, sendo de difícil implementação na rotina laboratorial. Desta maneira, métodos fenotípicos alternativos têm sido propostos. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do desempenho do teste da gota (*Colispot*) e do sistema comercial Policimbac<sup>®</sup>, frente ao da microdiluição em caldo, entre amostras clínicas de BGN. No estudo, foram analisadas 23 amostras de bacilos Gram-negativos (16 de *K. pneumoniae*, três *P. aeruginosa*, três de *A. baumannii* e uma de *Providencia stuartii*), isoladas entre os anos de 2019 e 2023 e obtidas de diferentes materiais clínicos provenientes de pacientes assistidos em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro. A confirmação da identificação das amostras foi realizada através da técnica de espectrometria de massa MALDI TOF. Os perfis de susceptibilidade frente a polimixina B foram verificados através da microdiluição em caldo e frente a beta-lactâmicos, de testes de disco-difusão. As amostras resistentes a carbapenêmicos foram submetidas aos métodos de inativação do carbapenêmico modificado (CIMm) e de inativação do carbapenêmico com EDTA (CIME). Todas as amostras foram analisadas através do sistema comercial Policimbac<sup>®</sup> e do teste da gota, em três concentrações de colistina (4, 8 e 16 µg/mL). Foram detectadas 18 amostras resistentes à polimixina (*K. pneumoniae* = 12; *P. aeruginosa* = 3; *A. baumannii* = 2; *P. stuartii* = 1) e cinco sensíveis (*K. pneumoniae* = 4; *A. baumannii* = 1), de acordo com o método de microdiluição em caldo. Um total de 20 amostras (87%) apresentou resistência aos carbapenêmicos e dessas, 17 (85%) eram resistentes a polimixina. Foi obtida uma concordância categórica (CA) de 95,7%, concordância essencial (EA) de 56,5%, erro grave (ME) de 4,3% e nenhum erro muito grave (VME), nos resultados do Policimbac<sup>®</sup>. Em relação ao teste da gota, se verificou uma concordância categórica de 78,3% e de 4,3% e 17,3% de ME e VME para a concentração de 4 µg/mL; e uma concordância categórica de 65,2% e um percentual de 4,3% e de 30,4% de ME e VME, respectivamente, nos testes nas concentrações de 8 e 16 µg/mL. A sensibilidade e a especificidade obtidas para os métodos alternativos utilizados foram de 100% e 83,3% para o Policimbac<sup>®</sup>, respectivamente e de 81,8% e 83,3% para o teste da gota na concentração de 4 µg/mL. Para as concentrações de 8 e 16 µg/mL observou-se uma sensibilidade de 72% e especificidade de 83,3%. Os resultados demonstraram um melhor desempenho do Policimbac<sup>®</sup> em relação ao teste da gota, que apresentou percentuais de CA, ME e VME fora dos limites aceitáveis, independente da concentração de colistina utilizada.

**Palavras-chave:** Bacilos Gram-negativos. Resistência a polimixinas. Detecção laboratorial.



## ABSTRACT

Among Gram-negative bacilli (GNB), *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* stand out as important opportunistic pathogens, especially in the hospital environment. These pathogens are important causes of healthcare-associated infections, such as bloodstream, respiratory tract, and urinary tract infections, mainly related to *Klebsiella pneumoniae*, as well as *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. Bacterial resistance has become a worldwide public health problem, resulting in increased difficulty in treating infections as it restricts the available therapeutic arsenal. In this context, polymyxins have been reintroduced in medical practice, being considered one of the few options for the treatment of severe infections caused by multidrug-resistant BGN. However, the emergence of polymyxin-resistant samples has been observed in recent years. The reference method for the detection of polymyxin resistance is broth microdilution, but this method is costly and laborious, and difficult to implement in routine laboratory practice. Thus, alternative phenotypic methods have been proposed. The aim of the present study was to evaluate the performance of the *Colispot* drop test and the Policimbac<sup>®</sup> commercial system, in comparison to broth microdilution among BGN clinical samples. In the study, 23 strains of Gram-negative bacilli (16 *K. pneumoniae*, three *P. aeruginosa*, three *A. baumannii* and one *Providencia stuartii*), isolated between the years 2019 to 2023 and obtained from different clinical materials from patients seen at hospitals in the metropolitan region of Rio de Janeiro, were analyzed. The identification of the samples was confirmed using the MALDI TOF mass spectrometry technique. The susceptibility profiles against polymyxin B were verified by broth microdilution and against beta-lactams, by disk-diffusion tests. The strains resistant to carbapenems were submitted to the methods of modified carbapenem inactivation (CIMm) and carbapenem inactivation with EDTA (CIME). All strains were analyzed using the commercial Policimbac<sup>®</sup> system and the drop test at three concentrations of colistin (4, 8 and 16 µg/mL). Eighteen polymyxin resistant (*K. pneumoniae* = 12; *P. aeruginosa* = 3; *A. baumannii* = 2; *P. stuartii* = 1) and five sensitive (*K. pneumoniae* = 4; *A. baumannii* = 1) strains were detected according to the broth microdilution method. A total of 20 samples (87%) showed resistance to carbapenems, and of these, 17 (85%) were resistant to polymyxin. A categorical agreement (CA) of 95.7%, essential agreement (EA) of 56.5%, 4.3% of major errors (ME) and no very major errors (VME) were obtained in the results of the Policimbac<sup>®</sup>. Regarding the drop test, there was a categorical agreement of 78.3% and 4.3% and 17.3% of ME and VME for the concentration of 4µg/mL; and a categorical agreement of 65.2% and a percentage of 4.3% and 30.4%, respectively of ME and VME, in the tests in concentrations of 8 and 16µg/mL. The sensitivity and specificity obtained for the alternative methods used were 100% and 83.3% for Policimbac<sup>®</sup>, respectively, and 81.8% and 83.3% for the drop test at the 4µg/mL concentration. For the concentrations of 8 and 16 µg/mL a sensitivity of 72% and specificity of 83.3% were observed. The results showed a better performance of Policimbac<sup>®</sup> in relation to the drop test, which presented percentages of CA, ME and VME outside acceptable limits, regardless of the concentration of colistin used.

**Key words:** Gram-negative bacilli. Polymyxin resistance. Laboratory detection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Imagem ilustrativa do teste de microdiluição em caldo, com a determinação das concentrações mínimas inibitórias frente a polimixina B, entre amostras de bacilos Gram-negativos. **p.35**

**Figura 2.** Imagem ilustrativa de testes CIMm & CIMe. **p.38**

**Figura 3.** Imagem ilustrativa do teste comercial de microdiluição em caldo Policimbac<sup>®</sup> (Probac do Brasil). **p.38**

**Figura 4A/B.** Imagem ilustrativa do teste da gota, na concentração de 4 µg/mL. **p.39**

**Figura 5.** Distribuição de 23 bacilos Gram-negativos, isolados a partir de diversos materiais clínicos de pacientes atendidos em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, de acordo com a espécie. **p.42**

**Figura 6.** Distribuição dos valores de concentrações mínimas inibitórias frente a polimixina B, obtidos nos testes de microdiluição em caldo convencional, entre 23 amostras de bacilos Gram-negativos. **p.43**

**Figura 7.** Distribuição dos valores de concentrações mínimas inibitórias frente a polimixina B, obtidos no teste comercial Policimbac<sup>®</sup>, entre 23 amostras de bacilos Gram-negativos. **p.47**

**Figura 8.** Correlação entre os valores de concentrações mínimas inibitórias obtidos nos testes de microdiluição em caldo e de microdiluição comercial (Policimbac<sup>®</sup>), de 23 amostras de bacilos Gram-negativos. **p.49**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Comparação entre os resultados obtidos dos resultados dos testes de Policimbac<sup>®</sup> e da Gota para as 23 amostras de bacilos Gram-negativos, frente ao método de microdiluição em caldo. **p.48**

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Características das 23 amostras de bacilos Gram-negativos incluídas no estudo. **p.33**

**Quadro 2.** Interpretação dos valores dos escores obtidos na identificação bacteriana, através de MALDI-TOF MS. **p.34**

**Quadro 3.** Perfis de susceptibilidade de 23 amostras de bacilos Gram-negativos, frente a polimixina B e beta-lactâmicos. **p.45**

**Quadro 4.** Comparação entre testes fenotípicos realizados entre 20 amostras de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos. **p.46**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BGN** Bacilo Gram-negativo
- BGN-NF** Bacilo Gram-negativo não fermentador
- BHI** *Brain Heart Infusion*
- BrCAST** *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- CAV** Ceftazidima + Avibactam
- CBAC** Coleção Bacteriana
- CIM** Método de Inativação do Carbapenêmico (do inglês, *Carbapenem Inactivation Method*)
- CMI** Concentração Mínima Inibitória
- CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CR-Kp** *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmico
- cUTI** Infecções complicadas do trato urinário
- COL** Colistina
- DNA** Ácido Desoxirribonucleico
- eCIM** Método de Inativação do Carbapenêmico com EDTA (do inglês, *EDTA Carbapenem Inactivation Method*)
- EDTA** Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ERT** Ertapenem
- ESBL** Beta-Lactamases de Espectro Estendido (do inglês, “*Extended Spectrum Beta-Lactamases*”)
- EUCAST** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- GES** Beta-lactamase de Espectro Estendido da Guiana (do inglês, *Guiana extended spectrum beta-lactamase*)
- HUAP** Hospital Universitário Antônio Pedro
- ICS** Infecção da Corrente Sanguínea
- IIAc** Infecções intra-abdominais complicadas
- IMP** Imipenemase
- IPCSL** Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorial
- IPM** Imipenem
- IRAS** Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
- ITU** Infecção de Trato Urinário
- KPC** *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*

**L-Ara4N** 4-amino-4-deoxi-L-arabinose

**LPS** Lipopolissacarídeo

**MBL** Metallo-beta-lactamase

**mCIM** Teste de inativação do carbapenêmico modificado do inglês “*Modified Carbapenem Inactivation Method*”

**MDC** Microdiluição em Caldo

**MDR** Multirresistente

**MER** Meropenem

**NDM** Metallo-betalactamase de Nova Deli (do inglês, *New Delhi Metallo-beta-lactamase*)

**RNA** Ácido ribonucleico

**OMS** Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization – WHO*)

**OXA** Oxacilinasas

**PBP** Proteína Ligadora de Penicilina (do inglês, *Penicilin Binding Protein*)

**pEtN** Fosfoetanolamina

**RM** Resistência Microbiana

**SENTRY** Estudo Epidemiológico: *Antimicrobial Surveillance Program*

**TCS** Sistemas de dois componentes (do inglês, *Two component systems*)

**TSA** *Tryptic Soy Agar*

**TSB** *Tryptic Soy Broth*

**UFF** Universidade Federal Fluminense

**UTI** Unidade de Terapia Intensiva

**VIM** *Verona Integron–encoded Metallo-β-lactamase*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>1.1</b>	<b>Bacilos Gram-negativos</b>	16
<b>1.2</b>	<b>Resistência bacteriana</b>	17
1.2.1	Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos	18
1.2.2	Beta-lactamases de espectro estendido	18
1.2.3	Carbapenemases	19
1.2.4	Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos	21
1.2.5	Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas	22
<b>1.3</b>	<b>Polimixinas</b>	22
1.3.1	Mecanismos de ação	23
1.3.2	Resistência às polimixinas	24
1.3.2.1	Mutação cromossômica e rearranjo genético	24
1.3.2.2	Resistência à colistina mediada por genes plasmidiais	26
1.3.2.3	Outros mecanismos de resistência	27
<b>1.4</b>	<b>Detecção laboratorial fenotípica de amostras resistentes às polimixinas</b>	27
<b>1.5</b>	<b>Tratamento de infecções por patógenos Gram-negativos multirresistentes</b>	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	32
<b>2.1</b>	<b>Geral</b>	32
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b>	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
<b>3.1</b>	<b>Amostras bacterianas</b>	33
<b>3.2</b>	<b>Identificação das amostras</b>	33
<b>3.3</b>	<b>Detecção de Resistência à Polimixina Através do Método de Referência</b>	34
3.3.1	<i>Microdiluição em caldo convencional</i>	34
<b>3.4</b>	<b>Verificação do Perfil de Sensibilidade a Beta-lactâmicos</b>	35
<b>3.5</b>	<b>Detecção Fenotípica de Produção de Carbapenemases</b>	36
3.5.1	<i>Teste de inativação do carbapenêmico modificado (CIMm)</i>	36
3.5.2	<i>Teste de inativação do carbapenêmico com EDTA (CIME)</i>	37
<b>3.6</b>	<b>Detecção de Resistência à Polimixina Através de Métodos Alternativos</b>	38
3.6.1	<i>Microdiluição em caldo comercial</i>	38
3.6.2	<i>Teste da gota</i>	39

3.7	Análise de Dados .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	Identificação de gênero e/ou espécie .....	41
4.2	Detecção de Resistência à Polimixina Através do Método de Referência .....	41
4.3	Verificação do Perfil de Sensibilidade a Beta-lactâmicos .....	43
4.4	Detecção Fenotípica de Produção de Carbapenemases .....	45
4.5	Detecção de Resistência à Polimixina Através de Métodos Alternativos .....	46
4.5.1	<i>Microdiluição em caldo comercial</i> .....	46
4.5.2	<i>Teste da gota</i> .....	47
4.6	Comparação entre os Resultados dos Testes Realizados .....	47
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Bacilos Gram-negativos

Os bacilos Gram-negativos (BGN) constituem um grupo altamente diverso de bactérias de interesse clínico, estando envolvidos na maioria das infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS), tais como as infecções da corrente sanguínea, do trato urinário e do trato respiratório, particularmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) (Lisboa, 2012; Breijyeh, 2020; Ritter, 2022).

As bactérias deste grupo podem ser divididas em fermentadoras de glicose e não fermentadoras de glicose (BGN-NF) (ANVISA, 2004).

Os BGN fermentadores de glicose são compostos em especial, pelas bactérias pertencentes à ordem das *Enterobacterales*, das quais as mais relevantes do ponto de vista clínico são aquelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que compreende microrganismos anaeróbios facultativos, capazes de fermentar glicose, podendo ser móveis ou imóveis; a maioria é capaz de reduzir nitrato a nitrito e citocromo-oxidase negativa (Mota, 2018).

Dentre as principais espécies e gêneros de enterobactérias de importância clínica, aqueles comumente associados a IRAS, estão *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, entre outros (Abbott, 2021). Estes microrganismos podem ser ainda encontrados no solo, plantas e água e na microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e animais, o que facilita sua disseminação no meio ambiente.

Já os BGN-NF são bactérias estritamente aeróbios e se caracterizam por não utilizarem carboidratos como fonte de energia na via fermentativa, degradando-os pela via oxidativa (Pereira, 2012). Este grupo não é comumente encontrado na microbiota humana e, na maioria das vezes, são considerados patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. É importante a identificação dessas bactérias em ambiente hospitalar, pois muitas delas apresentam resistência a uma grande variedade de antimicrobianos (Potron, 2015).

No Brasil, dados de 2021 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indicaram que *K. pneumoniae* foi a primeira causa mais comum de infecções primárias da corrente sanguínea (IPCS), em unidades de terapia intensiva (UTIs) adulto, seguida de *Acinetobacter* e *P. aeruginosa*. Em UTIs neonatais, *K. pneumoniae* foi alocada como segunda

causa de IPCS, seguida de *E. coli*, sendo que *Acinetobacter* e *P. aeruginosa* foram classificados como 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> causas, respectivamente, dessas infecções (ANVISA, 2021).

## 1.2 Resistência bacteriana

A resistência antimicrobiana (RAM) é um fenômeno natural, que está correlacionado a evolução bacteriana; entretanto, nas últimas décadas, o uso excessivo de antibióticos tem intensificado e amplificado a RAM (Aghapour, 2019). A resistência antimicrobiana consiste na capacidade bacteriana de, através de diferentes mecanismos, resistir à ação dos antimicrobianos.

A bactéria pode ser intrinsecamente resistente a um determinado antimicrobiano, resultante de características estruturais e funcionais inerentes. (Cepas, 2020).

Além da resistência intrínseca, a bactéria pode adquirir genes de resistência. A resistência adquirida acontece através da incorporação de novo material genético, por transferência horizontal, ou por ocorrência de mutações em genes cromossômicos, tornando a bactéria que era originalmente sensível, resistente ao antimicrobiano. (Garneau-Tsodikova, 2016; Reygaert, 2018).

A resistência adaptativa ocorre por alterações na expressão de genes ou proteínas muito rapidamente em resposta a ação de algum antimicrobiano ou de sinais ambientais, como pH, temperatura, limitação de nutrientes, entre outros. Esta resistência se difere das demais por ser instável, transitória e altamente dependente da presença de antimicrobianos, não podendo ser transferida verticalmente. Diante disso, é um dos maiores desafios para uma terapia antimicrobiana eficaz, o que explica as diferenças que podem ocorrer na susceptibilidade antibiótica *in vitro* e *in vivo* (Reygaert, 2018).

Atualmente, a crescente resistência aos antibióticos está se agravando em uma crise global (Aslam, 2018). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos multirresistentes considerados prioritários para o desenvolvimento e pesquisa de novos antimicrobianos, na qual *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos e/ou produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês “*Extended-Spectrum Beta-lactamases*”), juntamente com *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos foram os patógenos que se enquadraram na categoria de prioridade crítica (Willyard, 2017).

### 1.2.1 Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos são o grupo de antimicrobianos mais utilizados na clínica médica e incluem as penicilinas, as cefalosporinas e cefamicinas, monobactâmicos e os carbapenêmicos (Tsivkovski, 2020). Esses fármacos atuam inibindo a ação das enzimas transpeptidases, também conhecidas como proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês “*Penicilins Binding Proteins*”), que realizam as ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas do peptidoglicano da parede celular bacteriana em formação, através da sua ligação às PBPs, levando à inibição da formação da parede celular (Guerreiro, 2018).

Contudo, a resistência aos beta-lactâmicos tem emergido e se disseminado em todo mundo, o que tem limitado a sua utilização (Morrill, 2015).

O principal mecanismo de resistência dos bacilos Gram-negativos a esses antimicrobianos é a produção de beta-lactamases, que são enzimas capazes de realizar a catálise hidrolítica do anel beta-lactâmico presente nos beta-lactâmicos, inativando a sua ação antibactericida, ou seja, interrompendo a inibição da síntese da parede celular bacteriana. Atualmente, as beta-lactamases de espectro estendido e as carbapenamases são os grupos de beta-lactamases mais preocupantes (Seibert, 2014; Tsivkovski, 2020).

### 1.2.2 Beta-lactamases de espectro estendido

As cefalosporinas são um grupo de antimicrobianos beta-lactâmicos que pode ser dividido em cinco gerações, de acordo com os seus diferentes espectros de ação (Guerreiro, 2018).

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração e quarta geração e monobactâmicos, mas não as cefamicinas e carbapenêmicos e são inativadas por inibidores como clavulanato, sulbactam e tazobactam. As ESBLs são codificadas por genes presentes em plasmídeos, transposons e integrons, que também podem carregar genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (Pitout, 2008; Silva, 2012).

Classificadas em diversos tipos, as do tipo CTX-M, SHV e TEM são as mais detectadas em todo o mundo (Dantas Palmeira, 2020).

A prevalência de infecções associadas a ESBLs varia dependendo das regiões e países. A China é um dos países com alta prevalência de ESBLs. Em um estudo realizado por Quan e

colaboradores (2021), foram analisadas 1512 amostras de bacilos Gram-negativos de pacientes com infecções do trato urinário adquiridas na comunidade e a prevalência geral de produção de ESBL em espécies bacterianas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. foi de 37,2% (562/1512) (Quan, 2021).

### 1.2.3 Carbapenemases

Os carbapenêmicos são os antimicrobianos que apresentam o mais amplo espectro de atividade entre os beta-lactâmicos. Esses antimicrobianos são considerados as opções de escolha no tratamento de infecções graves por BGN multirresistentes. Diferente de outros beta-lactâmicos, possuem uma cadeia pentacíclica não-saturada em sua estrutura molecular, que está ligada a um átomo de carbono que caracteriza o anel carbapenema, ligado ao anel beta-lactâmico (Papp-Wallace, 2011; Penido, 2019).

Além disso, possuem uma cadeia lateral de hidroxietila, ao invés da cadeia acilamina presente nas penicilinas, o que é uma característica fundamental dos carbapenêmicos, importante para a sua atividade. Esta classe é representada principalmente pelo meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem. Os carbapenêmicos possuem o mesmo mecanismo de ação que os demais beta-lactâmicos. Um fator crucial para a eficácia dos carbapenêmicos é sua capacidade de se ligar a várias PBPs diferentes. Entretanto, nas últimas décadas, a resistência aos carbapenêmicos tem aumentado em todo o mundo (Papp-Wallace, 2011; Penido, 2019; Tamma, 2019).

Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos incluem a produção de carbapenemases, que são enzimas com potencial para hidrolisar, não apenas os carbapenêmicos, mas a maioria dos beta-lactâmicos. Ademais, bombas de efluxo e mutações que alteram a expressão e/ou função de porinas e PBPs, também são outros mecanismos. Estes mecanismos combinados podem causar altos níveis de resistência a carbapenêmicos, em amostras de certas espécies, como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Papp-Wallace, 2011; Nordmann, 2019).

Segundo a classificação do Ambler (1980), as carbapenemases podem ser divididas em classes moleculares (A, B, C, D), de acordo com a sua estrutura molecular. As enzimas que pertencem às classes A, C e D, são do tipo serino-beta-lactamases, pois apresentam o aminoácido serina no sítio ativo da enzima. As enzimas pertencentes à classe B são do tipo metalo-beta-lactamases (MβL), por dependerem de um metal (geralmente zinco) como cofator

para sua atividade enzimática. Em decorrência disso, as M $\beta$ L são inibidas *in vitro* por agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Andrade, 2017; Bonomo Ra, 2018; Tamma, 2019; Nordmann, 2019).

As carbapenemases mais prevalentes são as do tipo KPC, GES (classe A) e OXAs (classe D) (serino-carbapenemases) e as do tipo IMP, VIM e NDM (metalo- $\beta$ -lactamases, da classe B) (Nordmann, 2019).

O mecanismo de resistência mais frequente em *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, no Brasil é a produção de KPC (Sampaio e Gales, 2016; De Oliveira, 2021). A enzima KPC é uma carbapenemase capaz de hidrolisar todos os beta-lactâmicos, sendo pouco inibida pelos inibidores clássicos. A transmissão do gene *bla*<sub>KPC</sub>, pode ser mediada por mecanismos moleculares, através de elementos genéticos móveis (por exemplo, o transposon Tn4401) ou por transferência horizontal de plasmídeos e ainda, por disseminação clonal (Chen, 2014).

As bactérias produtoras de KPC são consideradas endêmicas em certas partes do mundo, além do Brasil, incluindo o nordeste dos EUA, Argentina, Colômbia, leste da China, Grécia, Israel, Itália, Polônia e Porto Rico (Chen, 2014).

A metalo-enzima NDM-1 foi relatada pela primeira vez em 2009, por Yong e colaboradores, na cidade de Nova Deli, na Índia, em um isolado de *K. pneumoniae*. (Andrade, 2017) Os plasmídeos que carregam o gene *bla*<sub>NDM-1</sub>, frequentemente também carregam vários outros genes, que conferem resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos e sulfametoxazol, tornando as amostras multirresistentes (Nordmann, 2011).

Vários relatos indicam uma ampla disseminação de amostras produtoras de NDM em todo o mundo. No Brasil, em 2013, foram confirmados os primeiros casos de infecções causadas por NDM-1, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Camargo, 2022).

As carbapenemases da classe D, também denominadas de oxacilinases (OXAs), são enzimas que possuem atividade contra as penicilinas e cefalosporinas de espectro restrito, sendo que algumas, apresentam atividade de carbapenemases. As carbapenemases do tipo OXAs hidrolisam fracamente os carbapenêmicos e têm atividade limitada contra as cefalosporinas de espectro amplo e a maioria dos inibidores  $\beta$ -lactâmicos (Pitout, 2019).

As oxacilinases que mais se destacam são OXA-23, OXA-24, OXA-58 e OXA-143, comumente identificadas em *Acinetobacter* spp., bem como a OXA-48 e suas variantes, que são importantes determinantes da resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* (Bonomo Ra, 2018; Lima, 2021).

A OXA-48, inicialmente, foi identificada em uma amostra de *K. pneumoniae*, na Turquia, em 2001 (Boyd, 2020). Desde então, bactérias da ordem *Enterobacterales* contendo *bla*<sub>OXA-48</sub> são endêmicas na Turquia e em outros países do Oriente Médio e Norte da África e são importantes causas de surtos nosocomiais nestas regiões e países. Também há relatos de casos importados e não importados descritos em todos os continentes, exceto na Antártida, incluindo as Américas, vários países europeus, Ásia, Oceania, entre outros (Pitout, 2019).

No Brasil, a OXA-370, uma variante da OXA-48, foi descrita pela primeira vez em uma amostra de *Enterobacter hormaechei* resistente a carbapenêmicos no Rio Grande do Sul (Sampaio, 2014). Em um estudo realizado com 4.451 amostras de *Enterobacterales* isoladas em 28 hospitais brasileiros, verificou-se a presença do gene *bla*<sub>OXA-48</sub> entre amostras de várias espécies dessa ordem, incluindo *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* e *Serratia* spp., entre outras, indicando uma alta capacidade de disseminação desse determinante genético (Magagnim, 2017).

#### 1.2.4 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma classe de fármacos de amplo espectro e que atuam através da inibição da síntese proteica bacteriana. Se ligam especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA e, conseqüentemente, inibindo de forma irreversível a síntese proteica (Guimarães, 2010).

Este antibiótico possui uma natureza policatiônica e por isso, não conseguem permear facilmente a parede celular bacteriana (Ribeiro, 2017). Para penetrar no citoplasma bacteriano, os aminoglicosídeos se difundem pelas porinas localizadas na membrana externa dos Gram-negativos e dependem do gradiente elétrico transmembrânico que está acoplado ao transporte de elétrons como força condutora (Firmo, 2016).

Os aminoglicosídeos são utilizados para o tratamento de infecções causadas, especialmente pelas bactérias Gram-negativas (Ribeiro, 2017). Os principais antimicrobianos dessa classe são a estreptomicina, gentamicina, ampicacina, paramomicina, netilmicina, tobramicina e a espectinomicina (Doi, 2016).

Os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos podem ser intrínsecos, como é o caso das bactérias anaeróbicas ou adquiridos, que incluem a redução do acúmulo intracelular do antimicrobiano, devido a absorção reduzida e/ou a sistemas de efluxo, a diminuição da

ligação dos aminoglicosídeos ao local alvo do rRNA, por alteração do mesmo e modificação e inativação enzimática dos aminoglicosídeos, mediada pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), como acetiltransferases, nucleotidiltransferases ou fosfotransferases (Ribeiro, 2017; Ramirez, 2017).

### 1.2.5 Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são uma classe de antimicrobianos utilizadas para tratamento de várias infecções bacterianas, incluindo trato urinário, trato respiratório, pele, osso, infecções de tecidos moles (Correia, 2017).

As fluoroquinolonas podem ser classificadas com base em seu espectro de ação e seu perfil farmacocinético. O seu mecanismo de ação é a inibição da replicação e da transcrição de DNA bacteriano. Estes antimicrobianos podem interagir com duas enzimas: DNA girase (codificadas pelos genes GyrA e GyrB) e topoisomerase IV (codificadas pelos genes ParC e ParE), que são importantes para realização do superenrolamento cromossômico necessário para a síntese de DNA, transcrição e divisão celular, resultando na inibição da síntese de DNA e eventualmente, na morte celular. A DNA girase é o alvo primário em bactérias Gram-negativas (Correia, 2017; Vianello 2020).

Os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas incluem mutações cromossômicas, que alteram as enzimas-alvo e sua afinidade de ligação a esses antimicrobianos ou que levam ao acúmulo reduzido do antimicrobiano, por permeabilidade diminuída; ou aquisição de genes plasmidiais codificadores de bombas de efluxo, de proteínas relacionadas a proteção ou bloqueio do sítio-alvo, ou de enzimas modificadoras de quinolonas (Redgrave, 2014; Munita, 2016; Vianello, 2020).

## 1.3 Polimixinas

As polimixinas são uma classe de antimicrobianos polipeptídicos catiônicos que possuem atividade apenas contra as bactérias Gram-negativas. Tendo como base a sequência de aminoácidos do peptídeo, há cinco variantes de polimixina (A – E) que podem ser distinguidas, mas apenas duas são utilizadas na prática clínica, a polimixina B e a polimixina E (ou colistina) (Girardello, 2012).

Descobertas em 1947, a partir da bactéria Gram-positiva *Paenibacillus polymyxa*, essas drogas foram amplamente utilizadas até meados de 1980, quando foram deixadas de ser aplicadas na prática médica humana, em decorrência de sua toxicidade e do surgimento de outras opções menos tóxicas de antimicrobianos. Nos últimos anos, com o aumento da resistência aos carbapenêmicos, considerados drogas de escolha no tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas multirresistentes, o uso das polimixinas foi reintroduzido (Lee, 2009; Girardello e Gales, 2012).

As polimixinas B e E têm estrutura e sequência de aminoácidos semelhantes e possuem atividades *in vitro* “idênticas”, porém a polimixina B tem um aminoácido D-fenilalanina em sua estrutura, enquanto a polimixina E possui o aminoácido D-leucina na mesma posição (Girardello e Gales, 2012). Além disso, a principal diferença entre polimixina B e a colistina, é que a colistina é administrada como um pró-fármaco, na forma de colistimetato de sódio, que é convertido na forma ativa de colistina, já a polimixina B é administrada na sua forma ativa, como sulfato de polimixina B (Yang, 2020).

### 1.3.1 Mecanismos de ação

Os antimicrobianos dessa classe possuem um espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, porém há exceções como *Proteus* spp., *Burkholderia* spp., *Serratia* spp. e *Providencia* spp., que apresentam resistência intrínseca à polimixina (Poirel, 2017). Diferente das bactérias Gram-negativas, a parede celular das bactérias Gram-positivas não possui LPS na membrana externa, sendo composta por uma camada de peptidoglicano espessa e ácidos tecóicos. Portanto, as polimixinas exibem atividade reduzida contra bactérias Gram-positivas (Yin, 2020).

O alvo primário das polimixinas é o lipopolissacarídeo (LPS), da membrana externa dos BGN. Seu mecanismo de ação é baseado na interação eletrostática entre os grupos amino da polimixina e as subunidades do lipídeo A do LPS. A polimixina desloca os íons  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  do LPS, que são responsáveis pela estabilidade da membrana bacteriana, levando a distúrbios na estrutura da membrana externa da célula, o que culmina no aumento da permeabilidade da membrana celular e, conseqüentemente, na morte da bactéria (Schindler e Osborn, 1979).

Além deste mecanismo de ação primário, há outro mecanismo de ação que seria a formação de radicais hidroxila livres prejudiciais (OH), por meio da reação de Fenton. Todavia, este mecanismo levanta algumas controvérsias, pois não se sabe se a ação bactericida das



polimixinas é dependente da formação do radical hidroxila. Vários relatos demonstraram que este mecanismo foi responsável por morte induzida por polimixina em algumas espécies bacterianas, como *A. baumannii* e *E. coli*, mas não em *P. aeruginosa*, indicando que há variação, de acordo com a genética das espécies (Yin, 2020).

O mecanismo de ação das polimixinas também interage com as membranas das células humanas, desintegrando-as, causando um efeito tóxico. Essa toxicidade foi observada nos tecidos renais e cerebrais, embora de forma mais grave nos tecidos renais, o que resultou na descontinuidade do seu uso, por algumas décadas (Mohapatra, 2021).

### 1.3.2 Resistência às polimixinas

As polimixinas voltaram a ser alvo de interesse significativo, em decorrência do aumento das infecções bacterianas multirresistentes (MDR), sendo, atualmente, consideradas um dos antibióticos de último recurso para o tratamento de infecções por BGN MDR (Gai, 2019).

O programa mundial de vigilância antimicrobiana (SENTRY) relatou uma baixa resistência às polimixinas entre isolados Gram-negativos entre 2006 e 2009. No entanto, bactérias resistentes a polimixinas estão sendo cada vez mais detectadas globalmente, em conjunto com o uso frequente de polimixinas em muitas instituições (Wang, 2021).

No Brasil, já existem relatos de bacilos Gram-negativos resistentes à polimixina. Em um estudo realizado por Gomes e colaboradores (2016), foram analisadas 60 amostras de *Acinetobacter baumannii*, coletadas no Rio de Janeiro no período de 2014 a 2015, e 68% das amostras foram resistentes à polimixina B (Gomes, 2016). Em um outro estudo, conduzido por Bartolleti e colaboradores (2016), com amostras de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados em um hospital terciário localizado em São Paulo, entre os anos de 2011 e 2015, se verificou um aumento expressivo na resistência a polimixinas, especialmente entre as amostras resistentes aos carbapenêmicos.

Dados do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR), do ano de 2021, revelaram um aumento de 90% no envio de cepas de MDR, recebidas de hospitais de cinco estados, comparando-se os primeiros trimestres de 2019 e de 2021 e o percentual de resistência à polimixina, subiu para 20%, do total de isolados recebidos em 2021 (ANVISA, 2021).

Segundo os dados do Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, divulgado pela ANVISA (2022), que consolida os indicadores nacionais das IRAS e da

resistência microbiana do ano de 2021, *K. pneumoniae* apresentou um percentual de resistência antimicrobiana às polimixinas de 35,1%, associada com infecções primárias de corrente sanguínea laboratorial (IPCSL) e de 17,6%, em infecções do trato urinário (ITU) de UTIs adulto (ANVISA, 2021).

É válido ressaltar que o surgimento de BGN resistente a carbapenêmicos, apresentando resistência concomitante às polimixinas, é preocupante, pois diminui drasticamente o arsenal terapêutico para combater as infecções causadas por esses patógenos (Wang, 2021).

Os principais mecanismos de resistência às polimixinas ainda não estão muito bem elucidados. A resistência à polimixina acontece com a modificação do LPS por diferentes vias, como alteração do LPS e redução da sua carga negativa, superexpressão dos sistemas de bomba de efluxo e a superprodução da cápsula polissacarídica. Além disso, também há relatos da aquisição de um gene plasmidial conhecido como *mcr* (do inglês “*mobilized colistin resistance*”) (Poirel, 2017).

#### 1.3.2.1 Mutação cromossômica e rearranjo genético

A modificação do LPS ocorre principalmente pela adição de grupos catiônicos fosfoetanolamina (pEtN) e/ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ou galactosamina ao lipídio A. Isto reduz a carga negativa da membrana externa dos BGN, o que resulta na inibição da ação bactericida das polimixinas (Hassen, 2022). A regulação da expressão da maioria dos genes envolvidos na modificação do LPS em bacilos Gram-negativos geralmente é controlada pelos operons *arnBCADTEF* e *pmrE*, que são regulados pelos sistemas de dois componentes (TCS), em especial PhoP-PhoQ e PmrA-PmrB. (Simpson, 2019)

Os sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB contêm um sensor quinase, que seriam PhoQ e PmrB, respectivamente, que podem detectar os sinais ambientais, como as baixas concentrações de Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> do envelope celular, altas concentrações de Fe<sup>3+</sup> e baixo pH, além da presença de compostos catiônicos, como as polimixinas, portanto, podem alterar os padrões de expressão desses TCS (Simpson, 2019).

A ativação dos TCS PhoP/PhoQ leva à ativação de *pmrD*, que por sua vez ativa os TCS PmrA/PmrB. PmrA/PmrB então, regula positivamente os operons *arnBCADTEF* e *pmrE* para sintetizar L-Ara4N para adição ao LPS. Algumas espécies bacterianas Gram Negativas, como *Klebsiella* spp., os TCS PhoP/PhoQ também podem ativar diretamente os operons *arnBCADTEF* e *pmrE* independentes de *pmrD* e PmrA/PmrB (Srinivas, 2017; Simpson, 2019).

Além disso, o gene *mgrB* codifica uma pequena proteína transmembrana de 47 aminoácidos que exerce feedback negativo sobre o PhoPQ, inibindo a atividade quinase de PhoQ. A inativação deste gene por substituições, inserções ou deleções no gene *mgrB*, pode resultar na superprodução de L-Ara4N (Srinivas, 2017; Simpson, 2019).

A síntese de PEtN também acontece de forma semelhante, assim que é expresso PmrA/PmrB, são ativados *pmrC* (também conhecido como *eptA*) e *cptA* (também conhecido como *eptC*) para sintetizar PEtN que será adicionado ao lipídeo A do LPS. *EptB* (também conhecido como *pagC*) também resulta na modificação do LPS com PEtN. *MgrR* atua como um regulador de feedback negativo para *eptB*. Semelhante à via L-Ara4N, mutações em qualquer um desses genes pode levar à desregulação e superprodução de PEtN, que altera a carga do LPS (Srinivas, 2017).

### 1.3.2.2 Resistência à colistina mediada por genes plasmidiais

Em 2015, foi detectado pela primeira vez o mecanismo de resistência à colistina mediado por plasmídeo, codificado pelo gene *mcr-1*, em uma cepa de *E. coli* coletada de animais de corte, na China. Desde então, houve uma ampla disseminação do gene *mcr-1* entre bacilos Gram-negativos (Hassen, 2022). Até o momento, foram identificados pelo menos 10 homólogos do gene *mcr-1* (*mcr-2* a *mcr-10*) em várias espécies de *Enterobacterales* (Hassen, 2022).

O mecanismo pelo qual o *mcr-1* pode mediar a resistência à colistina funciona da mesma forma que o mecanismo de resistência cromossômico, através da codificação de uma proteína homóloga à enzima fosfoetanolamina (PEtN) transferase envolvida na via de modificação do LPS, a MCR-1, que é uma enzima fosfoetanolamina lipídica A transferase (El-Sayed Ahmed, 2020; Hassen, 2022).

Os genes *mcr* são caracterizados por poderem ser carregados em uma variedade de tipos de plasmídeos, garantindo sua rápida disseminação em todo o mundo (Srinivas, 2017; Aghapour, 2019; Hassen, 2022).

Oliveira e colaboradores (2019), em seu estudo de revisão sistemática, relataram que na América Latina, 2,9% das amostras mostraram ser portadores do gene *mcr*, sendo o tipo *mcr-1* o mais comumente encontrado entre as amostras de *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, que foram as espécies mais frequentemente associadas com esse gene. Além disso,

o Brasil foi o país que apresentou o maior número de amostras bacterianas positivas para o gene *mcr*, com 246 casos (44,7%) (Oliveira, 2019).

### 1.3.2.3 Outros mecanismos de resistência

Existem outros mecanismos de resistência à polimixina que foram identificados, incluindo a formação do polissacarídeo capsular aniônico em *K. pneumoniae*, que resulta em aprisionamento de peptídeos antimicrobianos catiônicos, como as polimixinas, diminuindo a quantidade de antibiótico que atinge a superfície bacteriana, e a ativação das bombas de efluxo, que conferem maior resistência à polimixina (Poirel, 2017; Aghapour, 2019).

Além destes, o amplo uso da polimixina também tem gerado uma preocupação com a heterorresistência. A heterorresistência seria a existência de uma subpopulação resistente em uma amostra sensível e pode resultar na falha terapêutica com polimixinas. Amostras de *Enterobacter* frequentemente exibem heterorresistência, o que dificulta resultados de testes de susceptibilidade precisos (Mashaly, 2021; Doijad, 2023).

## 1.4 Detecção laboratorial fenotípica de amostras resistentes às polimixinas

Embora o uso da polimixina tenha aumentado na prática clínica, o método apropriado para determinar a susceptibilidade às polimixinas em laboratórios clínicos ainda tem sido alvo de estudos (Ezadi, 2019).

As moléculas desses antimicrobianos têm baixa difusão em ágar, pelo seu grande tamanho e natureza catiônica, o que resulta na baixa confiabilidade do método de disco-difusão e dos testes de fita-gradiente (Lo-Ten-Foe *et al.*, 2007). Ademais, os sistemas automatizados comerciais como o Phoenix BD (Becton Dickison) e Vitek (BioMérieux), não são recomendados, pois quando são usados o antimicrobiano entra em contato com o material plástico dos painéis utilizados nesses sistemas e pode ocorrer diminuição de concentração do antimicrobiano, devido à sua adesão a este material, levando a resultados de falsa sensibilidade (Alhamwi e Öksüz, 2022).

Até recentemente, não havia um consenso sobre um método para teste de susceptibilidade bacteriana às polimixinas. Em 2016, o grupo de trabalho “CLSI/EUCAST *Joint Polymyxin Breakpoints Working Group*”, formado pelos comitês internacionais CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e EUCAST (*European Committee on*

*Antimicrobial Susceptibility Testing*), recomendou o método de microdiluição em caldo como método padrão-ouro para verificação dos perfis de suscetibilidade, bem como dos valores de concentrações inibitórias mínimas (CMI) frente à polimixinas (Stefaniuk e Tyski, 2019).

No entanto, o método de microdiluição em caldo é de difícil aplicação no diagnóstico microbiológico de rotina, por ser demorado, custoso e necessitar de profissionais especializados para a preparação manual das soluções antibióticas. Além disso, as polimixinas aderem às placas de microtitulação de poliestireno utilizadas, levando a concentrações diminuídas do antibiótico presentes no caldo Mueller-Hinton dispensado nos poços (Stefaniuk e Tyski, 2019; Ezadi, 2019).

Outro problema da microdiluição em caldo seria o fenômeno de “poço saltado”, que se refere a um teste em que um poço da placa de microtitulação apresenta ausência de crescimento bacteriano e o poço seguinte, com concentração maior do antibiótico, observa-se crescimento visível, o que dificulta a determinação do verdadeiro valor da CMI (Ezadi, 2019).

Segundo a orientação do CLSI, um único poço saltado é aceitável e o poço com o valor CMI mais alto deve ser lido, enquanto aquelas amostras que exibirem mais de um poço saltado devem ser considerados como tendo uma CMI de polimixina não interpretável. Este fenômeno pode estar associado à heterorresistência (Ezadi, 2019).

Em vista disso, métodos fenotípicos alternativos têm sido propostos (Stefaniuk e Tyski, 2019). Dentre os métodos fenotípicos alternativos, vale destacar o teste rápido de polimixina NP, que é baseado na detecção do metabolismo da glicose após o crescimento bacteriano em presença de uma concentração definida de polimixina. A formação de ácido através do metabolismo da glicose leva a uma mudança de cor do fenol vermelho usado como indicador de pH. Quando não há crescimento bacteriano na presença de polimixina indica suscetibilidade à polimixina e não há mudança de cor. O teste apresenta resultados rápidos, em menos de duas horas, além de ser de fácil execução (Poirel, 2017).

No estudo de Shoaib (2020), foram analisadas 121 amostras de *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, sendo 71 resistentes à polimixina segundo a microdiluição em caldo, e o teste rápido de polimixina NP demonstrou especificidade de 100% e sensibilidade de 97,2% (Shoaib, 2020).

O ágar SuperPolimixina (PlastLabor, SP, Brasil) consiste na utilização de meios seletivos contendo polimixina para triagem de amostras resistentes, são práticos e de custo pouco elevado, mas apresentam baixa especificidade e requerem incubação *overnight* (Nordmann, Jayol e Poirel, 2016; Bardet e Rolain, 2018).

Recentemente, foi descrito por Simner e colaboradores (2019) o método de eluição de disco em caldo, para determinação de susceptibilidade à colistina. A técnica consiste em quatro tubos com 10 mL caldo Mueller Hinton Cátion ajustado, aos quais são adicionados 0, 1, 2, 4 discos de colistina (10 µg). Após 30 minutos de incubação, para eluição da colistina no caldo, é inoculada em cada tubo uma alíquota da suspensão bacteriana, da amostra teste. Após incubação *overnight*, realiza-se a leitura, verificando se houve ausência ou crescimento bacteriano.

Os resultados do estudo de Simner e colaboradores revelaram que o método, em comparação com método padrão, apresentou concordância categórica (CA, do inglês “*Categorical Agreement*”) de 98%; apesar disso, a taxa geral de erros muito graves (VME, do inglês “*Very Major Errors*”) foi alta, de 8% (Ezadi, 2019; Humphries, 2019).

A galeria Policimbac® (Probac do Brasil) é um teste comercial de microdiluição em caldo, que consiste em um painel com orifícios contendo diferentes concentrações liofilizadas (0,125 a 64 mcg/mL) de polimixina B. Possui execução mais simples que o método convencional, pois diminui etapas no procedimento, em comparação ao método-padrão, porém ainda não existem muitos dados na literatura sobre sua acurácia.

O teste *Colispot*, também conhecido como teste da gota, foi desenvolvido por Jouy e colaboradores (2017). É um método fenotípico alternativo que corresponde na aplicação de uma gota de solução de colistina na superfície do ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com suspensão bacteriana da amostra teste. Posteriormente, observa-se a presença ou ausência de halo formado ao redor da gota. Se a bactéria apresentar resistência às polimixinas não haverá halo de inibição bacteriana. (Jouy, 2017) Apesar de ser de fácil execução, esse teste requer 16-18 horas de incubação, assim como outros dos métodos supracitados.

Conceição-Neto e colaboradores (2020) demonstraram que em 170 amostras de *K. pneumoniae*, sendo 123 resistentes à colistina e 47 sensíveis, testadas através do teste da gota, houve uma sensibilidade de 74% e especificidade de 100% e um percentual de CA > 90%, para amostras que tinham valores de CIM mais elevados, indicando que em amostras com valores de CIMs mais baixos, a técnica pode apresentar falsos-sensíveis (Conceição-Neto, 2020).

## 1.5 Tratamento de infecções por patógenos Gram-negativos multirresistentes

Entre bactérias Gram-negativas houve um grande aumento da resistência aos antibióticos nas últimas décadas, sendo o aumento da resistência aos carbapenêmicos uma

preocupação particular, em decorrência da falta de opções de tratamentos alternativos eficazes e seguros (Doi, 2019).

No início de 2020, a pandemia de infecção por SARS-CoV-2 atingiu a maioria dos países do mundo, e o grande número de pacientes internados foi um dos principais desafios impostos por esta infecção. É provável que durante a pandemia, as infecções causadas por Gram-negativos multirresistentes (BGN-MDR) tenham se agravado, pois os pacientes internados com COVID-19 por longos períodos na UTI exigiam um maior número de procedimentos invasivos como ventilação mecânica, fator que contribuiu para o risco de adquirir a infecção BGN-MDR (Bardi, 2021; Souza, 2023).

Em um estudo brasileiro de caso-controle deste ano, Souza e colaboradores avaliaram pacientes com infecção por COVID-19 e BGN-MDR em comparação aos pacientes com infecção por BGN-MDR; as taxas de patógenos isolados em pacientes com COVID-19 e BGN-MDR que vieram a óbito eram maiores em relação aos pacientes com BGN-MDR, sendo *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* os principais patógenos isolados, ou seja, o isolamento de BGN-MDR em pacientes com COVID-19 foi associado a mortalidade (Souza et al., 2023).

Quando a resistência aos carbapenêmicos é confirmada, alguns antibióticos não carbapenêmicos podem ser utilizados, como é o caso das polimixinas e de outros antimicrobianos recentemente aprovados, como a ceftazidima-avibactam e ceftolozane-tazobactam.

A ceftazidima-avibactam é uma combinação de uma cefalosporina de terceira geração com amplo espectro de ação contra bacilos Gram-negativos e um inibidor não  $\beta$ -lactâmico de  $\beta$ -lactamase, que é ativo contra as  $\beta$ -lactamases de classe A (como ESBLs, KPC) e algumas  $\beta$ -lactamases das classes D (OXA-48). Porém, não possui atividade contra MBLs (NDM, entre outras) e não é ativo contra *A. baumannii* ou *Stenotrophomonas maltophilia* (Giurazza, 2021; Xiong, 2022).

Este antimicrobiano foi aprovado em 2015, para o tratamento de infecções complicadas do trato urinário (cUTI), infecções intra-abdominais complicadas (IIAc) em combinação com metronidazol e posteriormente, em 2018, para o tratamento de pneumonia bacteriana adquirida no hospital e associada à ventilação mecânica, quando nenhuma outra opção de tratamento é disponível (Doi, 2019; Giurazza, 2021).

O seu amplo espectro é possível pela presença do avibactam, que permite ter ação contra bactérias Gram-negativas multirresistentes, como as cepas produtoras de carbapenemases das classes A e D e/ou de ESBLs e tornou-se a terapia de primeira linha para essas infecções em

muitos hospitais. Este fármaco, assim como outros  $\beta$ -lactâmicos, possui principalmente um efeito bactericida através da ligação de PBP e inibição da síntese da parede celular (Doi, 2019; Giurazza, 2021).

O ceftolozane-tazobactam é a combinação de uma cefalosporina de 5ª geração com inibidor de beta-lactamase e possui um espectro de ação semelhante à ceftazidima-avibactam, tendo algumas diferenças. O ceftolozane tem uma atividade potente contra *P. aeruginosa*, não sendo afetado pelas bombas de efluxo e ou pela deleção da porina OprD. Tazobactam é um inibidor  $\beta$ -lactâmico/ $\beta$ -lactamase que consegue inibir as  $\beta$ -lactamases da classe A (ESBLs), porém não inibe KPC, nem enzimas da classe B (metalo- $\beta$ -lactamases) e classe D (OXA-48). Pode inibir cefalosporinases da classe C, porém apenas em altas concentrações. Por isso, é considerado ativo contra bactérias Gram-negativas, com exceção da *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas* spp. que geralmente são resistentes (Giurazza, 2021; Carvalho, 2023).

À medida que novos antimicrobianos com atividade contra microrganismos resistentes a carbapenêmicos se tornam disponíveis para uso clínico, há alguns desafios que são exclusivos destes novos agentes que podem incluir os custos serem consideravelmente mais altos do que aqueles que estão no mercado, o que provavelmente impedirá seu uso empírico na maioria das circunstâncias. Também pode dificultar seu acesso, principalmente em países em desenvolvimento (Doi, 2019; Rodríguez-Santiago, 2021). Além disso, o espectro de ação dos antimicrobianos citados acima não inclui algumas  $\beta$ -lactamases (Giurazza, 2021).

Neste contexto, as polimixinas continuam sendo uma importante opção de tratamento e por isso, a relevância da busca de testes laboratoriais que auxiliem e otimizem no tratamento de infecções causadas por Gram-negativos MDR, como a detecção da resistência às polimixinas. Portanto, o estudo de novos métodos alternativos precisos, práticos e de baixo custo é importante para a detecção confiável desta resistência.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Comparar o desempenho de métodos alternativos de detecção da resistência às polimixinas em relação ao método padrão-ouro de microdiluição em caldo, entre amostras hospitalares de bacilos Gram-negativos.

### 2.2 Específicos

- Identificar as amostras ao nível de gênero e/ou espécie, através da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF MS;
- Verificar o perfil de sensibilidade das amostras à polimixina, através do teste de microdiluição convencional;
- Verificar os perfis de sensibilidade frente a beta-lactâmicos das amostras, através do método de difusão em ágar;
- Detectar fenotipicamente a produção de carbapenemase entre as amostras resistentes aos carbapenêmicos, através do método de inativação do carbapenêmico com e sem EDTA.
- Verificar o perfil de sensibilidade das amostras à polimixina, através do teste de microdiluição em caldo comercial (Policimbac<sup>®</sup>);
- Verificar o perfil de sensibilidade das amostras à polimixina, através do teste da gota (ou *Colispot*);
- Avaliar o desempenho do método de microdiluição em caldo comercial e do teste da gota, em comparação com o método de microdiluição em caldo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras bacterianas

Foi analisado um total de 23 amostras de bacilos Gram-negativos obtidas a partir de diferentes materiais clínicos, provenientes de pacientes assistidos em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, entre os anos de 2019 e 2023. As amostras foram identificadas e caracterizadas inicialmente como sendo resistentes (N=21) ou sensíveis à polimixina (N= 2), através do sistema automatizado Phoenix BD™, durante a rotina laboratorial, de dois laboratórios de Microbiologia Clínica, que atendem diferentes hospitais públicos (Quadro 1).

As amostras se encontravam estocadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, DIFCO, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) contendo 10% de glicerol, à -20°C e foram repicadas em ágar Tripton de Soja (TSA, Kasvi, São José dos Pinhais, PR), para verificação de viabilidade e pureza. As características das amostras analisadas estão mostradas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Características das 23 amostras de bacilos Gram-negativos incluídas no estudo

Nº CBAC	Ano de Isolamento	Laboratório	Material Clínico	Nº CBAC	Ano de Isolamento	Laboratório	Material Clínico
557	2019	LAB 1	Sangue	1002	2021	LAB 2	Urina
575	2020	LAB 1	Sangue	1003	2021	LAB 2	Asp. traqueal
802	2021	LAB 2	Urina	1005	2021	LAB 2	Sangue
803	2021	LAB 2	Sangue	1006	2021	LAB 2	Sangue
804	2021	LAB 2	N.I.	1012	2021	LAB 2	Urina
858	2021	LAB 1	N.I.	1013	2021	LAB 2	N.I.
978	2022	LAB 1	Urina	1016	2021	LAB 2	Asp. traqueal
984	2022	LAB 1	Urina	1017	2021	LAB 2	Asp. traqueal
998	2021	LAB 2	N.I.	1018	2021	LAB 2	N.I.
999	2021	LAB 2	Sangue	1019	2021	LAB 2	N.I.
1000	2021	LAB 2	N.I.	1024	2023	LAB 1	Líq. ascítico
1001	2021	LAB 2	Sec. de Ferida				

Nº: Número; CBAC: coleção bacteriana; LAB: Laboratório de Microbiologia; N.I.: não identificado; Sec.: secreção; Asp.: aspirado.

#### 3.2 Identificação das amostras

A identificação das 23 amostras foi confirmada através da técnica de MALDI-TOF MS (“*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry*”), por meio do equipamento MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha).

Para a realização do método, as amostras inicialmente foram semeadas em meio TSA, com incubação a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. As amostras foram analisadas em duplicatas. As interpretações dos resultados seguiram as orientações do fabricante (Quadro 2).

**Quadro 2.** Interpretação dos valores dos escores obtidos na identificação bacteriana, através de MALDI-TOF MS

2.300 ... 3.000	Identificação da espécie altamente provável	(+++)	verde
2.000 ... 2.299	Identificação confiável do gênero e provável da espécie	(++)	verde
1.700 ... 1.999	Identificação provável do gênero	(+)	amarelo
0.000 ... 1.699	Identificação não confiável	(-)	vermelho

### 3.3 Detecção de Resistência à Polimixina Através do Método de Referência

#### 3.3.1 Microdiluição em caldo convencional

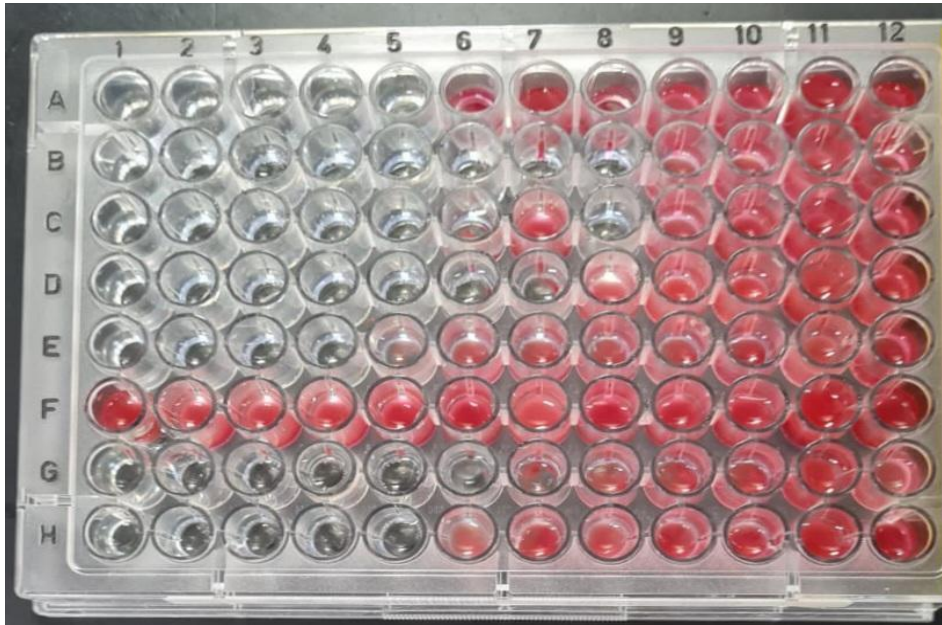
As amostras foram submetidas ao método de microdiluição em caldo Müller-Hinton cation ajustado, para determinação de suas concentrações mínimas inibitórias (CMIs), frente à polimixina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Para a preparação da microplaca, foram colocados  $75\mu\text{L}$  de uma solução mãe de polimixina B a  $5120\mu\text{g/mL}$  (Sigma-Aldrich) em  $2925\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton ajustado em um tubo estéril. Em seguida, foram acrescentados  $200\mu\text{L}$  desse caldo contendo polimixina B ( $128\mu\text{g/mL}$ ) em cada poço da primeira coluna da placa. Depois, foram adicionados  $100\mu\text{L}$  de caldo ajustado sem antibiótico a partir da segunda coluna da placa.

Foi realizada uma diluição seriada, retirando  $100\mu\text{L}$  de cada poço por coluna, a partir da primeira coluna, e acrescentando na coluna seguinte, até a penúltima coluna da placa. A última coluna foi utilizada como controle negativo, ou seja, sem a presença de antibiótico. Após a preparação da microplaca foi feita a semeadura dos poços com  $5\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana, preparada inicialmente com turbidez equivalente à do padrão 0,5 na escala de McFarland e, após, diluída a 1:10 ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL), da amostra teste.

As placas foram incubadas em uma estufa a  $35^{\circ}\text{C}$ , por 16 a 18h. As concentrações utilizadas foram:  $0,125\mu\text{g/mL}$ ,  $0,25\mu\text{g/mL}$ ,  $0,5\mu\text{g/mL}$ ,  $1\mu\text{g/mL}$ ,  $2\mu\text{g/mL}$ ,  $4\mu\text{g/mL}$ ,  $8\mu\text{g/mL}$ ,  $16\mu\text{g/mL}$ ,  $32\mu\text{g/mL}$ ,  $64\mu\text{g/mL}$  e  $128\mu\text{g/mL}$  (Figura 1).

128 64 32 16 8 4 2 1 0,5 0,25 0,125 C-



**Figura 1.** Imagem ilustrativa do teste de microdiluição em caldo, com a determinação das concentrações mínimas inibitórias frente a polimixina B, entre amostras de bacilos Gram-negativos

C -: Controle negativo (sem antimicrobiano)

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Após o período de incubação, para facilitar a leitura dos testes, foi adicionada uma gota de solução de cloreto de 2,3,3-trifeniltetrazólio (corante que apresenta cor avermelhada na presença de células viáveis) em cada orifício da microplaca, com posterior incubação por mais 10 minutos a 35°C. As leituras e interpretações foram realizadas de acordo com o BrCast/EUCAST (2023), sendo que valores de CMIs maiores que 2µg/mL classificam a amostra como sendo resistente à polimixinas.

Para o controle de qualidade do teste foram utilizadas a cepa de *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo e uma de *K. pneumoniae* (CBAC 400), sabidamente resistente a polimixina, como controle positivo.

### 3.4 Verificação do Perfil de Sensibilidade a Beta-lactâmicos

Os perfis de susceptibilidade das 23 amostras, frente a carbapenêmicos e à ceftazidima-avibactam, foram verificados através do método de disco-difusão.

As amostras foram retiradas da coleção e repicadas em ágar TSA e incubadas por 35±2°C por 18 a 24 horas. Após isso, é feita uma alçada das colônias e transferida para tubos

com solução salina e a suspensão é comparada com o padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland. A seguir, realizada a semeadura da suspensão bacteriana em ágar Mueller-Hinton (KASVI), foram utilizados e depositados discos de papel impregnados com concentrações pré-estabelecidas dos seguintes antimicrobianos sobre o meio: ertapenem (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg) e ceftazidima-avibactam (10/4µg) (CECON, São Paulo, SP).

As placas foram incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $18 \pm 2\text{h}$ . As leituras e interpretações dos resultados foram realizadas de acordo com os critérios do BRCast (2023).

Ressalta-se que ertapenem não foi testado frente às amostras de BGN-NF e ceftazidima-avibactam (CAV), não foi testada frente as amostras de *Acinetobacter*, uma vez que ertapenem e CAV não apresentam atividade contra BGN-NF e *Acinetobacter*, respectivamente e o BrCast (2023) não apresenta pontos de corte para esses microrganismos em relação a esses antimicrobianos.

Para o controle de qualidade, foi utilizada a cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **3.5 Detecção Fenotípica de Produção de Carbapenemases**

#### **3.5.1 Teste de inativação do carbapenêmico modificado (mCIM)**

As amostras que apresentaram resistência a pelo menos um carbapenêmico foram submetidas ao Método de CIM Modificado (CIMm, do inglês “*Modified Carbapenem Inactivation Method*”) para verificar a produção de carbapenemases, segundo os critérios do CLSI (2022).

Para a realização do teste, as colônias foram semeadas em meio TSA e incubadas por  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas. Em seguida, uma alçada das colônias foi transferida para uma solução de 1mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB, Probac do Brasil, SP).

Adiante, foi imerso um disco contendo 10µg de meropenem (CECON) na suspensão e incubado por quatro horas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . Depois da incubação, o disco foi removido da suspensão com auxílio de uma alça estéril e colocado em uma placa de ágar Mueller-Hinton previamente inoculada com uma cepa indicadora de *Escherichia coli* sensível (ATCC 29522) e, por fim, incubada a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18 a 24h. A suspensão da cepa indicadora foi ajustada ao padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland. A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com os critérios do CLSI (2022).

Para as amostras serem consideradas positivas, ou seja, produtoras de carbapenemase o halo de inibição ao redor do disco de meropenem precisa apresentar um diâmetro entre 5-16

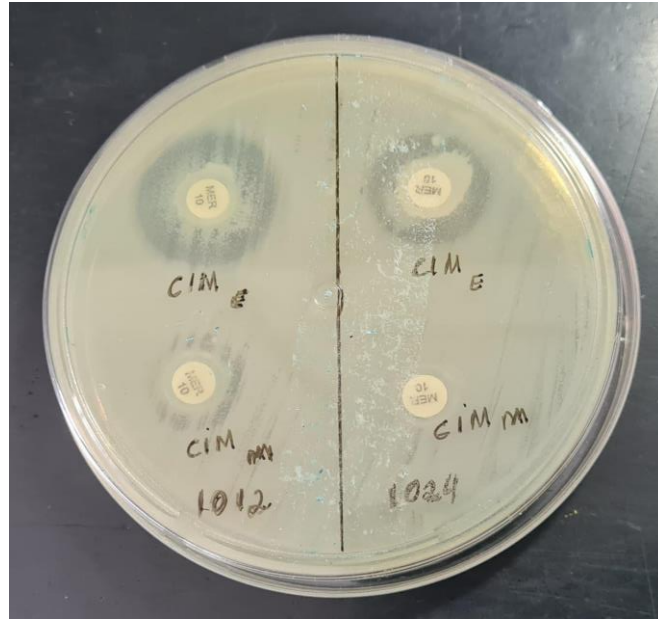
mm, ou entre 16- 18mm, com presença de colônias no interior do halo. A amostra é considerada negativa para a produção de carbapenemase, se o halo de inibição apresentar um diâmetro >19mm. Já para o resultado ser considerado indeterminado o diâmetro tem que estar entre 16 e 18mm ou > 19mm, sem a presença de colônias no seu interior (CLSI, 2022).

### 3.5.2 *Teste de inativação do carbapenêmico com EDTA (CIME)*

As amostras que apresentaram resistência a pelo menos um carbapenêmico foram selecionadas e submetidas ao Método de CIME (do inglês “*EDTA Carbapenem Inactivation Method*”) para verificar carbapenemases e a diferenciação entre as enzimas do tipo serino- $\beta$ -lactamase e metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L), segundo os critérios do CLSI (2022). Foi preparado um microtubo contendo 1ml de caldo TSB para cada amostra e em seguida, adicionados 20 $\mu$ l de EDTA na concentração de 0,5M. A começar da semeadura das colônias em ágar TSA, uma alçada das colônias foi transferida para o microtubo. Em seguida, um disco contendo 10 $\mu$ g de meropenem foi imerso na suspensão e incubado a 35 $\pm$ 2°C, por quatro horas.

Depois da incubação, o disco foi removido da suspensão com auxílio de uma pinça estéril e colocado em uma placa de ágar Mueller-Hinton previamente inoculada com uma cepa indicadora de *E. coli* sensível (ATCC 29522) e, posteriormente, incubada a 35 $\pm$ 2°C, por 18 a 24h.

Os resultados dos testes CIME foram considerados em conjunto com os do CIMm e a leitura e interpretação dos mesmos foram realizadas de acordo com as recomendações do CLSI (2022), onde um aumento  $\geq$  5mm no halo de inibição ao redor do disco de meropenem do teste CIME, quando comparado ao halo de inibição ao redor do disco de meropenem no teste CIMm foi considerado um resultado positivo para produção de MBL (Figura 2).



**Figura 2.** Imagem ilustrativa de testes CIMm & CIME

Os resultados das duas amostras são positivos para produção de metalo-beta-lactamases.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

### 3.6 Detecção de Resistência à Polimixina Através de Métodos Alternativos

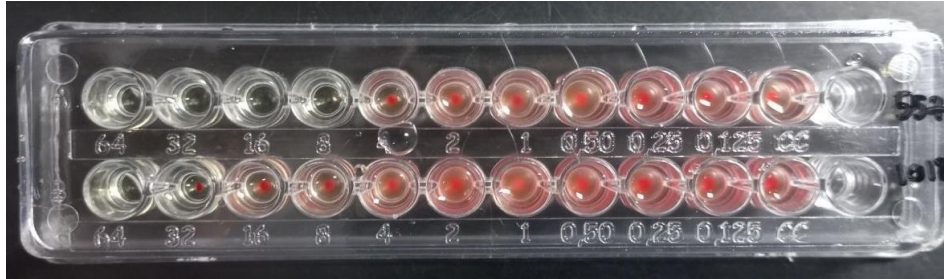
#### 3.6.1 Microdiluição em caldo comercial

As vinte e três amostras também foram testadas quanto às suas CMIs frente à polimixina B, através da galeria Policimbac<sup>®</sup> (Probac do Brasil, São Paulo, SP), de acordo com as recomendações do fabricante. Para realização desse teste, foram utilizados 3 tubos (tubo 1, tubo 2 e tubo 3). No tubo 1 foi feita uma suspensão bacteriana, com turbidez ajustada à do padrão 0,5 na escala de McFarland, no tubo 2 foi colocado 4950  $\mu$ L de salina e no tubo 3 foi colocado 4500  $\mu$ L de salina. A seguir, 50  $\mu$ L do tubo 1 foi transferido para o tubo 2 e homogeneizado, e em seguida 500  $\mu$ L do tubo 2 foi transferido para o tubo 3 e homogeneizado. Para concluir, foram colocados 100  $\mu$ L do tubo 3 em cada poço da galeria.

Cada galeria possui capacidade para duas amostras serem testadas concomitantemente, e a faixa de concentrações da polimixina B é de 0,125 a 64  $\mu$ g/mL (Figura 3). As placas foram incubadas em uma estufa a 35°C, por 24h e depois foi adicionada a solução reveladora (cloreto de 2,3,3-trifeniltetrazólio) em cada poço e por fim, realizada a leitura. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios do BrCast (2023).

A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle sensível e uma de *K.*

*pneumoniae* (CBAC 400), sabidamente resistente a polimixina, foi utilizada como controle resistente.



**Figura 3.** Imagem ilustrativa do teste comercial de microdiluição em caldo Policimbac® (Probac do Brasil)

Fonte: elaborado pela autora (2023).

### 3.6.2 Teste da gota

Todas as amostras foram submetidas ao teste da gota (*Colispot*) para a detecção da resistência à polimixinas.

Foram preparadas três soluções de colistina:

- Concentração final de 4 $\mu$ g/mL: adição de quatro discos impregnados com 10 $\mu$ g de colistina (OXOID Brasil Ltda., São Paulo, SP) em um tubo contendo 10mL de caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (KASVI);
- Concentração final de 8 $\mu$ g/mL: adição de oito de discos impregnados com 10 $\mu$ g de colistina (OXOID) em um tubo contendo 10mL de caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (KASVI);
- Concentração final de 16 $\mu$ g/mL: adição de oito de discos impregnados com 10 $\mu$ g de colistina (OXOID) em um tubo contendo 5mL de caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (KASVI).

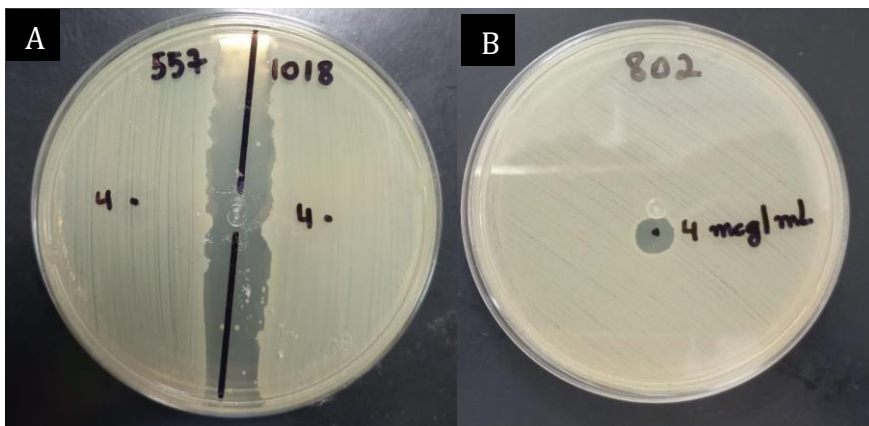
Após o preparo das soluções de colistina, foram incubadas em estufa bacteriológica por 18-24h a 35  $\pm$  2 °C.

O inóculo bacteriano foi preparado em salina estéril, com uma turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland e semeado por confluência em placa contendo Ágar Mueller-Hinton (DIFCO). Em seguida, uma alíquota de 10 $\mu$ L da solução de colistina foi inoculada na placa semeada, e a placa foi incubada por 18-24h a 35  $\pm$  2 °C. O procedimento foi realizado com solução de colistina nas concentrações finais de 4 $\mu$ g/mL, 8 $\mu$ g/mL e 16 $\mu$ g/mL, para fins de comparação.



A ausência de crescimento bacteriano no local, onde foi aplicado a gota de polimixina (com formação de halo > 5mm), determinou o resultado como amostra sensível à polimixina, enquanto a presença de qualquer crescimento bacteriano no interior da gota ou presença de halo de inibição  $\leq 5$ mm, conferiu o resultado como amostra resistente a colistina (Jouey, Haenni, Le Devendec et al, 2017) (Figura 4A/B).

A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle sensível e uma de *K. pneumoniae* (CBAC 400), sabidamente resistente a polimixina, foi utilizada como controle resistente no teste da gota.



**Figura 4A/B.** Imagem ilustrativa do teste da gota, na concentração de 4  $\mu\text{g/mL}$   
4A: as amostras resistentes na concentração utilizada; 4B: amostra sensível.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

### 3.7 Análise de Dados

Os resultados foram organizados e tratados no programa Microsoft® Excel®2010. Os valores de CMIs que foram obtidos nos testes fenotípicos alternativos foram analisados se utilizando os valores de CMIs obtidos através dos testes de microdiluição em caldo, como sendo os valores de referência.

As comparações entre os resultados encontrados foram interpretadas da seguinte forma: concordância de categoria (CA, do inglês “*Categorical Agreement*”), quando não houve mudança de categoria e concordância essencial (EA, do inglês “*Essencial Agreement*”), quando não houve uma diferença no valor da CMI de + 1  $\log_2$  de diluição do valor da CMI de referência. A EA foi verificada apenas para os resultados do sistema comercial de microdiluição

em caldo, uma vez que os testes da gota não fornecem valores de CMI's reais.

Ainda, foram considerados erros graves (ME, do inglês "*Major Errors*"), quando o resultado do teste avaliado resultou em um falso resistente (mudança de categoria de sensível para resistente, em comparação com o método padrão-ouro) e erros muito graves (VME, do inglês "*Very Major Errors*"), quando o resultado do teste avaliado resultou em um falso sensível (mudança de categoria de resistente para sensível, em comparação com o método padrão-ouro).

Taxas  $\geq 1,5\%$  de erros muito graves e  $\geq 3\%$ , de erros graves foram consideradas inaceitáveis (Humphries *et al.*, 2018). O desempenho do teste foi considerado adequado, quando apresentou: CA  $> 90\%$ , CE  $> 90\%$ , VME e ME  $< 3\%$ , de acordo com a recomendação do documento M52-Ed1, do CLSI (2015).

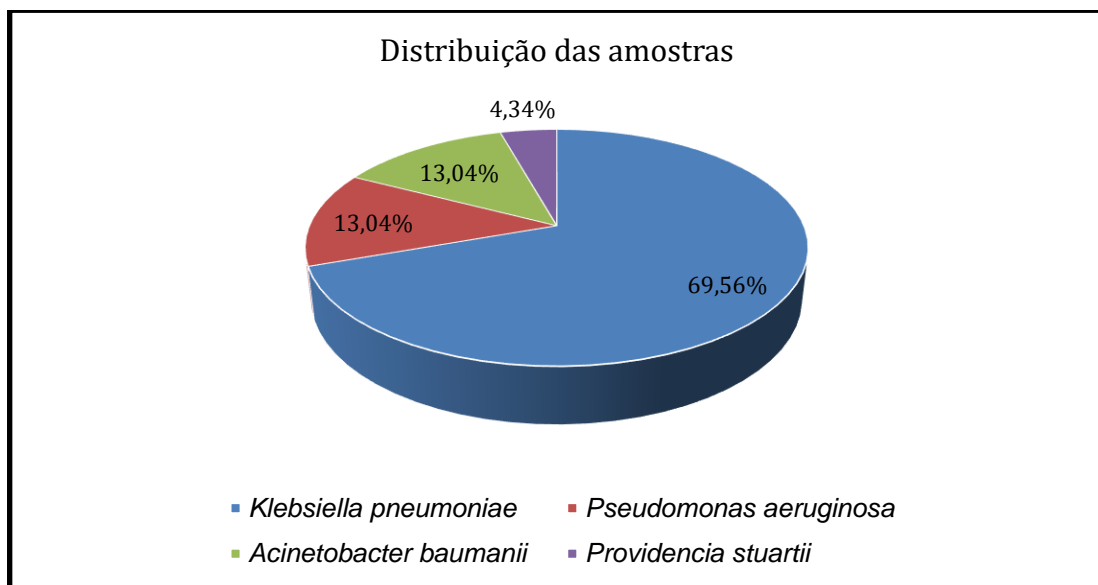
Os percentuais de sensibilidade e especificidade foram calculados segundo as fórmulas:  $S = VP/VP + FN$  e  $E = VN/VN + FP$ , onde S = sensibilidade; VP = verdadeiro resistente; FN = falso sensível; E = especificidade; VN = verdadeiro sensível e FP = falso resistente, comparando-se os resultados obtidos nos testes fenotípicos alternativos com aqueles do método padrão-ouro.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação de gênero e/ou espécie

Todas as 23 amostras foram submetidas à identificação quanto ao gênero e/ou espécie por meio da metodologia de MALDI-TOF MS. A Figura 5 apresenta a distribuição das amostras analisadas.

Dentre as 23 amostras do estudo, 16 (69,56%) foram identificadas como pertencentes à espécie *K. pneumoniae*; três (13,04%) como *A. baumannii*, três (13,04%) como *P. aeruginosa* e uma (4,34%) como sendo *Providencia stuartii*.



**Figura 5.** Distribuição de 23 bacilos Gram-negativos, isolados a partir de diversos materiais clínicos de pacientes atendidos em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, de acordo com a espécie

### 4.2 Detecção de Resistência à Polimixina Através do Método de Referência

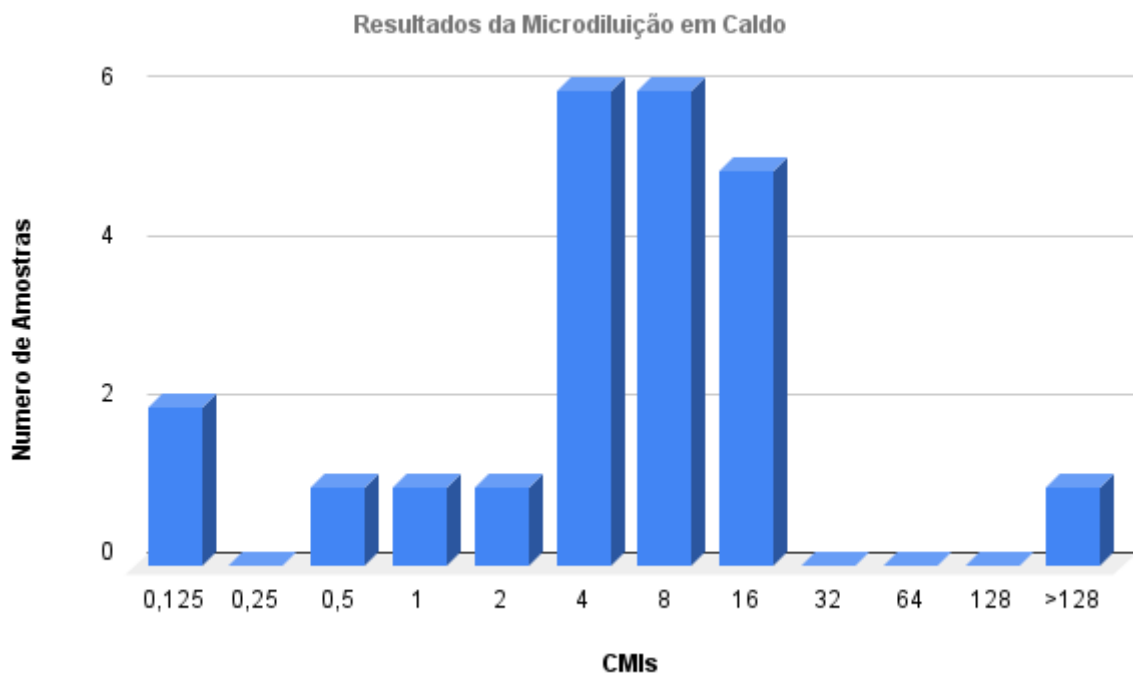
#### 4.2.1. Microdiluição em caldo convencional

Todas as amostras do estudo foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo. A faixa de CMIs observada foi de 0,125 µg/mL a 128 µg/mL.

Do total de 23 amostras analisadas, 18 amostras foram classificadas como sendo resistentes a polimixina B e incluíram, 12 *K. pneumoniae*, três *P. aeruginosa*, três *A. baumannii* e uma, *P. stuartii*.

Entre as cinco amostras (21,7%) classificadas como sensíveis, foram observados valores de CMIs correspondentes entre 0,125 µg/mL a 2 µg/mL.

A maioria (17/18;94,4%) das amostras resistentes apresentou valores de CMIs entre 4 µg/mL e 16 µg/mL, e uma amostra (5,6%) apresentou uma CMI >128 µg/mL (Figura 6).



**Figura 6.** Distribuição dos valores de concentrações mínimas inibitórias frente a polimixina B, obtidos nos testes de microdiluição em caldo convencional, entre 23 amostras de bacilos Gram-negativos

### 4.3 Verificação do Perfil de Sensibilidade aos Beta-lactâmicos

O método de disco-difusão foi realizado para as 23 amostras do estudo, frente aos carbapenêmicos e à associação ceftazidima+avibactam.

Em relação aos carbapenêmicos, foi observado um percentual elevado de resistência (21/23; 91,3%).

Entre as 16 amostras de *K. pneumoniae*, 14 (87,5%) foram resistentes aos carbapenêmicos (CR-Kp) e todas as amostras CR-Kp apresentaram resistência concomitantemente aos três carbapenêmicos testados, com exceção de uma, que foi intermediária, frente ao meropenem, porém resistente ao imipenem e ertapenem, (CBAC 802).

Entre as três amostras de *P. aeruginosa*, duas foram resistentes ao imipenem e ao meropenem. Todas as três amostras de *A. baumannii* foram simultaneamente resistentes ao

imipenem e ao meropenem. A amostra de *P. stuartii* foi resistente aos três carbapenêmicos.

Das 19 amostras testadas frente a ceftazidima-avibactam (CAV), seis (31,6%) amostras foram resistentes, sendo dessas, quatro pertencentes à espécie *K. pneumoniae*, uma à *P. aeruginosa* e uma, à *Providencia stuartii*.

Cabe ressaltar que entre as 20 amostras resistentes aos carbapenêmicos, apenas três (duas de *K. pneumoniae* e outra, de *A. baumannii*) foram sensíveis a polimixina,

Os resultados obtidos através do método de disco-difusão frente aos beta-lactâmicos testados, para as 23 amostras, estão demonstrados no Quadro 3.

**Quadro 3.** Perfis de susceptibilidade de 23 amostras de bacilos Gram-negativos, frente a polimixina B e beta-lactâmicos

Amostras		Perfis de Susceptibilidade*				
		POL B	CAV	ERT	IMI	MER
557	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
575	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
802	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	I
803	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
804	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
978	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	S
984	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	S
998	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
999	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	R	R	R
1000	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
1002	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R
1005	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R
1012	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
1018	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
1019	<i>K. pneumoniae</i>	S	R	R	R	R
1024	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	R	R
1013	<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R	R
858	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	NT	R	R
1001	<i>P. aeruginosa</i>	R	S	NT	R	R
1016	<i>P. aeruginosa</i>	R	S	NT	S	S
1003	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	NT	NT	R	R
1006	<i>A. baumannii</i>	S	NT	NT	R	R
1017	<i>A. baumannii</i>	R	NT	NT	R	R

CBAC: Coleção bacteriana; Pol B: Polimixina B; R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário; CAV: Ceftazidima-avibactam; ERT: Ertapenem; IMI: Imipenem; MER: Meropenem; NT: Não testado.

\* Os perfis de susceptibilidade frente aos beta-lactâmicos foram verificados através de testes de disco-difusão e frente a polimixina B, através de microdiluição em caldo convencional.

#### 4.4 Detecção Fenotípica de Produção de Carbapenemases

As 20 amostras que apresentaram resistência aos carbapenêmicos foram submetidas aos testes de CIMm e CIME.

Os resultados obtidos nos testes de CIMm mostraram 17 amostras positivas (85%) para produção de carbapenemase; dessas, doze amostras (70,5%) apresentaram resultados positivos para o teste CIME, sugerindo produção de carbapenemases do tipo MBL; as outras cinco amostras (29,4%) foram negativas para o teste CIME, caracterizando fenotipicamente a presença de serino-beta-lactamases. Duas, das três de *A. baumannii*, foram negativas nos testes de CIMm e uma, apresentou resultado indeterminado.

Os resultados obtidos nos testes fenotípicos para detecção de amostras produtoras de carbapenemases estão sumarizados no Quadro 4.

**Quadro 4.** Comparação entre testes fenotípicos realizados entre 20 amostras de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos

Nº CBAC	Identificação	Resistência à Carbapenêmicos e CAV*	mCIM/eCIM	Tipo de carbapemase	POL
557	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/+	Metalo.	R
575	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/+	Metalo.	R
802	<i>K. pneumoniae</i>	MER/ERT/CAV	+/+	Metalo.	R
803	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/-	Serino.	R
804	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/-	Serino.	R
998	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/-	Serino.	R
999	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/-	Serino.	R
1000	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/+	Metalo.	R
1002	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT/CAV	+/+	Metalo.	R
1005	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT/CAV	+/+	Metalo.	R
1012	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/+	Metalo.	R
1018	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/-	Serino.	R
1019	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT/CAV	+/+	Metalo.	S
1024	<i>K. pneumoniae</i>	IMI/MER/ERT	+/+	Metalo.	R
1013	<i>Providencia stuartii</i>	IMI/MER/ERT/CAV	+/+	Metalo.	R
858	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMI/MER/CAV	+/+	Metalo.	R
1001	<i>P. aeruginosa</i>	IMI/MER	+/+	Metalo.	R
1003	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMI/MER	-	-	R
1006	<i>A. baumannii</i>	IMI/MER	IND.	IND.	S
1017	<i>A. baumannii</i>	IMI/MER	-	-	R

Nº: Número; CBAC: Coleção bacteriana; CAV: Ceftazidima-avibactam; CIMm: Método de Inativação do Carbapenêmico Modificado; CIME: Método de inativação do carbapenêmico modificado com EDTA; ERT: Ertapenem; IMI: Imipenem; MER: Meropenem, de acordo com o teste disco-difusão; POL: perfil de susceptibilidade a polimixina B, de acordo com o método de microdiluição em caldo; +: Positivo; -: Negativo; IND: indeterminado.

\*Ertapenem não testado entre as amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*; CAV não testada frente às amostras de *A. baumannii*.

## 4.5 Detecção de Resistência à Polimixina Através de Métodos Alternativos

### 4.5.1 Microdiluição em caldo comercial

As 23 amostras foram também submetidas ao sistema comercial de microdiluição em caldo, Policimbac®.

Das 23 amostras, 4 amostras (17,3%) apresentaram valores de CMI de sensibilidade (0,5 µg/mL a 1 µg/mL). Os valores de CMI das amostras classificadas como resistentes (19/23; 82,6%) por esse método, variaram entre 4 µg/mL e >64 µg/mL (Figura 7).



**Figura 7.** Distribuição dos valores de concentrações mínimas inibitórias frente a polimixina B, obtidos no teste comercial Policimbac<sup>®</sup>, entre 23 amostras de bacilos Gram-negativos

#### 4.5.2 *Teste da gota*

Todas as 23 amostras foram submetidas ao teste da gota (*Colispot*). De acordo com os resultados obtidos, oito amostras (34,7%) demonstraram sensibilidade à colistina; 12 amostras (52,2%) se apresentaram resistentes nas três concentrações testadas (4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL); e três (13%) amostras foram resistentes na concentração de 4 µg/mL, mas sensíveis nas concentrações de 8 µg/mL e 16 µg/mL.

#### 4.6 **Comparação Entre os Resultados dos Testes Realizados**

Na tabela 1 estão reunidos os resultados de todos os testes realizados para determinação do perfil de sensibilidade à polimixina/colistina, entre as vinte e três amostras do presente estudo. O método de microdiluição em caldo foi considerado o método de referência para comparação com os demais testes.



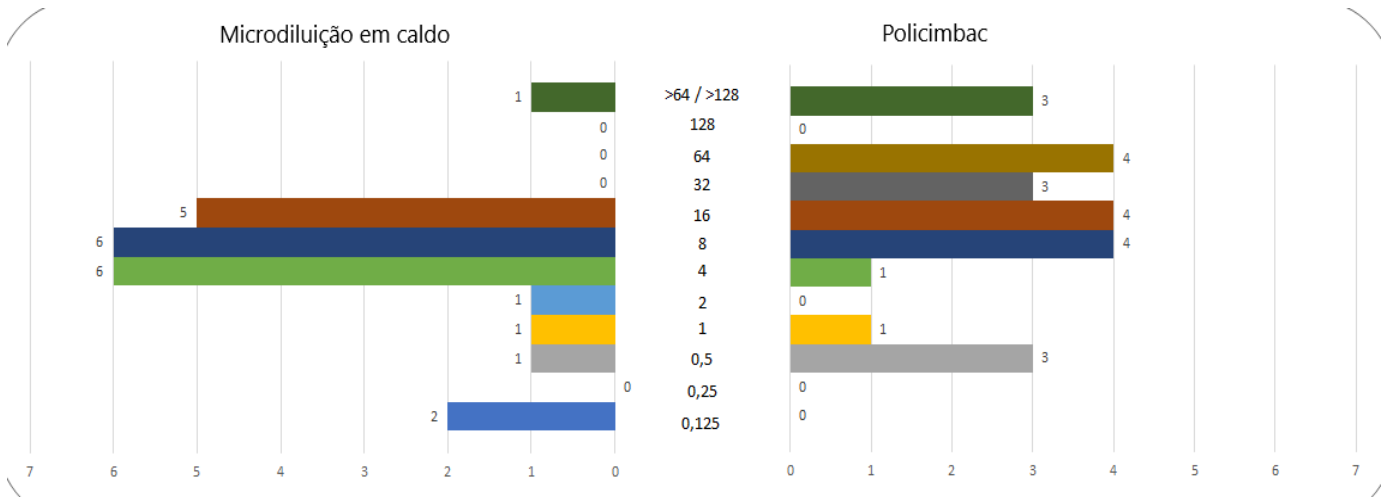
**Tabela 1.** Comparação entre os resultados obtidos dos resultados dos testes de Policimbac® e da Gota para as 23 amostras de bacilos Gram-negativos, frente ao método de microdiluição em caldo.

Amostras		Microdiluição em Caldo Polimixina B (mg/mL)		Policimbac® Polimixina B (mg/mL)		Teste da Gota Colistina (4mg/mL)	Teste da Gota Colistina (8mg/mL)	Teste da Gota Colistina (16mg/mL)
Nº CBAC	Fonte	MIC	Categoria	MIC	Categoria	Categoria	Categoria	Categoria
557	Sangue	8	R	16	R	R	R	R
575	Sangue	4	R	>64	R	R	R	R
802	Urina	8	R	32	R	S	S	S
803	Sangue	16	R	16	R	R	S	S
804	N.I.	16	R	8	R	R	R	R
858	N.I.	8	R	8	R	R	S	S
978	Urina	1	S	0,5	S	S	S	S
984	Urina	0,125	S	0,5	S	S	S	S
998	N.I.	8	R	8	R	S	S	S
999	Sangue	2	S	0,5	S	R	R	R
1000	N.I.	4	R	64	R	R	R	R
1001	Secreção de Ferida	4	R	4	R	S	S	S
1002	Urina	16	R	64	R	R	R	R
1003	Aspirado traqueal	4	R	32	R	R	S	S
1005	Sangue	8	R	16	R	R	R	R
1006	Sangue	0,5	S	8	R	S	S	S
1012	Urina	4	R	>64	R	R	R	R
1013	N.I.	>128	R	>64	R	R	R	R
1016	Aspirado traqueal	4	R	32	R	S	S	S
1017	Aspirado traqueal	8	R	16	R	R	R	R
1018	N.I.	16	R	64	R	R	R	R
1019	N.I.	0,125	S	1	S	S	S	S
1024	Líquido ascítico	16	R	64	R	R	R	R
CA					95,7%	78,3%	65,2%	65,2%
EA					56,5%	-	-	-
ME					4,3%	4,3%	4,3%	4,3%
VME					0%	17,4%	30,4%	30,4%
S					100%	81,8%	72%	72%
E					83,3%	83,3%	83,3%	83,3%

CA: Concordância Categórica; EA: Concordância Essencial; ME: Erros graves; VME: Erros Muito Graves; S: Sensibilidade; E: Especificidade; N.I.: Não identificado; R: Resistente; S: Sensível.

Ao se comparar os resultados obtidos através do sistema comercial Policimbac® com os da microdiluição em caldo, não se verificou a ocorrência de erros muito graves (0%), mas um (4,3%) erro grave foi observado. A concordância categórica foi de 95,7% (22/23) e a concordância essencial foi de 56,5% (Tabela 1).

É válido ressaltar que se observou uma tendência de valores de CIMs mais elevados nos resultados obtidos através da galeria Policimbac®, quando comparados aos da microdiluição em caldo convencional (Figura 8).



**Figura 8.** Correlação entre os valores de concentrações mínimas inibitórias obtidos nos testes de microdiluição em caldo e de microdiluição comercial (Policimbac®), de 23 amostras de bacilos Gram-negativos

Os resultados obtidos nos testes da gota mostraram uma concordância categórica de 78,3% para os testes na concentração de 4µg/mL, e de 65,2%, para os testes realizados nas concentrações de 8 e 16µg/mL.

Na comparação entre os resultados obtidos nos testes da gota e o da microdiluição em caldo foram observados cinco (17,4%) erros muito graves e um (4,3%) erro grave nos testes realizados na concentração de 4 µg/mL. Já entre os testes realizados nas concentrações de 8 µg/mL e 16 µg/mL se verificaram sete (30,4%) erros muito graves e um (4,3%) erro grave.

Ademais, ao se analisar os percentuais de sensibilidade e especificidade, os resultados obtidos no presente estudo para o teste Policimbac® foram de 100% e 83,3% respectivamente,

Em relação aos testes da gota, foram verificados percentuais de sensibilidade mais baixos, sendo de 81,8% para o teste na concentração 4 µg/mL e de 72%, para os testes nas concentrações 8 e 16 µg/mL, respectivamente.

Em relação à especificidade, verificou-se o mesmo percentual, de 83,3%, tanto nos testes da gota nas três concentrações, quanto nos do Policimbac®.

## 5 DISCUSSÃO

Uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo são as infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes. O desenvolvimento de novos antibióticos não tem conseguido acompanhar o surgimento de cepas resistentes a antibióticos, sendo cada vez mais necessários novos tratamentos para combater estes patógenos (Mohapatra, 2021).

A falta de métodos diagnósticos rápidos para determinar a ocorrência de patógenos resistentes nas unidades de atenção primária à saúde, culmina muitas vezes na prescrição de antibióticos de amplo espectro, o que influencia no aumento da resistência antimicrobiana. Este uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, entre outros fatores, corrobora para a diminuição das opções de tratamento para combater patógenos multirresistentes. As polimixinas são consideradas uma das últimas opções de tratamento disponíveis até o momento, apresentando uma boa atividade contra as bactérias Gram-negativas, porém as taxas de resistência à colistina vêm apresentando um aumento considerável (Mohapatra, 2021).

A ceftazidima-avibactam (CAV) é uma das novas opções de tratamento para infecções MDR e há estudos que demonstraram taxas mais altas de cura clínica, redução do risco de mortalidade e nefrotoxicidade com terapia baseada em CAV, em comparação com a colistina em *Enterobacteriales* resistentes a carbapenêmicos. Porém, é um antimicrobiano de custo elevado (estimado entre U\$ 7.500 a U\$ 15.000 para um curso de terapia de 7 a 14 dias), além disso, não apresenta eficácia contra cepas produtoras de MBL, como por exemplo a NDM. Sendo assim, as polimixinas ainda são bastante utilizadas (Simon, 2019; Hakeam, 2021; Almangour, 2022).

No presente estudo, de acordo com os resultados obtidos na microdiluição em caldo, 18 das 23 amostras testadas foram resistentes à polimixina B, sendo *K. pneumoniae* a espécie mais frequente. Esse resultado está de acordo com a literatura que aponta *K. pneumoniae* como uma das espécies mais frequentemente associada com a resistência às polimixinas (Rodríguez-Santiago et al., 2021).

É válido ressaltar, entretanto, que amostras identificadas como sendo BGN-NF (*P. aeruginosa* e *A. baumannii*), também apresentaram resistência à polimixina. Embora com menor frequência, há vários relatos na literatura da ocorrência de amostras clínicas resistentes à polimixinas, tanto em *P. aeruginosa*, quanto em *A. baumannii*, incluindo no Brasil (Gomes et al., 2016; Orsi et al., 2019; Lima et al., 2020; Carrasco et al., 2021). Em conjunto, esses

resultados reforçam a disseminação dessa resistência entre BGN, não apenas *Enterobacterales*, mas também entre os não fermentadores.

No teste de disco-difusão, 87% das amostras apresentaram resistência a mais de um carbapenêmico. A grande maioria das amostras também apresentou resistência à polimixina. O aumento do uso de polimixinas para tratamento de infecções multirresistentes, incluindo a resistência aos carbapenêmicos, tem sido apontado como a causa do aumento da resistência a essas drogas (Perez, 2019).

A resistência aos carbapenêmicos e à polimixina é alarmante, pois limita as opções de tratamento. Bartoletti e colaboradores (2016) analisaram 3085 amostras de *K. pneumoniae* entre os anos de 2011 e 2015 em dez hospitais de São Paulo e observaram um aumento significativo na resistência aos carbapenêmicos de 6,8% em 2011 (6,8%) para 35,5% em 2015 e a resistência às polimixinas em amostras de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos foi de 0% em 2011 para 27,1% em 2015. Também foram testadas amostras sensíveis aos carbapenêmicos, sendo a resistência às polimixinas de 0,7% em 2011 para 3,9% em 2014 (Bartoletti, 2016). O que demonstra a frequência maior de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*, entre aquelas amostras com resistência aos carbapenêmicos.

Importante destacar que no presente estudo, duas amostras de *A. baumannii* apresentaram resistência não só aos carbapenêmicos, mas também às polimixinas. Esse patógeno se destaca por sua multirresistência, tornando as infecções causadas por ele de difícil tratamento (Paterson, 2019). No Brasil, Gomes e colaboradores (2016), relataram sobre os altos níveis de multirresistência às diferentes classes de antimicrobianos, inclusive as polimixinas, em *A. baumannii* em amostras de ambiente hospitalar no Rio de Janeiro (Gomes *et al.*, 2016).

Ainda, no presente trabalho, duas amostras de *P. aeruginosa* foram resistentes aos carbapenêmicos e a polimixina. Assim como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* se caracteriza por sua variedade de mecanismos de resistência, tanto intrínseca quanto adquirida, sendo as polimixinas uma das poucas opções de tratamento disponíveis para tratamento de infecções graves por esses microrganismos multirresistentes (Paterson, 2019; Nitz *et al.*, 2021). A única amostra de *P. stuartii*, que é intrinsecamente resistente à polimixina (BrCast, 2021), foi resistente a carbapenêmicos, indicando também uma grande limitação no arsenal terapêutico para o tratamento de possível infecção causada por essa cepa.

Em adição, também foram detectadas seis (31,6%) amostras resistentes a CAV, o que sugere que essas amostras poderiam ser produtoras de MBL, uma vez que esse antimicrobiano não tem atividade contra metalo-enzimas (Shirley, 2018; Guimarães *et al.*, 2019).

No presente trabalho, 85% das amostras foram produtoras de carbapenemases, trazendo um grande alerta e reforçando a necessidade de implementação de medidas de prevenção e controle de infecções por BGN, a fim de se evitar a disseminação em ambientes hospitalares.

De acordo com a ANVISA (2022), os dados da região sul e centro-oeste do Brasil, enviados ao Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Paraná, registraram inclusive o aumento no número de bactérias coprodutoras de carbapenemases em amostras de BGNs multirresistentes (382,5%), levando em consideração o período de 2018 e 2019 em comparação com o período de pandemia (2020-2021). A produção concomitante de *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> foi detectada principalmente no complexo *K. pneumoniae* (59,5%), seguido por *P. aeruginosa* (12,9%) e *Serratia marcescens* (8,8%). O que alerta para a emergência da resistência aos carbapenêmicos em BGN, incluindo não fermentadores, relacionada a produção de carbapenemases no país (ANVISA, 2022).

Foi observado um percentual elevado (12/23;70,5%) de amostras produtoras de MBL, de acordo com os resultados do CIME. Esses resultados alertam que, para as amostras com resistência a polimixina e produtoras de MBL, as opções terapêuticas ainda estariam mais limitadas, uma vez que as novas combinações de inibidores de  $\beta$ -lactâmico- $\beta$ -lactamase disponíveis, por exemplo, ceftazidima-avibactam, são ativas contra a maioria das serino-carbapenemases, mas não contra MBLs (Shirley, 2018). Entretanto, no teste CIME, das 12 amostras classificadas como sendo produtoras de MBLs, apenas seis foram resistentes a CAV. Testes moleculares seriam necessários para uma melhor elucidação desses resultados.

Apenas cinco amostras foram consideradas como produtoras de serino-carbapenemases. Entre as serino-carbapenemases, a mais frequente no Brasil, é a do tipo KPC, particularmente entre amostras de *K. pneumoniae* (Sampaio e Gales, 2016; Andrade, 2017). Entretanto, foi observado um aumento de cepas produtoras de NDM, uma MBL, no Brasil, no período da pandemia da COVID-19, entre 2020-2021 (ANVISA, 2022). No presente estudo, a maioria das amostras foram coletadas entre os anos de 2020 e 2021 e um percentual alto de amostras produtoras de MBL foi observado, entre as amostras testadas pelo método do CIM. Entretanto, no presente trabalho não foi realizada a investigação genotípica, que poderia confirmar a ocorrência do gene *bla*<sub>NDM</sub> ou de outras MBL, nas amostras analisadas através do método fenotípico.

Por outro lado, no estudo realizado por Tsai e colaboradores (2020), em que foram testadas 50 amostras de *E. coli*, sendo 32 produtoras de carbapenemases e, 118 de *K. pneumoniae*, sendo 64 produtores de carbapenemases, avaliou-se os métodos CIMm/CIME em relação a detecção de cepas produtoras de carbapenemases. Os resultados mostraram

sensibilidade de 89,3% e especificidade de 98,7% do CIMm/CIME para detectar MBLs (Tsai, 2020).

A microdiluição em caldo é o método de referência para determinação da susceptibilidade à polimixinas, porém é um método laborioso e demorado que requer muita atenção, além de ser custoso e necessitar de um período de 16-18 horas para obtermos a leitura e interpretação dos resultados, também podendo apresentar alguns problemas que dificultam a sua leitura. Diante disso, métodos de mais fácil implementação na rotina laboratorial e que sejam confiáveis são necessários.

O sistema Policimbac<sup>®</sup> é um teste baseado em microdiluição em caldo, como o teste de referência, permitindo a obtenção dos valores de CIMs, além de ser prático e de mais fácil execução, em relação ao método padrão, pois já apresenta as concentrações seriadas do antibiótico. Apesar de não ser um teste rápido, pois requer um período de incubação de 24 horas, a solução reveladora que vem junto ao teste, auxilia na leitura dos resultados.

Lançado recentemente no mercado, ainda há poucos estudos que avaliam a sua eficácia. No presente estudo, foi analisado o desempenho do Policimbac<sup>®</sup>, que apresentou uma concordância essencial baixa de 56,5%, em comparação a microdiluição em caldo. Porém a concordância categórica foi alta, de 95,7% e apenas uma amostra sensível foi identificada como resistente no Policimbac<sup>®</sup>, correspondendo a um erro grave e nenhum erro muito grave foi detectado.

Em um estudo de 2020, Dalmolin e colaboradores (2020), avaliaram 110 isolados de bacilos Gram-negativos e o teste Policimbac<sup>®</sup> apresentou um percentual bem mais baixo de concordância essencial (16,4%), em comparação a microdiluição em caldo. Porém, a concordância categórica foi de 100% (Dalmolin, 2020).

Em relação aos valores de CIMs obtidos no sistema Policimbac<sup>®</sup>, no estudo atual observou-se que esses apresentaram uma tendência de serem mais elevados em relação aos do padrão-ouro. Dados semelhantes foram obtidos por Dalmolin e col. (2020); esses autores sugeriram que essa elevação nos valores das CIMs poderia ser devida à ressuspensão da polimixina B liofilizada não ser totalmente alcançada com a adição da solução bacteriana nos poços, o que resultaria em um poço com menos polimixina B do que o esperado e, conseqüentemente, a um aumento da CMI (Dalmolin, 2020).

Em outro estudo, realizado por Rocha e colaboradores (2023), o Policimbac<sup>®</sup> também apresentou concordância essencial (EA) mais baixa do que a observada por nós, de 31,4% em 54 amostras de *K. pneumoniae* analisadas e a CA foi um pouco mais alta, de 98%. Em especial, a EA é importante, uma vez que as polimixinas possuem alta toxicidade e a administração do

antimicrobiano pode ocasionar lesão renal aguda, sendo, portanto, importante o uso criterioso e correto desse fármaco (Rocha, 2023).

A especificidade e a sensibilidade do Policimbac<sup>®</sup> no presente estudo foram de 100% e 83,3%, respectivamente. Nos estudos citados acima também houve um valor de especificidade abaixo do ideal. Rocha e colaboradores relatam que o uso de gaze úmida ao incubar a placa melhora o desempenho do teste, já que o painel não tem tampa e pode ocorrer ressecamento e influenciar no resultado de concordância essencial.

No presente estudo, seguimos a recomendação dos fabricantes de incubar na embalagem original. Também é abordado por Rocha e colaboradores sobre o fabricante não fornecer as soluções salinas utilizadas no teste, o que pode ser um problema em grandes laboratórios devido a carga de trabalho (Rocha, 2023).

Importante citar que no nosso estudo, o Policimbac<sup>®</sup> apresentou o fenômeno de “poço saltado” para algumas amostras, o mesmo acontecendo em alguns dos testes com o método-padrão, o que evidencia a natureza catiônica das polimixinas.

O *Colispot* foi realizado com três concentrações de colistina 4, 8 e 16 µg/mL para as 23 amostras e apresentou CAs bem abaixo do ponto de corte recomendado (>90%), sendo encontrado os percentuais de 78,2% (concentração de 4 µg/mL) e de 65,2% (concentrações de 8 e 16 µg/mL). As taxas de erros muito graves também foram bem mais altas do que o aceitável (<3%), para as três concentrações, sendo as taxas frente às concentrações de 8 e 16µg/mL mais elevadas (30,4%). Portanto, apesar da sua praticidade e facilidade de execução e leitura, o teste da gota demonstrou inadequação para detecção de cepas resistentes à colistina, independente da concentração utilizada, embora a concentração de 4 µg/mL tenha apresentado resultados melhores em comparação com as outras testadas.

No estudo de Jouy e colaboradores (2017) demonstrou-se que o *Colispot* foi capaz de detectar as 52 cepas sensíveis e as 54 cepas resistentes de *E. coli* analisadas no estudo, o que difere dos resultados encontrados no presente estudo. Em um estudo realizado por Pasteran e colaboradores (2020) o desempenho do teste da gota para 271 amostras de Gram-negativos, utilizando uma solução de colistina com a concentração final de 16µg/mL, foi bem melhor, verificando-se um percentual de 96,2% de CA, de 3,8% de ME e nenhum VME.

Vale ressaltar que o número pequeno de cepas testadas no presente estudo, pode ter sido um fator contribuinte para os resultados obtidos abaixo do aceitável.

O teste da gota é um método recente e ainda há poucos estudos na literatura que avaliem o seu desempenho, sendo necessários mais estudos sobre esse método fenotípico.

No presente estudo, foi notado que o *Colispot* com amostras de CIMs mais altos de acordo com a microdiluição em caldo apresentou melhor desempenho, na comparação com os resultados obtidos nas amostras com CIMs mais baixos. Resultados semelhantes foram observados por Conceição-Neto e colaboradores (2020), que obtiveram uma concordância categórica > 90% para amostras sensíveis à polimixina e para as resistentes, verificaram CA alta, apenas em amostras resistentes com valores de CIMs  $\geq 128\mu\text{g/mL}$  (Conceição-Neto, 2020). O que pode indicar que o teste da gota com amostras de CIMs mais baixos, poderia ocasionar resultados falso-sensíveis.

Em relação à sensibilidade do teste da gota, no presente estudo, observou-se 81,8% para a concentração de  $4\mu\text{g/mL}$  e 72% para as concentrações de 8 e  $16\mu\text{g/mL}$  e a especificidade foi de 83,3%, para as três concentrações. Diferente do que foi apresentado por Conceição-Neto e colaboradores (2020) em que se verificou taxas de sensibilidade e especificidade de 74% e 100%, respectivamente.

Cabe ressaltar que, no presente estudo, o desempenho do teste da gota foi melhor na concentração de  $4\mu\text{g/mL}$ , apresentando uma sensibilidade maior, quando comparada às taxas encontradas nos testes com as outras concentrações. Outros estudos, com um quantitativo amostral maior se fazem necessários para um melhor entendimento do desempenho desse teste.

Todos os métodos analisados apresentaram desempenho inaceitável, com uma taxa alta de erros muito graves e concordância categórica abaixo do aceitável para o teste da gota e concordância essencial abaixo do aceitável para o Policimbac<sup>®</sup>, o que evidencia ainda mais a necessidade de elaboração e estudo de novos métodos alternativos para a detecção e monitoramento de bactérias resistentes à polimixina, pois com as poucas opções de antimicrobianos para tratamento de infecções MDR, as polimixinas ainda são necessárias.

É importante salientar que o presente trabalho apresentou algumas limitações, como o número baixo de amostras analisado, a faixa estreita de variação das CMI's ( $4\text{-}16\mu\text{g/mL}$ ) obtidas através do método de referência, da maioria das amostras classificadas como resistentes e ainda, a não realização de uma investigação genotípica nas amostras do estudo.



## 6 CONCLUSÃO

- A identificação das 23 amostras do estudo, através do método de MALDI-TOF MS demonstrou um maior número de amostras identificadas como *K. pneumoniae* (N=16); porém amostras de BGN-NF (N=6) também foram identificadas.
- Os resultados apresentados no teste de microdiluição em caldo mostraram 18 amostras como sendo resistentes às polimixinas (*K. pneumoniae*: 12; *P. aeruginosa*: três e *A. baumannii*: duas), indicando a disseminação dessa resistência entre BGN.
- A maioria dos valores de CMIs associados com resistência observados não foram muito altos (4 à 16µg/mL); apenas uma amostra de *P. stuartii*, que é intrinsecamente resistente à polimixina, apresentou um valor de CMI mais elevado (128µg/mL).
- Foi verificado um alto índice de resistência aos beta-lactâmicos entre as amostras testadas (91,3%), sendo que 31,6% também apresentaram resistência a CAV, por disco-difusão.
- Os resultados obtidos nos testes do CIMm e CIMe mostraram 17 (85%) amostras produtoras de carbapenemases, sendo em sua maioria, classificadas como potenciais produtoras de metalo-beta-lactamases (70,5%).
- O sistema Policimbac<sup>®</sup>, apesar de ter apresentado taxas de sensibilidade (100%) e CA (95,7%) elevadas e de não ter apresentado nenhum VME, apresentou uma concordância essencial abaixo do aceitável (56,5%), com uma tendência a valores de CMIs mais elevados do que os da microdiluição em caldo convencional.
- O teste da gota (*Colispot*) apresentou CA abaixo de 90% nas três concentrações, entretanto, nos testes com a concentração de 4µg/mL, verificou-se um percentual um pouco mais alto (78,3%), do que nos testes com as outras concentrações.
- O teste da gota apresentou melhor sensibilidade para a concentração de 4µg/mL (81,8%) do que para as concentrações de 8 e 16 µg/mL (72%); a especificidade foi a mesma (83,3%), nas três concentrações utilizadas.
- Em resumo, os resultados obtidos no estudo apresentaram discrepâncias entre os métodos fenotípicos alternativos para detecção da resistência às polimixinas analisados em comparação com o método de referência, evidenciando a necessidade de mais estudos relacionados a estes testes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. COMUNICAÇÃO DE RISCO Nº 001/2013 - GVIMS/GGTES-ANVISA. 2013. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-001-2013-gvims-ggtes>>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. COMUNICADO DE RISCO GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 01/2021. Brasília, 2022. Disponível em: <http://brcast.org.br>. Acesso em: 24 maio. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 05/2021. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.saude.df.gov.br/documents/37101/0/nota-tecnica-gvims-ggtes-anvisa-no-05-2021-resistencia-microbiana-na-pandemia-da-covid-19.pdf/47f0c888-ac59-2a7f-b845-505408b3e6dd?t=1683292039746>. Acesso em: 24 maio. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. NOTA TÉCNICA No 74/2022-CGLAB/DAEVS/SVS/MS. Brasília, 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-01\\_2021-gvims-ggtes\\_01-09-2021.pdf/view](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-01_2021-gvims-ggtes_01-09-2021.pdf/view). Acesso em: 24 maio. 2023.

AGHAPOUR Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil HS. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist.* 2019 Apr 24;12:965-975. doi: 10.2147/IDR.S199844. PMID: 31190901; PMCID: PMC6519339.

AIRES, C. A. M.; PEREIRA, P. S.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. A. mgrB Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. Oct 21;60(11):6969-6972.

AKTAS, E., Malkoçoğlu, G., Otlu, B., Çopur Çiçek, A., Külah, C., Cömert, F., Sandallı, C., Gürsoy, N. C., Erdemir, D., & Bulut, M. E. (2017). Evaluation of the Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Comparison with the RAPIDEC CARBA NP. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(4), 457–461. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0092>

ALHAMWI, Rama; ÖKSÜZ, Lütfiye. Detection of colistin resistance via four methods in multidrug-resistant Gram-negative rods isolated from blood cultures. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 16, n. 11, p. 1748-1756, 2022.

ALMANGOUR, T. A., Ghonem, L., Aljabri, A., Alruwaili, A., Al Musawa, M., Damfu, N., Almalki, M. S., Alattas, M., Abed, H., Naeem, D., Almalki, N., & Alhifany, A. A. (2022). Ceftazidime-Avibactam versus Colistin for the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriales: A Multicenter Cohort Study. *Infection and drug resistance*, 15, 211–221. <https://doi.org/10.2147/IDR.S349004>

ANDRADE, Leonardo Neves; DARINI, Ana Lúcia Costa. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. *Journal of Infection Control*, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.

ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica (Módulo 5). Acesso em: 20 mai. 2023.

ASLAM, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>

BARDET, L.; J., R. Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains. 2018.

BARDI, Tommaso et al. Nosocomial infections associated to COVID-19 in the intensive care unit: clinical characteristics and outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 40, p. 495-502, 2021.

BARTOLLETTI, F.; SECO, B. M. S.; CAPUZZO DOS SANTOS, C.; FELIPE, C. B. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2016. Oct 22, p. 1849-1851.

BONOMO RA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infect Diseases*. 2018; 3;66(8):1290-1297.

BOYD, S. E., Holmes, A., Peck, R., Livermore, D. M., & Hope, W. (2022). OXA-48-Like  $\beta$ -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(8), e0021622. <https://doi.org/10.1128/aac.00216-22>

BRASIL – ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 28 - Avaliação Nacional dos indicadores de IRAS e RM – 2021.

BrCast – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Tabela pontos de corte BrCAST. 2023.

Breakpoints	Working	Group.	EUCAST
<a href="http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf">http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf</a> . Acesso em: 04 de março de 2023.			

BrCast - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Resistência Intrínseca e Fenótipos Raros. Versão 3.2, fevereiro 2020 do EUCAST. Versão para o português em 05/9/2021. Acesso em 01/07/23.

CAMARGO C. H. (2022). Current status of NDM-producing Enterobacterales in Brazil: a narrative review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 53(3), 1339–1344. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00779-1>

CARDOSO GOMES, Daniela Betzler et al. Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: the occurrence of polymyxin resistance in Rio de Janeiro. *Vigilância Sanitária em Debate-Sociedade Ciência & Tecnologia*, v. 4, n. 3, p. 28-34, 2016.

Carrasco LDM, et al. Polymyxin Resistance Among XDR ST1 Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone Expanding in a Teaching Hospital. *Front Microbiol.* 2021 Mar 26;12:622704. doi: 10.3389/fmicb.2021.622704. PMID: 33897637; PMCID: PMC8063854.

CARVALHO, Thaisa Noceti et al. Evaluation of in-vitro susceptibility of  $\beta$ -lactam-resistant Gram-negative bacilli to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam from clinical samples of a general hospital in southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 56, 2023.

CEPAS, V., & Soto, S. M. (2020). Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(10), 719. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100719>

CHEN, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in microbiology*, 22(12), 686–696. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>

CLSI (2015). *Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems—First Edition: M52-Ed1*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Clinical and Laboratory Standards Institute. M07.11th Ed.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Disponível em: <<https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI2015-M100-S25.unlocked.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2023.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 2022.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C.; da Costa, B. S.; Pontes, L. S. et al. Difficulty in detecting low levels of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates: evaluation of Rapid Polymyxin NP test, Colispot Test and SuperPolymyxin medium. *New Microbes New Infect.* 2020;36:100722. Published 2020 Jun 25.

CORREIA, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *Journal of medical microbiology*, 66(5), 551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>

DALMOLIN, T. V., Carneiro, M. D. S., de Castro, L. P., Volpato, F. C. Z., Wink, P. L., de Lima-Morales, D., & Barth, A. L. (2020). Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the*

*Brazilian Society for Microbiology*], 51(3), 1135–1137. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00246-9>

DANTAS PALMEIRA, J., & Ferreira, H. M. N. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production - a threat around the world. *Heliyon*, 6(1), e03206. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206>

DE OLIVEIRA, Junio Willian Alves; DE PAULA, Cristiane Coimbra. Bactérias gram-negativas multirresistentes: revisão sobre os desafios e demais discussões. Caderno de Publicações Univag, n. 11, 2021.

DE SOUZA, G. H. A., de Oliveira, A. R., Dos Santos Barbosa, M., Rossato, L., da Silva Barbosa, K., & Simionatto, S. (2023). Multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients with COVID-19: An epidemiological and clinical study. *Journal of infection and public health*, 16(8), 1184–1192. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.05.017>

DOI Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(Suppl 7), S565–S575. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>

DOI, Yohei; WACHINO, Jun-ichi; ARAKAWA, Yoshichika. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics*, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.

DOIJAD, Swapnil Prakash et al. Resolving colistin resistance and heteroresistance in Enterobacter species. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 140, 2023.

EL-SAYED AHMED, Mohamed Abd El-Gawad et al. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 868-885, 2020.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. 2016. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin

EZADI, Fereshteh; ARDEBILI, Abdollah; MIRNEJAD, Reza. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 57, n. 4, p. e01390-18, 2019.

FIRMO, Elza Ferreira. Pesquisa de genes de resistência a aminoglicosídeos em isolados de colonização e infecção de *Klebsiella pneumoniae* e *enterobacter aerogenes* portadores do gene blaKPC provenientes de hospitais de Recife-PE. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FURSOYA, N. K., Astashkin, E. I., Knyazeva, A. I., Kartsev, N. N., Leonova, E. S., Ershova, O. N., Alexandrova, I. A., Kurdyumova, N. V., Sazikina, S. Y., Volozhantsev, N. V., Svetoch, E. A., & Dyatlov, I. A. (2015). The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 46. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0108-y>

GAI, Zhibo et al. Molecular mechanisms of colistin-induced nephrotoxicity. *Molecules*, v. 24, n. 3, p. 653, 2019. GALES, Ana Cristina;

GIRARDELLO, Raquel. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 2, n. 2, p. 66-69, 2012.

GARNEAU-TSODIKOVA, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *MedChemComm*, 7(1), 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>

GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie; LABBY, Kristin J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm*, v. 7, n. 1, p. 11-27, 2016.

GIURAZZA, Roberto et al. Emerging treatment options for multi-drug-resistant bacterial infections. *Life*, v. 11, n. 6, p. 519, 2021.

GOMES, Daniela Betzler Cardoso et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: emergência de resistência à polimixina no Rio de Janeiro. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 28-34, 2016.

GUERREIRO, Luísa Fernandes. Cefalosporinas e Carbapenemos no tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-negativas. 2018. Dissertação de Mestrado.

GUIMARÃES, T. *et al.* Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by *Enterobacteriales* Coresistant to Carbapenems and Polymyxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/aac.00528-19>>. Acesso em: 30/06/23.

HAKEAM, H. A., Alsahli, H., Albabtain, L., Alassaf, S., Al Duhailib, Z., & Althawadi, S. (2021). Effectiveness of ceftazidime-avibactam versus colistin in treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 109, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.05.079>

HASSEN, B., Hammami, S., Hassen, A., & Abbassi, M. S. (2022). Molecular mechanisms and clonal lineages of colistin-resistant bacteria across the African continent: a scoping review. *Letters in applied microbiology*, 75(6), 1390–1422. <https://doi.org/10.1111/lam.13818>

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. 10.1128/jcm. 01269-19, 2019.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 2021. The changing face of the family Enterobacteriaceae (order: “*Enterobacterales*”): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clin Microbiol Rev* 34: e00174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>.

JOUY, E.; Haenni, M.; Le Devendec, L. et al. Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. *J Microbiol Methods*. 2017;132:125-127. doi:10.1016/j.mimet.2016.11.017.

LEE, J. et al. Decreased Susceptibility to Polymyxin B during Treatment for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection ▽ . In: (Ed.). *J Clin Microbiol*, v.47, 2009. p.1611-2. ISBN 0095-1137 (Print)1098-660X (Electronic).

LIMA WG, Brito JCM, Cardoso BG, Cardoso VN, de Paiva MC, de Lima ME, Fernandes SOA. Rate of polymyxin resistance among *Acinetobacter baumannii* recovered from hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Aug;39(8):1427-1438. doi: 10.1007/s10096-020-03876-x. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32533271.

LIMA, Mariana Magaldi de Souza et al. Detecção de *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases em pacientes colonizados, atendidos em um Hospital Universitário. 2021.

LISBOA, Thiago; PÓVOA, Pedro. Prevalência e desfechos das infecções nas UTIs brasileiras: mais uma peça no quebra-cabeça. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 24, p. 115-116, 2012.

LOB, S. H.; Biedenbach, D. J.; Badal, R. E.; Kazmierczak, K. M.; Sahm, D. F. Antimicrobial resistance and resistance mechanisms of Enterobacteriaceae in ICU and non-ICU wards in Europe and North America: SMART 2011-2013. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015;3(3):190-197. doi:10.1016/j.jgar.2015.05.005.

LO-TEN-FOE, J. R. et al. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, estest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007 Oct;51(10):3726-30.

MAGAGNIN CM, Rozales FP, Antochervis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, Sampaio JM, Zavascki AP. Dissemination of *bla*<sub>OXA-370</sub> gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Oct;36(10):1907-1910. doi: 10.1007/s10096-017-3012-x. Epub 2017 May 30. PMID: 28555403

MASHALY, Ghada El-Saeed; MASHALY, Mervat El-Sayed. Colistin-heteroresistance in carbapenemase-producing *Enterobacter* species causing hospital-acquired infections among Egyptian patients. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 24, p. 108-113, 2021.

MOHAPATRA, S. S., Dwibedy, S. K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of biosciences*, 46(3), 85. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00209-8>

MORRILL, Haley J. et al. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. In: *Open forum infectious diseases*. Oxford University Press, 2015. p. ofv050.

MOTA, Fernanda Soares; OLIVEIRA, Heloisa Aquino de; SOUTO, Renata Carneiro Ferreira. 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.

MUNITA, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

NITZ F, et al. Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of *bla*<sub>OXA-23</sub>-*bla*<sub>OXA-51</sub> and *mcr-1* in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*. 2021 Apr 9;9(4):786. doi: 10.3390/microorganisms9040786. PMID: 33918745; PMCID: PMC8069495.

NORDMANN, P. et al. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. 2016-05-01 2016. Disponível em: < <https://jcm.asm.org/content/54/5/1395> >.

NORDMANN, P., Poirel, L., Carrër, A., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). How to detect NDM-1 producers. *Journal of clinical microbiology*, 49(2), 718–721. <https://doi.org/10.1128/JCM.01773-10>

NORDMANN, Patrice, Poirel, Laurent, Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 69, Issue Supplement\_7, 1 December 2019, Pages S521–S528, <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>

OLIVEIRA, Victor Rocha Mendes; PAIVA, Magna Cristina; LIMA, William Gustavo. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 31, p. 101459, 2019.

ORSI TD, Perdigão Neto LV, Martins RCR, Levin AS, Costa SF. Polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* assigned as ST245: First report in an intensive care unit in São Paulo, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Mar;16:147-149. doi: 10.1016/j.jgar.2018.12.021. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30634055.

PAPP-WALLACE, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>

PATERSON, D. L., & Bonomo, R. A. (2019). Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens: The Urgent Need for 'Old' Polymyxins. *Advances in experimental medicine and biology*, 1145, 9–13. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_2)

PENIDO, C. (2019). Carbapenêmicos (beta-lactâmicos). < <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3480829/.../Carbapenêmicos%20v1.pdf?>> Acesso em 22 de mai. de 2023.

PEREIRA, Carlos Alberto Sanches et al. Pesquisa de bacilos Gram negativos não fermentadores presente em torneiras de um hospital privado do município de volta redonda, RJ. *Episteme Transversalis*, v. 3, n. 1, 2017.

PEREZ, Federico et al. Polymyxins: to combine or not to combine?. *Antibiotics*, v. 8, n. 2, p. 38, 2019.



- PITOUT, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A., & Matsumura, Y. (2019). The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00102-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>
- PITOUT, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159–166. doi:10.1016/s1473-3099(08)70041-0
- POIREL, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- POTRON, Anais; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.
- QUAN, J., Dai, H., Liao, W., Zhao, D., Shi, Q., Zhang, L., Shi, K., Akova, M., & Yu, Y. (2021). Etiology and prevalence of ESBLs in adult community-onset urinary tract infections in East China: A prospective multicenter study. *The Journal of infection*, 83(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.06.004>
- RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules*, v. 22, n. 12, p. 2267, 2017.
- REDGRAVE, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in microbiology*, 22(8), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- REYGAERT W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- RIBEIRO, Alexandra Manuela Ferreira. Farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).
- RITTER, Amanda Gabrieli et al. Colonização de pacientes críticos por bactérias Gram-negativas multirresistentes. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 1, p. 3650-3666, 2022.
- ROCHA, N. C., Lopes, J. M., Russi, K. L., Palmeiro, J. K., & Girardello, R. (2023). Low performance of Policimbac® broth microdilution in determining polymyxin B MIC for *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1139784. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1139784>
- RODRÍGUEZ-SANTIAGO, J., Cornejo-Juárez, P., Silva-Sánchez, J., & Garza-Ramos, U. (2021). Polymyxin resistance in *Enterobacteriales*: overview and epidemiology in the Americas. *International journal of antimicrobial agents*, 58(5), 106426. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106426>
- SAMPAIO JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*. 2016 Dec;47 Suppl 1(Suppl 1):31-37. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.002. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27825605; PMCID: PMC5156504.

- SAMPAIO, J. L., Ribeiro, V. B., Campos, J. C., Rozales, F. P., Magagnin, C. M., Falci, D. R., da Silva, R. C., Dalarosa, M. G., Luz, D. I., Vieira, F. J., Antochévis, L. C., Barth, A. L., & Zavascki, A. P. (2014). Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(6), 3566–3567. <https://doi.org/10.1128/AAC.02510-13>
- SCHINDLER, Melvin; OSBORN, M. J. Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry*, v. 18, n. 20, p. 4425-4430, 1979.
- SEIBERT, Gabriela et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. *Einstein (São Paulo)*, v. 12, p. 282-286, 2014.
- SHIRLEY M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018 Apr;78(6):675-692. doi: 10.1007/s40265-018-0902-x. PMID: 29671219.
- SHOAIB, M., Hussain, A., Satti, L. *et al.* Evaluation of rapid polymyxin Nordmann Poirel test for detection of polymyxin resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39, 2195–2198 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03942-4>
- SILVA, Ketrin Cristina da; LINCOPAN, Nilton. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, p. 91-99, 2012.
- SIMNER, P. J. et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to Determine Colistin in Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol*, 2019 Jan 30;57(2):e01163-18.
- SIMON, M. S., Sfeir, M. M., Calfee, D. P., & Satlin, M. J. (2019). Cost-effectiveness of ceftazidime-avibactam for treatment of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteremia and pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(12), e00897-19. Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/AAC.00897-19>
- SIMPSON, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature reviews. Microbiology*, 17(7), 403–416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>
- SRINIVAS, P., & Rivard, K. (2017). Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Current infectious disease reports*, 19(11), 38. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0596-3>
- STEFANIUK, Elżbieta M.; TYSKI, Stefan. Colistin resistance in Enterobacterales strains—a current view. *Polish Journal of Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 417-427, 2019.
- TAMMA, P. D., & Hsu, A. J. (2019). Defining the Role of Novel  $\beta$ -Lactam Agents That Target Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8(3), 251–260. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz002>

TSAI, Y. M., Wang, S., Chiu, H. C., Kao, C. Y., & Wen, L. L. (2020). Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *BMC microbiology*, 20(1), 315. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02010-3>

TSIVKOVSKI, Ruslan; TOTROV, Maxim; LOMOVSKAYA, Olga. Biochemical characterization of QPX7728, a new ultrabroad-spectrum beta-lactamase inhibitor of serine and metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 64, n. 6, p. 10.1128/aac.00130-20, 2020.

VIANELLO, Marco Aurélio. Resistência bacteriana às fluoroquinolonas em indígenas da Amazônia brasileira. 2020. Tese de Doutorado.

VIVAS R, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2020; 53:e20200064.

WANG, Yuan et al. Impact of polymyxin resistance on virulence and fitness among clinically important gram-negative bacteria. *Engineering*, v. 13, p. 178-185, 2022.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*, 2017 Feb 28;543(7643):15.

XIONG, L., Wang, X., Wang, Y., Yu, W., Zhou, Y., Chi, X., Xiao, T., & Xiao, Y. (2022). Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. *WIREs mechanisms of disease*, 14(6), e1571. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1571>

YANG, Q., Pogue, J. M., Li, Z., Nation, R. L., Kaye, K. S., & Li, J. (2020). Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance. *Infectious disease clinics of North America*, 34(4), 723–750. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.08.003>

YIN, Jianhua et al. Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 104, p. 3771-3780, 2020.

YOHEI DOI, Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 69, Issue Supplement\_7, 1 December 2019, Pages S565–S575, <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>