

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À
POLIMIXINA B

BRASÍLIA - DF

2026

ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À
POLIMIXINA B

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Tanise Vendruscolo Dalmolin

Brasília - DF

2026

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dm de Souza Andrade Arruda, Isabel
Metodologias alternativas na detecção da resistência à
polimixina B / Isabel de Souza Andrade Arruda; orientador
Tanise Vendruscolo Dalmolin. Brasília, 2026.
53 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)
Universidade de Brasília, 2026.

1. Bactérias gram-negativas. 2. Polimixina B. 3.
Resistência bacteriana. 4. Testes de sensibilidade a
antimicrobianos. I. Vendruscolo Dalmolin, Tanise, orient.
II. Título.

ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À
POLIMIXINA B

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 12 de março de 2026.

Banca Examinadora

Tanise Vendruscolo Dalmolin - UnB

Tatiana Amabile de Campos - UnB

Fabiana Caroline Zempulski Volpato - UFPR

RESUMO

Nos últimos anos o uso frequente de polimixinas acelerou o aumento da resistência bacteriana a essa classe de antimicrobianos. Atualmente, a microdiluição em caldo é considerada a metodologia de referência para a determinação da sensibilidade bacteriana às polimixinas. No entanto, é uma metodologia com muitas desvantagens. Diante do cenário exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho das metodologias *Agar Spot*, *Drop Test*, Microeluição do disco de polimixina B e Blue-Poli e suas modificações na detecção de resistência à polimixina B em bactérias gram-negativas. Além disso, o estudo propôs duas novas metodologias: Microdiluição com eluição do disco de polimixina B e Red-Poli. Foram utilizados 100 isolados bacterianos, dos quais 50 isolados eram sensíveis à polimixina B e 50 resistentes. Para Microdiluição com eluição do disco de polimixina B, os resultados apresentaram sensibilidade de 90%, especificidade de 100%, CA de 95% e EA de 92%, não sendo encontrados ME, porém, foram encontrados 5% de VME. Para *Ágar Spot*, os resultados apresentaram sensibilidade de 94%, especificidade de 100%, CA de 97% e EA de 95%, não sendo encontrados ME, apenas 3% de VME. Para *Drop Test*, os resultados apresentaram sensibilidade de 96%, especificidade de 100%, CA de 98% e EA de 86%, não sendo encontrados ME, apenas 2% de VME. Para Microeluição do disco da polimixina B, os resultados apresentaram uma sensibilidade de 96%, especificidade de 100% e CA de 98%, não sendo encontrados ME, apenas 2% de VME. Para as metodologias de Blue-Poli e Red-Poli os resultados apresentaram sensibilidade, especificidade e CA de 100%, não sendo encontrados ME e VME. Diante das altas taxas de especificidade, sensibilidade, CA e EA para todas as metodologias, concluiu-se que houve uma boa eluição da polimixina B a partir do disco, além de ser mais fácil sua manipulação dentro dos laboratórios clínicos por não ser necessário realizar a pesagem do pó de polimixina, tornando essas metodologias com um excelente custo-benefício. Dessa forma, todas as metodologias testadas poderiam ser incluídas na rotina dos laboratórios na avaliação da sensibilidade à polimixina B, em especial as metodologias de *Ágar Spot*, Microeluição da polimixina B, Blue-Poli e Red-Poli.

Palavras-chave: Bactérias gram-negativas; Polimixina B; Resistência bacteriana; Testes de sensibilidade a antimicrobianos.

ABSTRACT

In recent years, the frequent use of polymyxins has accelerated the increase in bacterial resistance to this class of antimicrobials. Currently, broth microdilution is considered the gold standard for determining bacterial susceptibility to polymyxins. However, it is a methodology with many disadvantages. Given the scenario described, the present study aimed to evaluate the performance of the Agar Spot, Drop Test, Polymyxin B disk microelution, and Blue-Poli methodologies, as well as their modifications, in detecting polymyxin B resistance in gram-negative bacteria. Furthermore, the study proposed two new methodologies: Microdilution with polymyxin B disk elution and Red-Poli. One hundred bacterial isolates were used, of which 50 isolates were sensitive to polymyxin B and 50 were resistant. For microdilution with polymyxin B disk elution, the results showed a sensitivity of 90%, specificity of 100%, CA of 95%, and EA of 92%, with no ME found; however, 5% VME was found. For Spot Agar, the results showed a sensitivity of 94%, specificity of 100%, CA of 97%, and EA of 95%, with no ME found, only 3% of VME. For the Drop Test, the results showed a sensitivity of 96%, specificity of 100%, CA of 98%, and EA of 86%, with no ME found, only 2% of VME. For the microelution of polymyxin B disk, the results showed a sensitivity of 96%, specificity of 100%, and CA of 98%, with no ME found, only 2% of VME. For the Blue-Poli and Red-Poli methodologies, the results showed sensitivity, specificity, and CA of 100%, with no ME or VME found. Given the high rates of specificity, sensitivity, CA, and EA for all methodologies, it was concluded that there was good elution of polymyxin B from the disk, and its manipulation within clinical laboratories is easier because it eliminates the need to weigh the polymyxin powder, making these methodologies excellent value for money. Therefore, all the tested methodologies could be included in the routine of laboratories for evaluating sensitivity to polymyxin B, especially the Agar Spot, Polymyxin B disk microelution, Blue-Poli, and Red-Poli methodologies.

Keywords: Gram-negative bacteria; Polymyxin B; Bacterial resistance; Antimicrobial susceptibility testing.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo primeiramente a Deus pela oportunidade que me concedeu de realizar esse mestrado. Foi um longo caminho até chegar aqui, houve muitos dias difíceis, muitos dias muito cansativos e até mesmo dias em que pensei em desistir. Mas uma coisa que posso afirmar com toda certeza é que Deus me sustentou, me deu forças quando me faltaram, me consolou e me segurou pela mão para chegar até o fim. Agradeço por ter estado ao meu lado durante toda a caminhada desde a graduação e pela sua infinita graça e misericórdia sobre a minha vida. De fato, viver ao lado Dele foi a melhor escolha que eu poderia ter feito e tudo o que conquistei até aqui foi para que o nome Dele fosse glorificado e conhecido através da minha vida.

Aos meus pais, Aline e Paulo, e ao meu irmão, Paulo Henrique, agradeço por todo apoio e suporte que me deram para que eu conseguisse realizar esse trabalho com êxito. Obrigada pela disponibilidade e sacrifícios que fizeram para me ajudar e tornar a conclusão desse mestrado possível. Sou grata também pelos conselhos, consolo e palavras de incentivo que lançaram sobre a minha vida para me animar e não me deixar desistir.

Aos meus avós, Gessi e Clemilda, agradeço pelas muitas orações, por todo o apoio e incentivo que sempre me deram. Obrigada por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, por me ensinarem a ter resiliência e persistir, mesmo em meio às dificuldades. E obrigada por me ensinarem a confiar no agir de Deus e ter fé Nele.

Agradeço às minhas amigas, Duda e Júlia, pela amizade e apoio durante esse tempo. Por terem acreditado em mim e por sempre me incentivarem. Obrigada pelas muitas risadas, apoio, consolo, pelas lágrimas e pelos momentos de descontração. Vocês tornaram esse período mais feliz e leve para mim.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório, Larissa e Rebeca, agradeço por toda a ajuda, incentivo e apoio que me deram durante todo o trajeto. Obrigada por terem sido um exemplo para mim. Em especial, gostaria de agradecer a Larissa por ter estado comigo todos os dias de experimentos, por toda a ajuda, consolo e risadas. Meus dias no laboratório foram bem mais alegres e divertidos por ter você ao meu lado. Foi uma honra trabalhar ao lado de vocês. Certamente esses momentos ficarão guardados no meu coração e sentirei muita falta dessa parceria e companhia.

Por fim, gostaria de agradecer à minha professora e orientadora, Tanise, que fez muito mais do que me orientar. Você foi um presente de Deus na minha vida, é minha maior inspiração e exemplo como pesquisadora. Obrigada por ter confiado em mim e no meu

trabalho, por ter me proporcionado momentos de aprendizado e por ter me dado essa oportunidade de realizar um mestrado. Obrigada por todo o seu apoio, incentivo, conselhos, amizade e companheirismo. Foi uma honra ser orientada por você. Espero tê-la ainda comigo por muito tempo.

*“Quando passares pelas águas, eu serei contigo;
quando passares pelos rios, eles não te farão submergir;
quando passares pelo fogo, não te queimará, nem a chama arderá em ti.
Porque eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, o teu Salvador.”
Isaiás 43: 2-3*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da colistina e polimixina B e suas diferenças.....	19
Figura 2. Mecanismos de ação das polimixinas: clássico de lise da membrana (lado esquerdo) e alternativo de contato vesícula-vesícula (lado direito).....	20
Figura 3. Mecanismo de resistência bacteriana às polimixinas: Lado esquerdo - bactéria sensível às polimixinas; Lado Direito - bactéria resistente às polimixinas, através da modificação do lipopolissacarídeo.....	21
Figura 4. Preparação e fluxo de trabalho da microdiluição em caldo.....	26
Figura 5. Preparação e fluxo de trabalho da microdiluição com eluição do disco de polimixina B.....	27
Figura 6. Preparação e fluxo de trabalho da metodologia <i>Agar Spot</i>	28
Figura 7. Preparação e fluxo de trabalho da metodologia <i>Drop Test</i>	29
Figura 8. Preparação e fluxo de trabalho da microeluição da polimixina B.....	31
Figura 9. Preparação e fluxo de trabalho do Blue-Poli.....	32
Figura 10. Preparação e fluxo de trabalho do Red-Poli.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos resultados da metodologia de referência (microdiluição em caldo) com os resultados encontrados na microdiluição com eluição do disco de polimixina B.....	37
Tabela 2. Comparação dos resultados da metodologia de referência com os resultados encontrados no <i>Agar Spot</i>	38
Tabela 3. Comparação dos resultados da metodologia de referência com os resultados encontrados no <i>Drop Test</i>	39
Tabela 4. Desempenho das metodologias alternativas para pesquisa da resistência à polimixina B.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 Resistência aos antimicrobianos.....	16
3.2 Polimixinas e a resistência.....	17
3.3 Metodologias para detecção da resistência às polimixinas.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Isolados bacterianos.....	25
4.2 Microdiluição em caldo.....	25
4.3 Microdiluição com eluição do disco de polimixina B.....	26
4.4 <i>Agar Spot</i>	27
4.5 <i>Drop Test</i>	29
4.6 Microeluição da polimixina B.....	30
4.7 Blue-Poli.....	32
4.8 Red-Poli.....	33
4.9 Análise dos resultados.....	35
5 RESULTADOS.....	37
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos emergiu como uma grande ameaça à saúde humana do século XXI, sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo (Lancet *et al.*, 2022; Murray *et al.*, 2022; Xuan *et al.*, 2023). O número de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes tem se tornado cada vez mais frequente e um grande desafio para as instituições de saúde pública, devido às altas taxas de mortalidade e opções limitadas de tratamento (Jean *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022; Olaitan *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2022). Os carbapenêmicos são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bacilos gram-negativos. Porém, com o aumento da sua utilização na prática clínica ocorreu a disseminação de resistência a essa classe de antimicrobianos (Abniki *et al.*, 2023; Duda-Madej *et al.*, 2023; Wise *et al.*, 2024).

Em 2024, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista global de patógenos que causam risco à saúde humana, onde Enterobacterales resistentes às cefalosporinas de terceira geração e resistentes aos carbapenêmicos, *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina foram classificados na categoria de prioridade crítica (WHO, 2024).

Atualmente, novas terapias estão sendo aprovadas como forma de tratamento das infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos, como ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam e meropenem-vaborbactam. Porém, essas combinações não estão disponíveis em muitas partes do mundo, bem como não são abrangentes contra todos os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, como por exemplo as metalo-betalactamases (Abniki *et al.*, 2023; Cruz-López *et al.*, 2022; Duda-Madej *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2024). Diante desse cenário, as polimixinas são consideradas como uma das últimas opções de tratamento de infecções causadas, principalmente, por bactérias multirresistentes, devido a sua forte atividade bactericida (Moffat *et al.*, 2019; Soman *et al.*, 2021).

As polimixinas são antimicrobianos eficazes contra bactérias gram-negativas, no entanto, foram abandonadas na década de 1970 devido aos seus consideráveis efeitos adversos, principalmente a nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Mesmo conhecendo seus efeitos nefrotóxicos, a partir da década de 90 as polimixinas foram reintroduzidas na prática clínica devido à urgente necessidade de tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes. (Lee *et al.*, 2022; Poirel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022; Tran *et al.*, 2016).

As polimixinas apresentam um mecanismo de ação em que o alvo principal é o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa das bactérias gram-negativas. As

polimixinas ligam-se de forma seletiva ao lipídeo A do LPS, interagindo com o grupo fosfato e substituindo os íons cálcio e magnésio, ocasionando a ruptura da membrana e posteriormente a sua morte celular (Poirel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022).

A resistência às polimixinas ocorre através de modificações no grupo fosfato do lipídeo A, através da adição de fosfoetanolamina (PEtN) ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N), impedindo assim que as polimixinas se liguem à membrana externa da bactéria (Nordmann *et al.*, 2016; Olaitan *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2022). Essas modificações são codificadas por cromossomos e ocorrem devido a mutações no sistema de dois componentes (PmrAB e PhoPQ) e mutações do regulador negativo de PhoPQ e no gene *mgrB* (Larroy-Maumus *et al.*, 2023; Nordmann *et al.*, 2016). Além disso, estudos relataram a presença de genes de resistência mediados por plasmídeos, denominados gene *mobile colistin resistance (mcr)*, que codificam uma enzima da família das fosfoetanolaminas transferases, adicionando PEtN ao LPS (Liu *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2022). Ademais, há espécies bacterianas que são naturalmente resistentes às polimixinas, como isolados de *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* e *Vibrio cholerae* (Olaitan *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2017). Apesar de muitos estudos explicarem os mecanismos de resistência às polimixinas, as informações quanto às suas características farmacocinéticas e seu mecanismo metabólico ainda não foram totalmente elucidadas (Li X *et al.*, 2023).

Atualmente, a metodologia de microdiluição em caldo é considerada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* como referência para a determinação da sensibilidade bacteriana às polimixinas (Foldes *et al.*, 2022; Shinohara *et al.*, 2022). No entanto, apesar de ser considerado o padrão-ouro, essa metodologia pode ser trabalhosa, exige preparo manual e atenção minuciosa, o resultado é demorado, com um custo alto, e podendo apresentar erros de interpretação, sendo inviável para algumas rotinas laboratoriais (Foldes *et al.*, 2022; Llorente *et al.*, 2022; Nordmann *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2017; Shinohara *et al.*, 2022).

Outras metodologias, como disco-difusão e fita gradiente, não são recomendadas para determinar a sensibilidade às polimixinas devido à baixa difusão do antimicrobiano no ágar, o que resulta em baixa sensibilidade. Além disso, metodologias automatizadas não são recomendadas, devido a possíveis resultados apresentando heterorresistência, sendo esses resultados não interpretáveis pelo equipamento (Kar *et al.*, 2021; Pasteran *et al.*, 2020).

A fim de atender à necessidade de detecção rápida, prática e de menor custo de microrganismos causadores de infecções, diversas metodologias têm sido desenvolvidas no meio científico (Kar *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2022; Rubens *et al.*, 2024). *Agar Spot*, *Drop Test*, Microeluição da polimixina B e Blue-Poli são metodologias alternativas à microdiluição em caldo para polimixinas e estão sendo estudadas e aprimoradas para que possam ser incorporadas na rotina de laboratórios clínicos.

Agar Spot é uma metodologia que se baseia na diluição das polimixinas no meio de cultura ágar Mueller-Hinton (MH), posteriormente inoculado com o isolado bacteriano de interesse (Pasteran *et al.*, 2020). *Drop Test* é uma metodologia que se baseia na deposição de gotas de diferentes concentrações de polimixinas em placa de ágar MH, previamente inoculada com o isolado bacteriano de interesse. Com isso, é possível determinar o perfil de sensibilidade da bactéria através da presença do halo de inibição (Shinohara *et al.*, 2022).

Microeluição das polimixinas se baseia na eluição do disco de polimixina em caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (MHCA) e posteriormente é adicionada em cada tubo a suspensão bacteriana padronizada (Simner *et al.*, 2019). Já o teste Blue-Poli é um teste colorimétrico que se baseia na preparação de uma solução com glicose e azul de bromotimol e adição da suspensão bacteriana (Pillonetto *et al.*, 2022).

Diante do cenário exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho das metodologias com algumas modificações de *Agar Spot*, *Drop Test*, Microeluição da polimixina B e Blue-Poli na detecção de resistência à polimixina B em bactérias gram-negativas. Além disso, foram propostas duas novas metodologias: Microdiluição com eluição do disco de polimixina B e Red-Poli.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de metodologias alternativas na detecção de resistência à polimixina B em bactérias gram-negativas.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados bacterianos frente à polimixina B pela metodologia de referência, microdiluição em caldo.
- Determinar a CIM utilizando a eluição do disco de polimixina B em substituição ao pó da polimixina B através da microdiluição em caldo.
- Avaliar as metodologias *Agar Spot*, *Drop Test*, Microeluição da polimixina B e Blue-Poli, e suas modificações.
- Propor e avaliar o desempenho da nova metodologia Red-Poli, desenvolvida no presente estudo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Resistência aos antimicrobianos

A descoberta dos antimicrobianos foi um grande marco na história, sendo considerada uma das maiores conquistas da medicina no século XX (Baran *et al.*, 2023). Pode-se dizer que seu uso no meio clínico salvou vidas ao reduzir consideravelmente a mortalidade e morbidade causadas por infecções bacterianas e mudou as práticas de saúde em todo o mundo (Baran *et al.*, 2023; Sumeet *et al.*, 2024). O primeiro antimicrobiano a ser descoberto e introduzido na prática clínica foi a penicilina, substância isolada do fungo *Penicillium notatum* e descoberta por Alexander Fleming em 1928 (Sumeet *et al.*, 2024). A descoberta da penicilina foi o ponto de partida para a pesquisa e desenvolvimento de outros antimicrobianos e novas moléculas com atividades antimicrobianas (Serna *et al.*, 2022).

Nas décadas seguintes à descoberta da penicilina, o número de antimicrobianos recém-descobertos e identificados se tornou crescente, atingindo seu pico entre as décadas de 1930 e 1960, sendo assim conhecida como a “Era de Ouro dos Antibióticos” (Baran *et al.*, 2023; Serna *et al.*, 2022). Dessa forma, os antimicrobianos começaram a ser utilizados em larga escala de forma indiscriminada, com prescrições excessivas e uso generalizado na indústria, como na pecuária e agricultura (Baran *et al.*, 2023; Serna *et al.*, 2022). Com isso, começou a ser observado que as bactérias eram capazes de desenvolver mecanismos que as tornavam resistentes aos antimicrobianos, ou seja, o antimicrobiano passou a perder a sua eficiência em inibir o crescimento bacteriano (Pulingam *et al.*, 2022; Serna *et al.*, 2022). A resistência aos antimicrobianos foi disseminada rapidamente e o desenvolvimento de novos antimicrobianos se tornou escasso, tornando a resistência aos antimicrobianos uma das maiores e mais sérias ameaças à saúde pública no século XXI (Serna *et al.*, 2022).

A pandemia da COVID-19 fez aumentar essa preocupação devido ao elevado número de internações, levando a prescrições de antimicrobianos para o tratamento de infecções secundárias. Além disso, a sobrecarga de trabalho, escassez de profissionais e falta de tempo para exercer o pleno exercício de controle de infecção ocasionaram uma sobrecarga dos sistemas de saúde e impediram o rastreamento das infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos (Pulingam *et al.*, 2022).

De acordo com estudo presidido por Jim O’Neill, aproximadamente 700 mil pessoas morrem a cada ano em todo o mundo devido a infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos e estima-se que até 2050, 10 milhões de pessoas poderão morrer por esse

mesmo motivo. Dessa forma, fazem-se necessários a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos, assim como o desenvolvimento de metodologias alternativas para a rápida detecção das infecções e seus causadores, reduzindo assim o uso de antimicrobianos de forma desnecessária e a implementação de programas de prevenção e uso racional de antimicrobianos (O'Neill, 2016).

As bactérias multirresistentes (MDR) são patógenos bacterianos que se tornaram resistentes ou insensíveis a altas doses de três ou mais classes de antimicrobianos (Gauba *et al.*, 2023). Esses mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro principais grupos: inativação do antimicrobiano, redução das concentrações intracelulares do antimicrobiano, alteração do alvo do antimicrobiano ou superexpressão de bombas de efluxo (Gauba *et al.*, 2023; Huemer *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2023).

A inativação de antimicrobianos se dá por enzimas capazes de destruir irreversivelmente ou neutralizar os efeitos dos antimicrobianos. O principal exemplo desse mecanismo de resistência é a ação de clivagem hidrolítica de β -lactamases no anel β -lactâmico de antimicrobianos β -lactâmicos. Já a limitação do influxo de antimicrobianos se dá pela regulação da permeabilidade celular ou por meio de barreiras de parede celular. Dessa forma, há uma diminuição das concentrações intracelulares do antimicrobiano e isso pode se dar por meio da redução ou mutação de porinas que seriam responsáveis por permitir a entrada desses antimicrobianos na célula bacteriana (Gauba *et al.*, 2023; Huemer *et al.*, 2020).

A alteração do alvo ocorre através de modificações estruturais que impedem a ligação do antimicrobiano e assim não permitem a sua ação. Já as bombas de efluxo são proteínas localizadas na membrana intracelular das bactérias, sendo elas responsáveis por eliminar as substâncias nocivas da parede celular, diminuindo a concentração dos antimicrobianos dentro da célula (Gauba *et al.*, 2023; Xiao *et al.*, 2023; Xuan *et al.*, 2023).

3.2. Polimixinas e a resistência

Devido ao aumento alarmante da resistência aos carbapenêmicos, à falta de terapias específicas para tratar infecções multirresistentes e ao desenvolvimento de novos antimicrobianos, as polimixinas, que antes haviam sido abandonadas em meados de 1970 devido aos seus efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos e ototóxicos, foram então reintroduzidas na prática clínica em 1990. Elas ressurgiram como tratamento de último recurso agindo contra bactérias gram-negativas multirresistentes. No entanto, vale ressaltar que essa reintrodução se deu não devido a uma melhora em seu perfil de segurança, mas sim devido ao surgimento de bactérias multirresistentes (El-Sayed *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022).

As polimixinas são pertencentes à classe de antimicrobianos polipeptídeos cíclicos não ribossômicos; dentro desse grupo há cinco tipos: Polimixinas A, B, C, D e E. No entanto, apenas as polimixinas B e E (colistina) estão disponíveis para uso no mercado (El-Sayed *et al.*, 2020).

A colistina é classificada como um decapeptídeo e normalmente é administrada como sulfato de colistina (pró-fármaco oral) ou como metanossulfonato de colistina em casos de administração via intravenosa (Poirel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022). A colistina foi utilizada pela primeira vez em 1950 administrada por via intravenosa. Mas foi somente em 1959 que a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou seu uso específico como agente antimicrobiano contra bactérias gram-negativas. Posteriormente a isso, as polimixinas foram desenvolvidas em outras formulações e hoje se encontram também em formulações tópicas para infecções oculares e auriculares e podem ser encontradas para descontaminação intestinal seletiva (El-Sayed *et al.*, 2020).

A polimixina B e a colistina diferem na sua estrutura apenas por um aminoácido no anel peptídico, onde na polimixina B há uma fenilalanina e na colistina, uma leucina. A polimixina B é um antimicrobiano polipeptídico cíclico derivado do *Bacillus polymyxa*, sendo administrada como um antimicrobiano ativo, ao contrário da colistina, que é administrada como um pró-fármaco inativo. Dessa forma, é capaz de atingir concentrações plasmáticas de forma mais rápida. Pesquisas sugerem que a nefrotoxicidade causada pela polimixina B pode estar associada ao seu acúmulo em células tubulares renais, enquanto sua eliminação pode ocorrer por meio da excreção biliar. Estudos também afirmam que o uso da polimixina B, no lugar da colistina, se tornou mais vantajoso, devido às suas características farmacocinéticas (Aysert-Yildiz *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023; Poirel *et al.*, 2017).

A colistina e a polimixina B são usadas na medicina veterinária há várias décadas, para fins profiláticos e terapêuticos, também usadas como aditivo alimentar para gado (El-Sayed *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022). Além disso, o uso indiscriminado na medicina clínica levou a níveis elevados de resistência em bactérias gram-negativas, principalmente em espécies como *A. baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Silva *et al.*, 2022).

As polimixinas apresentam um estreito espectro de ação contra bactérias. Elas atuam contra bactérias gram-negativas, principalmente da ordem Enterobacterales, sendo elas *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Além disso, atuam também contra bactérias gram-negativas não fermentadoras como *A. baumannii*,

P. aeruginosa e *Stenotrophomonas maltophilia*. Não são ativas contra cocos gram-negativos, bactérias gram-positivas e bactérias anaeróbias (Poirel *et al.*, 2017).

Com relação à sua estrutura, as polimixinas são polipeptídeos catiônicos formados por um heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídica acilada na extremidade N-terminal por uma cauda de ácidos graxos. A toxicidade das polimixinas está relacionada com a hidrofobicidade da parte acil-graxo N-terminal, também tendo atividade antimicrobiana (Poirel *et al.*, 2017) (Figura 1).

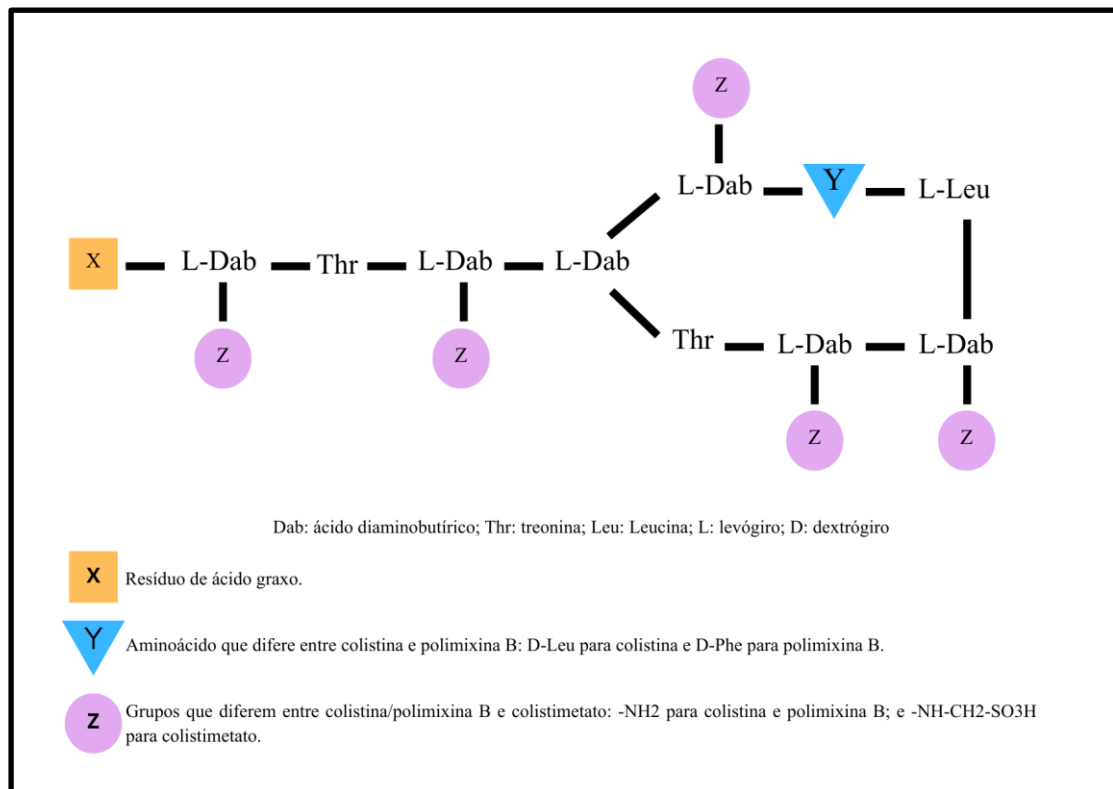


Figura 1. Estrutura química da colistina e polimixina B e suas diferenças.

Fonte: Poirel *et al.*, 2017.

As polimixinas possuem como alvo a membrana externa das bactérias gram-negativas (El-Sayed *et al.*, 2020; Poirel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022). Essa membrana externa tem por função servir como uma barreira de permeabilidade contra agentes nocivos, dentre eles os antimicrobianos. Esse papel protetor se dá por meio da presença de LPS na superfície da célula, impedindo assim a penetração de antimicrobianos (El-Sayed *et al.*, 2020). LPS é composto por três domínios, sendo eles: o polissacarídeo central, a cadeia do antígeno O e um lipídio A. Este último atua como uma âncora hidrofóbica na membrana, desempenhando um papel na manutenção da estabilidade e integridade da membrana (El-Sayed *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022).

Dessa forma, o mecanismo de ação das polimixinas se baseia na sua ligação seletiva ao LPS presente na membrana bacteriana. Isso se dá por meio da ligação eletrostática entre o resíduo de ácido α , γ -diaminobutírico da polimixina, carregado positivamente, e o grupo fosfato do lipídio A, carregado negativamente. Com isso, os cátions divalentes, cálcio e magnésio, que desempenham o papel de formar pontes cruzadas entre as moléculas do lipídio A, são assim deslocados e o LPS é então desestabilizado. A partir disso, a permeabilidade da membrana é aumentada, ocasionando a sua ruptura, o conteúdo citoplasmático é extravasado e ocorre a morte celular (El-Sayed *et al.*, 2020; Poirel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022). No entanto, vale ressaltar que, embora o alvo seja o LPS, o mecanismo de ação das polimixinas ainda não está totalmente esclarecido (Figura 2).

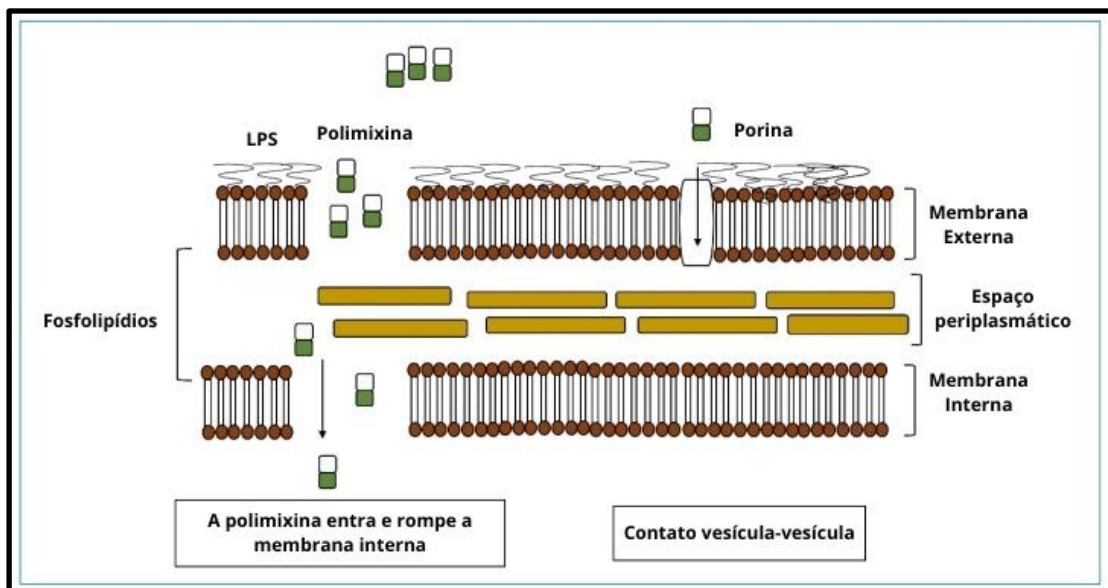


Figura 2. Mecanismos de ação das polimixinas: clássico de lise da membrana (lado esquerdo) e alternativo de contato vesícula-vesícula (lado direito). LPS: lipopolissacarídeo

Fonte: SILVA *et al.*, 2022.

A resistência às polimixinas geralmente se baseia na modificação do lipídio A do LPS pela bactéria. Essa modificação se dá por meio da adição de grupos catiônicos de pEtN ou L-Ara4N, que são carregados positivamente. Dessa forma, há uma redução da carga negativa da membrana externa, ocasionando uma redução da interação eletrostática dos grupos fosfato do lipídio A com as moléculas de polimixinas (Larrouy-Maumus *et al.*, 2023; Moffatt *et al.*, 2019; Nang *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022) (Figura 3).

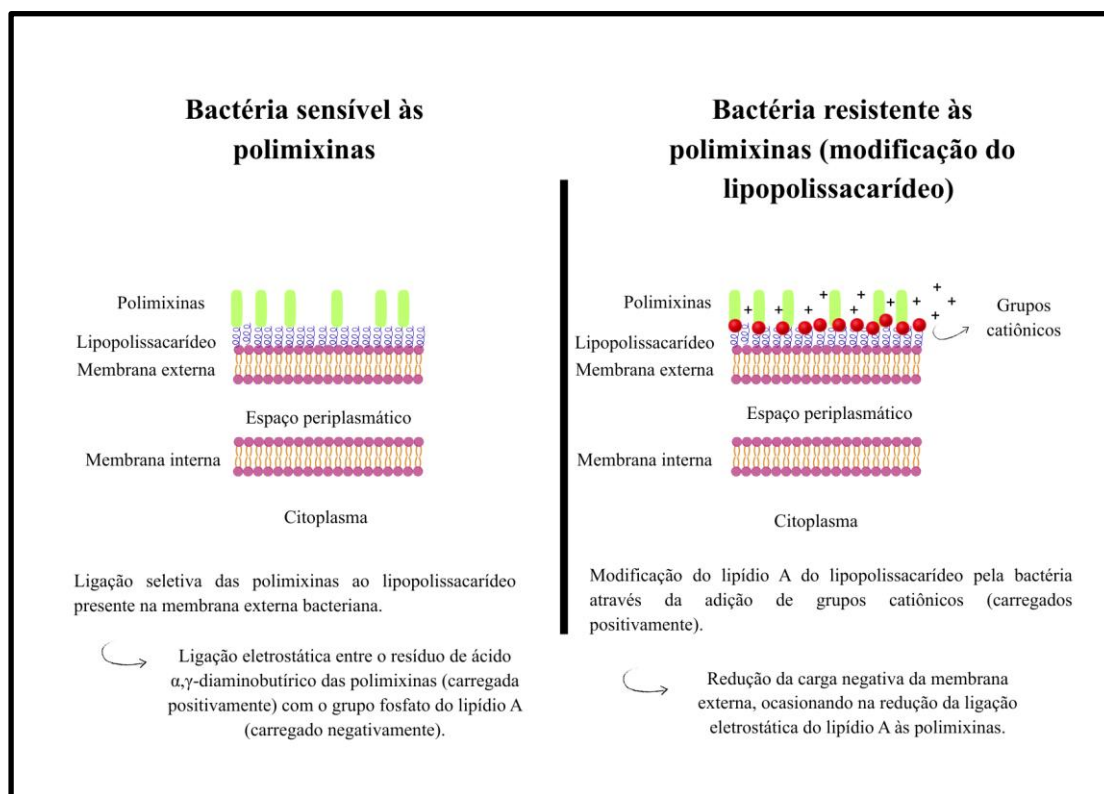


Figura 3. Mecanismo de resistência bacteriana às polimixinas: Lado esquerdo - bactéria sensível às polimixinas; Lado direito - bactéria resistente às polimixinas, através da modificação do LPS.

Fonte: elaborado pelo autor.

Essa modificação normalmente ocorre por meio de alterações nos sistemas de dois componentes PmrAB e PhoPQ e mutações no regulador negativo de PhoPQ e MgrB, ambos codificados por cromossomos. O mecanismo de resistência mais comum encontrado em *K. pneumoniae* é por meio da inativação de *mgrB*, um regulador negativo do sistema PhoPQ, levando assim à superexpressão de PhoPQ, resultando na resistência (Larrouy-Maumus *et al.*, 2023; Nang *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

Além disso, também já foram identificados genes de resistência mediados por plasmídeos, sendo o primeiro gene conhecido denominado *mcr* descoberto por Liu e colaboradores em 2016. Após essa descoberta, foram rapidamente identificados outros genes móveis de resistência às polimixinas. O gene *mcr* atua codificando uma enzima da família das fosfoetanolamina transferases, responsável pela síntese e conjugação do pEtN ao lipídio A. Essa modificação do lipídio A não é um mecanismo novo, no entanto a transferência do gene por meio de plasmídeo é o motivo de grande preocupação, visto que há potencial de bactérias gram-negativas multirresistentes adquirirem os plasmídeos portadores do gene *mcr* (Larrouy-Maumus *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2016; Nang *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

Acredita-se que a disseminação do gene *mcr* ocorreu primeiramente de animais para humanos, pois a primeira descrição do gene *mcr-1* foi descoberta na China em alimentos de origem animal. Posteriormente, o gene foi identificado na América Latina em espécies de *E. coli* em um paciente hospitalizado. Até o momento, dez variantes do gene *mcr* já foram identificadas (Ling *et al.*, 2020; Nang *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2020).

3.3. Metodologias para detecção da resistência às polimixinas

O aumento do comprometimento das polimixinas acarretou o desenvolvimento de metodologias para avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias. A metodologia de microdiluição em caldo é considerada como referência para avaliação da sensibilidade às polimixinas, sendo recomendada pelo CLSI e EUCAST. A metodologia se baseia na diluição seriada das polimixinas na presença do inóculo bacteriano. No entanto, é uma metodologia demorada, com um custo elevado e que exige preparo manual (Poirel *et al.*, 2017).

Metodologias de difusão em disco e em gradiente não são recomendadas pelo CLSI e EUCAST para determinação da sensibilidade às polimixinas, devido às suas taxas de erro inaceitavelmente altas em virtude da baixa difusão das polimixinas no ágar. Metodologias automatizadas também não são recomendadas devido a resultados falsos-positivos e falsos-negativos. Dessa forma, laboratórios clínicos ficam sem opções para detecção de resistência às polimixinas. Com isso, metodologias alternativas vêm sendo estudadas e desenvolvidas, como forma de complementação ao teste de referência, podendo futuramente ser utilizadas como único teste (Pillonetto *et al.*, 2022; Simner *et al.*, 2019).

Agar Spot é uma metodologia alternativa endossada pelo CLSI, baseada na diluição da polimixina em ágar e posteriormente na realização de estrias com o inóculo bacteriano de interesse. Pasteran e colaboradores (2020) testaram a eficácia dessa metodologia utilizando duas concentrações de colistina: 2µg/mL e 3µg/mL. Diante dos resultados positivos encontrados, os autores afirmaram que essa metodologia é adequada para triagem sistemática de resistência à colistina em bacilos gram-negativos, apresentando um desempenho semelhante à metodologia de referência. Afirmaram ser de fácil execução e por isso podem ser utilizados na rotina laboratorial, em adição aos testes utilizados no dia a dia (Pasteran *et al.*, 2020).

Ainda sobre o *Agar Spot*, já foram realizados estudos utilizando a polimixina B em substituição à colistina e foram relatados altos valores de especificidade e sensibilidade. Dessa forma, estudos baseando-se em diluição em ágar apresentaram um bom desempenho, sendo comprovada sua eficácia para a utilização em laboratórios clínicos (Raro *et al.*, 2021).

Outra metodologia alternativa avaliada para ser aplicada na prática clínica é o *Drop Test*. Inicialmente, ela foi desenvolvida para testar defensinas contra isolados de *Brucella*. Em 2017 ela foi adaptada por Jouy e colaboradores, em que foram testados isolados de *E. coli* frente a uma concentração de 8mg/L de colistina. Posteriormente, a metodologia foi alterada para que assim fosse possível realizar o teste para outras espécies bacterianas (Jouy *et al.*, 2017; Pasteran *et al.*, 2020).

Drop Test se baseia na deposição de gotas de diferentes concentrações de polimixinas em uma placa de ágar MH previamente inoculada com o isolado bacteriano de interesse. É uma metodologia considerada simples, tendo em vista que não é necessária a utilização de equipamentos adicionais e é possível realizar o teste de diferentes isolados em um curto período (Jouy *et al.*, 2017; Llorente *et al.*, 2022; Pasteran *et al.*, 2020; Perez *et al.*, 2020). Além disso, tanto a metodologia do *Agar Spot* quanto a do *Drop Test* podem ser utilizadas para pesquisa de resistência à polimixina B em espécies de *Acinetobacter spp.*, podendo assim ser consideradas também como uma metodologia de triagem (Pasteran *et al.*, 2020).

A microeluição das polimixinas é outra metodologia desenvolvida com o intuito de servir como um teste tão preciso quanto a microdiluição em caldo, no entanto, sendo mais adequada para o uso rotineiro nos laboratórios, devido a sua praticidade, baixa complexidade, com materiais facilmente disponíveis e de baixo custo (Humphries *et al.*, 2019). O estudo desenvolvido por Simner e colaboradores foi o primeiro a pesquisar sobre a metodologia de microeluição como uma alternativa prática para a rotina laboratorial, para identificação de sensibilidade à colistina em bacilos gram-negativos. O estudo afirma que essa metodologia é realizada com materiais de fácil disponibilidade, acessíveis e de baixo custo. A microeluição supera diversas barreiras existentes nas metodologias disponíveis para determinar a sensibilidade antimicrobiana à colistina, pois além de ser uma alternativa prática e de baixo custo, é precisa e fornece resultados corretos. Podendo assim servir como uma metodologia complementar à microdiluição em caldo (Simner *et al.*, 2019).

Recentemente, um estudo utilizou a metodologia da microeluição para pesquisa de resistência à colistina em amostras de Enterobacterales e *P. aeruginosa*. O teste resultou em ótimos resultados e apresentou um excelente desempenho, comparado à microdiluição em caldo. Além disso, o teste mostrou ter um ótimo custo-efetividade, ser fácil de reproduzir e ter dados precisos, tornando-se uma alternativa viável (Chandankhede *et al.*, 2025).

Além dessas metodologias mencionadas, há também opções fenotípicas sendo desenvolvidas. Uma delas é a chamada Blue-Poli, que se baseia na modificação da metodologia de eluição do disco de polimixina, juntamente com uma metodologia colorimétrica. O Blue-

Poli utilizou o agente colorimétrico azul de bromotimol se baseando no que foi sugerido na metodologia Blue-Carba, desenvolvida em 2013 por Pires e colaboradores. Esse teste consiste na visualização de mudança de coloração de ciano escuro para amarelo, em casos de crescimento bacteriano. Essa metodologia desenvolvida por Pillonetto e colaboradores é de simples execução, de baixo custo, de fácil visualização e com um tempo de leitura rápida (até 4h), podendo ser aplicada na rotina laboratorial como teste de triagem para determinar a sensibilidade de Enterobacterales às polimixinas. Vale ressaltar que esta metodologia não foi validada para espécies de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, não sendo então um teste recomendado para estas espécies (Pillonetto *et al.*, 2022; Pires *et al.*, 2013).

Outra metodologia alternativa fenotípica é o Teste Rápido NP, desenvolvido por Nordmann e colaboradores (2016). Esse teste é capaz de detectar o crescimento bacteriano na presença de uma concentração de polimixina. Essa detecção do crescimento bacteriano ocorre por meio do metabolismo de carboidratos pelos isolados e isso pode ser identificado com uma mudança de coloração, através de um indicador de pH. Diferentemente do Blue-Poli, o indicador utilizado é o vermelho de fenol. Dessa forma, a mudança de coloração, em casos de crescimento bacteriano, vai de laranja/vermelho para amarelo, em um período de até 4h. O teste é considerado fácil de realizar, com alta sensibilidade e especificidade, de baixo custo e fácil de manusear, independentemente do mecanismo molecular de resistência às polimixinas que o isolado possa vir a ter. Em comparação a microdiluição em caldo, o teste rápido NP pode apresentar resultados 16h mais cedo do que o teste de referência. Com isso, essa metodologia pode ser útil para a triagem inicial da resistência às polimixinas (Nordmann *et al.*, 2016).

Alguns anos depois da criação do teste rápido NP, foi desenvolvida uma modificação para que essa metodologia pudesse abranger isolados de *A. baumannii*. Esse teste modificado se baseia na utilização de resazurina como indicador de pH para detecção de resistência à colistina em um período de até 4h. Nesse caso, os isolados que são resistentes à colistina, reduzem a resazurina azul em um produto com coloração rosa. Dessa forma, essa modificação funciona como um complemento ao Teste Rápido NP, exclusivamente para isolados de *A. baumannii* (Bouvier *et al.*, 2021).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados para o desenvolvimento deste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana de Porto Alegre/RS e pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília/DF. As espécies bacterianas incluíram bacilos gram-negativos fermentadores e não fermentadores de glicose, oriundos de coleções de amostras provenientes de estudos de vigilância.

Foram testados 100 isolados bacterianos, dentre eles 51 *K. pneumoniae*, 1 *Citrobacter freundii*, 42 *E. coli*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 2 *A. baumannii*, 2 *P. aeruginosa* e 1 *S. marcescens*. Dentre os 100 isolados bacterianos, 50 isolados eram considerados sensíveis e 50 isolados eram considerados resistentes à polimixina B, de acordo com a metodologia de referência (microdiluição em caldo). Além disso, 5 espécies apresentavam o gene *mcr* (4 *E. coli* e 1 *K. pneumoniae*).

4.2 Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo foi utilizada como metodologia de referência. Essa metodologia é realizada através da diluição seriada da polimixina B (0,125µg/mL até 128µg/mL) em uma placa de 96 poços, juntamente com um inóculo bacteriano (5×10^5 UFC/mL em cada poço).

Foram adicionados 50µL de MHCA em toda a placa, exceto na primeira linha (1). Em seguida, foram adicionados 100µL da solução de polimixina de 256µg/mL na primeira linha (1) da placa. A diluição seriada foi realizada (50µL) das linhas 1 a 10.

O inóculo bacteriano foi padronizado na escala 0,5 de McFarland e logo em seguida foi realizada uma diluição 1:100 (1980µL de CAMH e 20µL da suspensão bacteriana já padronizada). Após a diluição, foram pipetados 50µL do inóculo bacteriano nas linhas de 1 a 11 da placa. Dessa forma, a linha 11 foi destinada ao controle positivo, que só contém CAMH e o inóculo bacteriano, e a linha 12 foi destinada ao controle negativo, pois só contém CAMH. A placa foi incubada por um período de 18 ± 2 horas a uma temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de ponto de corte do BrCAST, onde $\text{CIM} \leq 2\mu\text{g/mL}$ são considerados sensíveis e $\text{CIM} > 2\mu\text{g/mL}$ são considerados resistentes à polimixina B (BrCAST, 2025). A metodologia está sintetizada na figura abaixo (Figura 4).

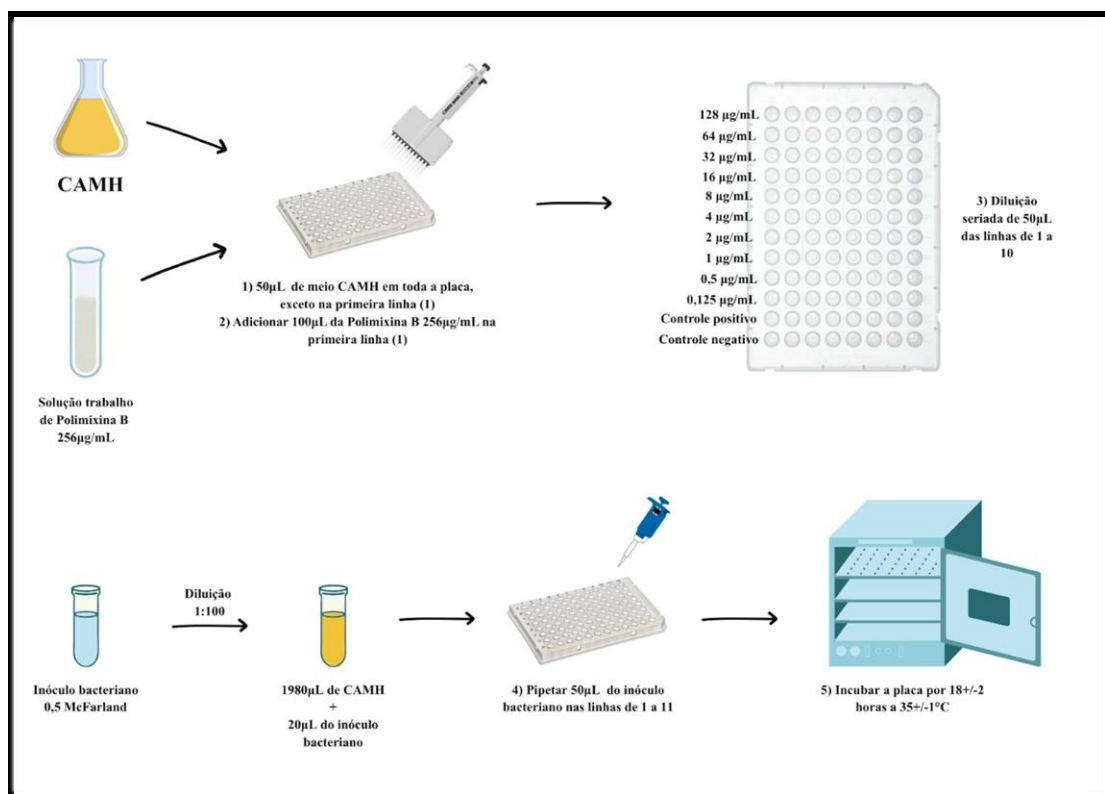


Figura 4. Preparação e fluxo de trabalho da microdiluição em caldo.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 Microdiluição com eluição do disco de polimixina B

Em nosso estudo substituímos o pó de polimixina B pela eluição do disco de polimixina B. Para a obtenção de uma concentração inicial de 32µg/mL, foram acrescentados 8 discos (1 disco = 30µg) de polimixina B em 7,5mL de MHCA. Dessa forma, a diluição seriada foi realizada de uma concentração de 16µg/mL (poço 1) até 0,015µg/mL (poço 10). A metodologia segue a mesma que a microdiluição em caldo. Foram adicionados 50µL de caldo MHCA em toda a placa, exceto na primeira linha (1). Em seguida, foram adicionados 100µL da solução de polimixina com os discos de polimixina B eluídos na primeira linha (1) da placa. Após essa etapa, foi realizada a diluição seriada de 50µL das linhas 1 a 10.

O inóculo bacteriano foi padronizado na escala 0,5 de McFarland e logo em seguida foi realizada a diluição 1:100 (1980µL de CAMH e 20µL da suspensão bacteriana já padronizada). Após isso, foram pipetados 50µL do inóculo bacteriano nas linhas de 1 a 11 da placa. Dessa forma, a linha 11 foi destinada ao controle positivo, que só continha CAMH e o inóculo, e a linha 12 foi destinada ao controle negativo, pois só continha CAMH. A placa foi então colocada na estufa por um período de 18±2 horas a uma temperatura de 35±1°C. Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de ponto de corte do BrCAST, onde CIM ≤2µg/mL

são considerados sensíveis e CIM $>2\mu\text{g/mL}$ são considerados resistentes à polimixina B (BrCAST, 2025). A metodologia está sintetizada na figura abaixo (Figura 5).

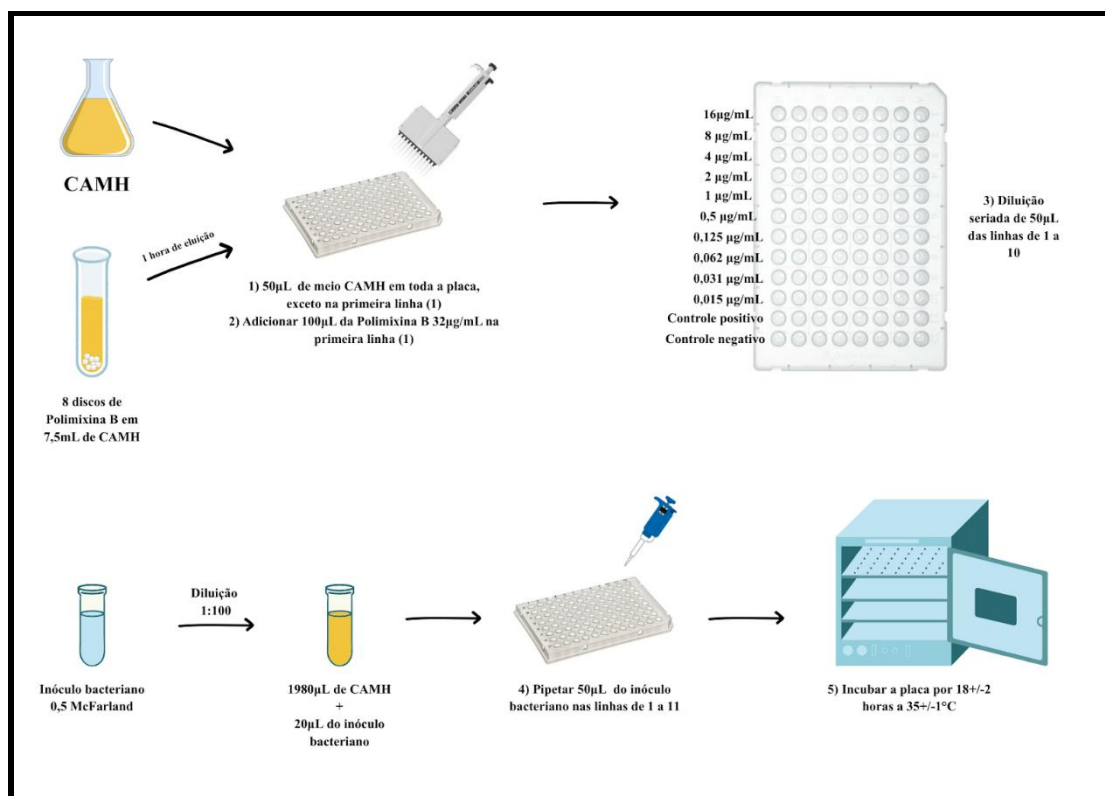


Figura 5: Preparação e fluxo de trabalho da microdiluição com eluição do disco de polimixina B.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Agar Spot

Agar Spot foi baseado no estudo desenvolvido por Pasteran e colaboradores (2020) com algumas modificações. No estudo de Pasteran foram utilizadas placas com apenas duas concentrações ($2\mu\text{g/mL}$ e $3\mu\text{g/mL}$) (Pasteran *et al.*, 2020). Em nosso estudo foram utilizadas três concentrações ($2\mu\text{g/mL}$, $4\mu\text{g/mL}$ e $8\mu\text{g/mL}$), além da utilização da polimixina B, ao invés de colistina. A metodologia está sintetizada na figura abaixo (Figura 6).

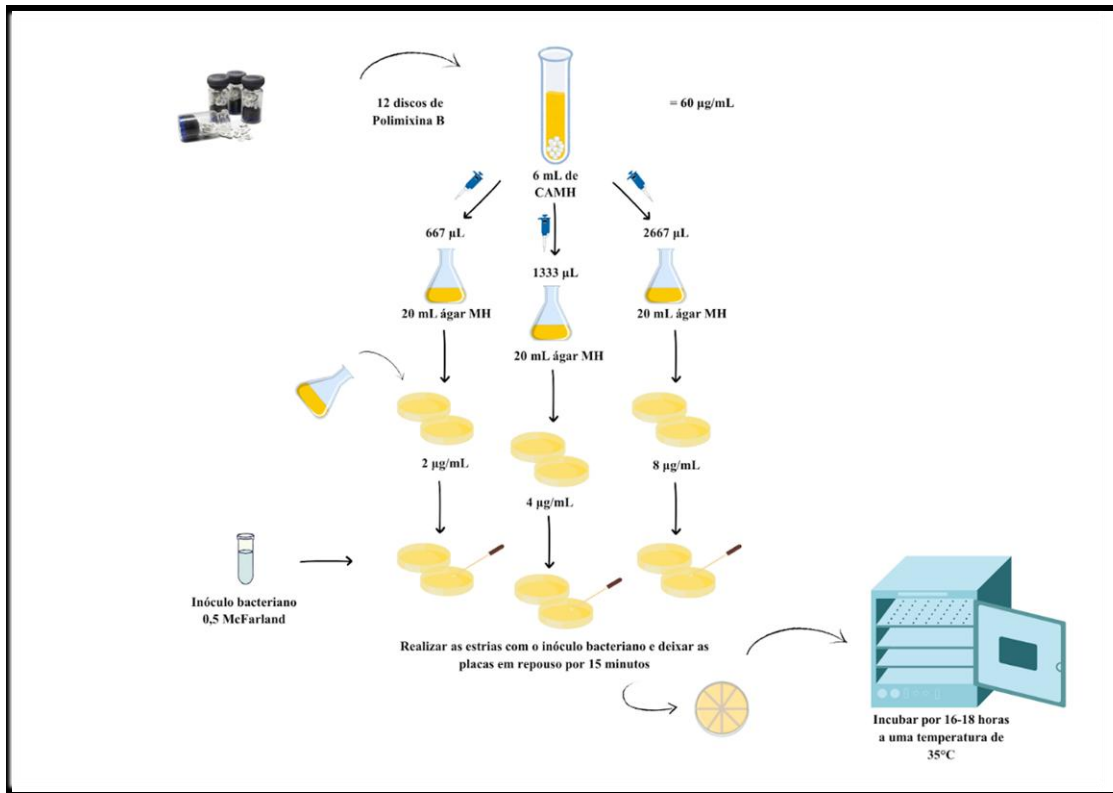


Figura 6. Preparação e fluxo de trabalho da metodologia *Agar Spot*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Em um volume de 6 mL de CAMH foram adicionados 12 discos de polimixina B (1 disco = 300UI = 30µg), que foram eluídos durante 60 minutos, resultando em uma solução-mãe de 60µg/ml. Após a eluição foram realizadas as placas de ágar MH contendo 2µg/mL de polimixina B (667µL solução-mãe + 20mL ágar MH), 4µg/mL (1333µL solução-mãe + 20mL ágar MH) e 8µg/ml (2667µL solução-mãe + 20mL ágar MH).

Os isolados bacterianos de interesse foram ajustadas para escala padrão de 0,5 McFarland e foram inoculadas nas placas com polimixina B através de estrias de aproximadamente 20mm. Em uma única placa de Petri de 90mm foi possível testar 8 isolados bacterianos diferentes. As placas já inoculadas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente durante 15 minutos e incubadas a 35°C por um período entre 16 -18 horas.

Após transcorrido o tempo de incubação, foi observado o crescimento (no mínimo 1 colônia) nas diferentes concentrações da polimixina B. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano e o ponto de corte foi baseado no estabelecido pelo BrCAST, onde $CIM > 2\mu\text{g/mL}$ é considerada resistente à polimixina B e $CIM \leq 2\mu\text{g/mL}$ é considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2025).

4.5 Drop Test

Drop Test foi baseado no artigo publicado por Shinohara e colaboradores (2022) com algumas modificações. No estudo de Shinohara foram testadas duas concentrações (12 μ g/mL e 16 μ g/mL) (Shinohara *et al.*, 2022). Em nosso estudo testamos quatro concentrações, além da substituição da colistina pela polimixina B. A metodologia está sintetizada na figura abaixo (Figura 6).

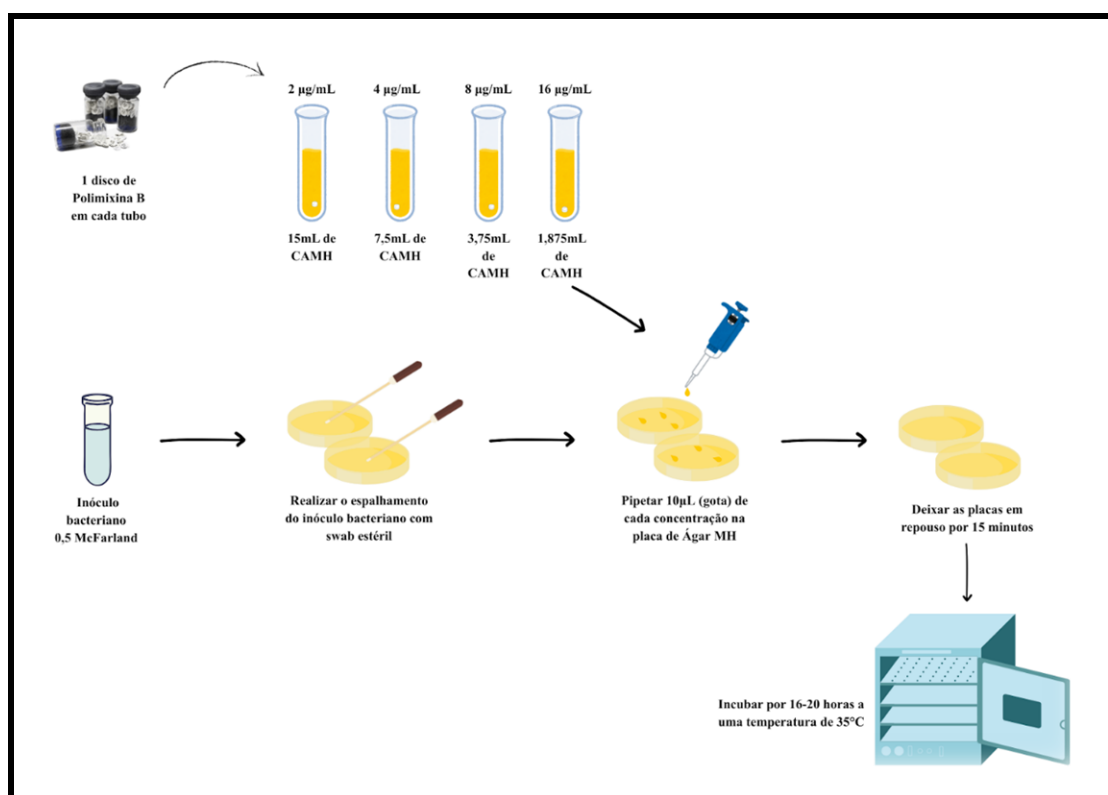


Figura 7. Preparação e fluxo de trabalho da metodologia *Drop Test*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Foram preparadas soluções de polimixina B em 4 concentrações diferentes, sendo elas: 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL e 16 μ g/mL. Essas soluções foram preparadas a partir de discos de polimixina B (1 disco = 300UI = 30 μ g) em volumes de CAMH em tubos estéreis de vidro para evitar a adsorção da polimixina B. Para a concentração de 2 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B (30 μ g) adicionado a um volume de 15mL de CAMH; para 4 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B em 7,5mL de CAMH; para 8 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B em 3,75mL de CAMH e para 16 μ g/mL foi utilizado 1 disco de polimixina B em 1,875mL de CAMH.

Os 4 tubos foram deixados em repouso por 1 hora em temperatura ambiente para completa eluição do antimicrobiano. Os inóculos dos isolados testados foram padronizados

para 0,5 da escala de McFarland e repicados por espalhamento com swab estéril em uma placa de ágar MH. Posteriormente, foram depositados 10 μ L (1 gota) de cada concentração da polimixina B (2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL e 16 μ g/mL) na placa de ágar inoculado e deixados por 15 minutos em repouso, em temperatura ambiente, para permitir a total absorção da gota. As placas foram então incubadas a 35°C por 16 -18 horas. As gotas foram feitas a uma distância mínima de 2cm uma da outra, para que não houvesse contaminação ou interferência entre as concentrações.

Após transcorrido o período de incubação, foram observadas as zonas de inibição (halos) nas gotas das diferentes concentrações da polimixina B. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano e o ponto de corte foi baseado no estabelecido pelo BrCAST, onde CIM >2 μ g/mL é considerada resistente à polimixina B e CIM \leq 2 μ g/mL é considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2025).

4.6 Microeluição da polimixina B

O teste de Microeluição foi baseado no estudo desenvolvido por Simmer e colaboradores (2019) com modificações. No estudo de Simmer foram utilizadas três concentrações (1, 2 e 4 μ g/mL) (Simner *et al.*, 2019). Em nosso estudo testamos apenas uma concentração de 2 μ g/mL, além da substituição da colistina por polimixina B. A metodologia está exemplificada na figura abaixo (Figura 8).

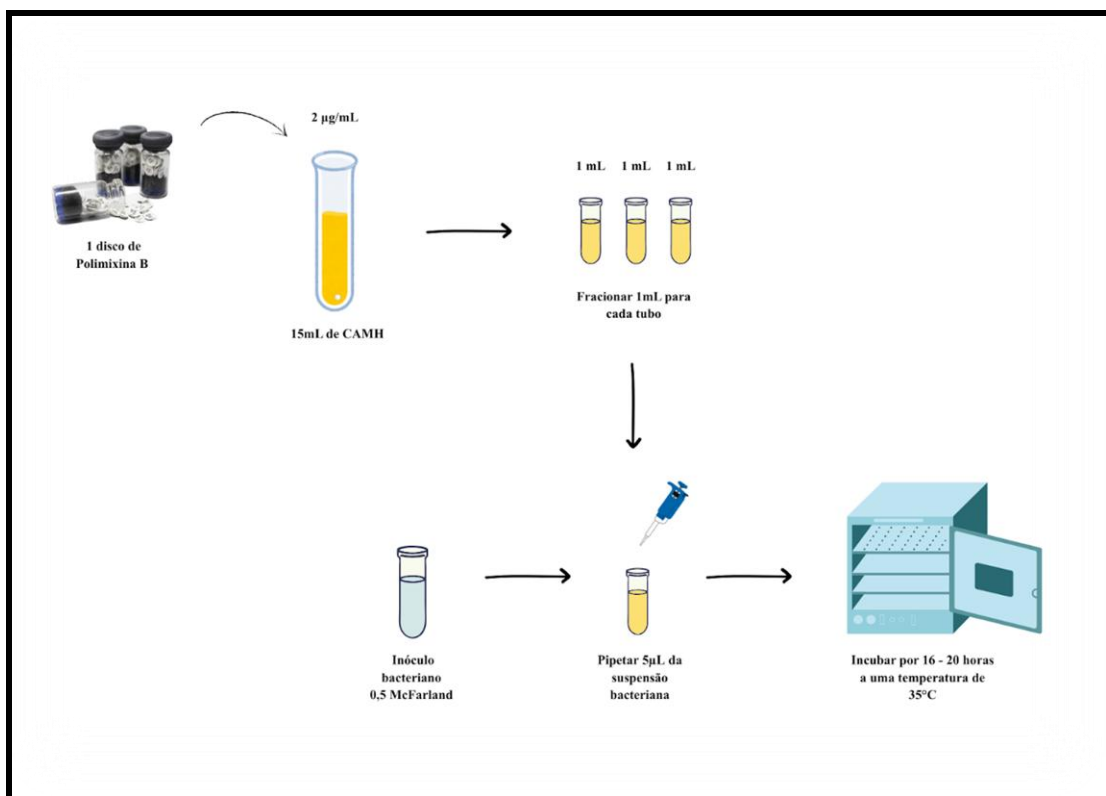


Figura 8. Preparação e fluxo de trabalho da microeluição da polimixina B.

Fonte: elaborado pelo autor

Em um tubo contendo 15 mL de CAMH foi adicionado 1 disco de polimixina B para obter uma concentração de 2 µg/mL. Após a adição do disco, o antimicrobiano foi eluído por 1 hora e em seguida, visando a otimização do teste, esse volume foi fracionado em um volume de 1 mL para tubos de ensaio. Enquanto isso, foi realizada a suspensão bacteriana padronizada na escala 0,5 McFarland e foram adicionados 5 µL ao tubo. Os tubos foram então incubados por 16-18 horas a uma temperatura de 35°C.

Após o período de incubação, os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de ponte de corte do BrCAST, onde CIM >2 µg/mL é considerada resistente à polimixina B e CIM ≤2 µg/mL é considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2025). Nesse caso, como foi testada apenas uma concentração de 2 µg/mL e os resultados foram interpretados através da turbidez, caso o tubo de ensaio apresentasse turbidez, significava que a espécie bacteriana testada é resistente à polimixina B e apresenta uma CIM de >2 µg/mL. Caso não apresentasse turbidez e estivesse totalmente límpido, a espécie analisada era considerada sensível à polimixina B (CIM ≤2 µg/mL).

4.7 Blue-Poli

A metodologia Blue-Poli foi realizada baseando-se no teste de Pilonetto e colaboradores (2022) com algumas modificações. O teste realizado por Pilonetto utilizou discos de colistina e em nosso estudo utilizamos discos de polimixina B (Pilonetto *et al.*, 2022). A metodologia está exemplificada na figura abaixo (Figura 9).

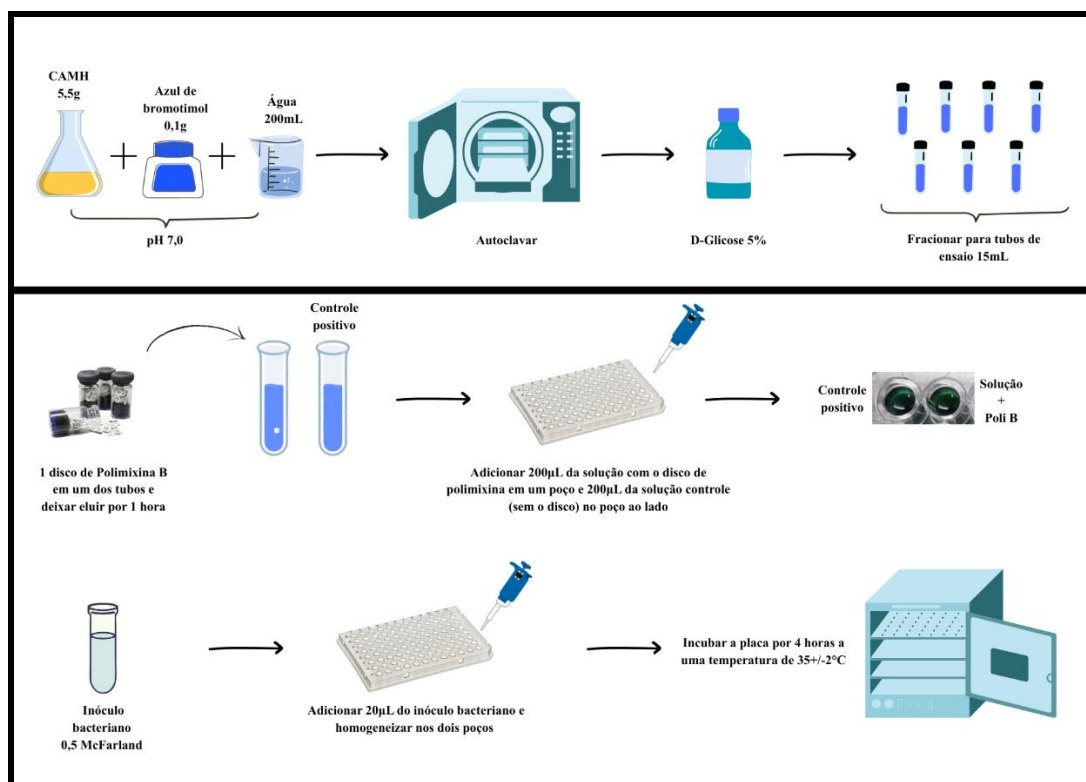


Figura 9. Preparação e fluxo de trabalho do Blue-Poli.

Fonte: elaborado pelo autor.

Inicialmente foi necessário realizar o preparo da solução colorimétrica. Para isso, foram utilizados 5,5 g do pó de CAMH, 0,1 g de azul de bromotimol e 200 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7 e então foi autoclavada. Posteriormente, 30 mL de uma solução de glicose 25% foram adicionados. A solução colorimétrica foi fracionada em tubos de ensaio com 15mL. A solução pronta foi mantida na geladeira em 2 e 8 °C por 3 meses, sem congelar.

No dia da realização do experimento, dois tubos de ensaio com 15mL da solução colorimétrica foram separados. Um tubo foi destinado ao preenchimento dos poços de controle positivo e ao outro tubo foi adicionado 1 disco de polimixina para eluir em um período de 60 minutos. Sabendo que cada disco de polimixina contém 300 UI, ou seja, 30µg, com a adição de um disco em 15 mL, foi possível obter uma concentração de 2µg/mL.

200µL das soluções foram adicionados em dois poços: um poço com a solução pura destinada para controle positivo e um poço com a solução contendo o disco eluído. Por fim, foram adicionados 20µL da suspensão bacteriana (padronizada na escala 0,5 de McFarland) nos dois poços e homogeneizados. Para cada placa foi possível testar 16 bactérias.

As placas foram colocadas na estufa a uma temperatura de 35 ± 2 °C por um período de até 4h. Transcorrido o tempo, foi possível observar a mudança de coloração para amarelo, indicando o crescimento bacteriano. Dessa forma, a mudança de coloração apenas no primeiro poço (controle positivo: solução + inóculo bacteriano) indicava resultado negativo, ou seja, a bactéria foi classificada como sensível à polimixina B. Em caso de mudança de coloração nos dois poços, o resultado foi interpretado como positivo, ou seja, a bactéria foi considerada como resistente à polimixina B.

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de ponte de corte do BrCAST. Para os testes com azul de bromotimol, a mudança de coloração no poço teste de ciano escuro para amarelo foi considerada como crescimento bacteriano, apresentando uma CIM $>2\mu\text{g/mL}$, sendo então resistente à polimixina B. Caso a coloração do poço teste permanecesse como ciano escuro, indicava que não houve crescimento bacteriano e nesse caso a bactéria foi considerada sensível à polimixina B (BrCAST, 2025).

4.8 Red-Poli

A metodologia Red-Poli foi desenvolvida pelo nosso grupo baseando-se no teste rápido NP (Nordmann et al., 2016) e no teste Blue-Poli (Pillonetto *et al.*, 2022). Enquanto o teste rápido NP utilizou o pó de polimixina B, em nosso estudo substituímos o pó do antimicrobiano pelo disco de polimixina B, no entanto, seguimos da suspensão bacteriana do teste rápido NP. No estudo de Pillonetto foi utilizado o disco de colistina e o indicador azul de bromotimol e em nosso estudo, substituímos o azul pelo indicador vermelho de fenol e utilizamos o disco de polimixina B. A metodologia está exemplificada na figura abaixo (Figura 10).

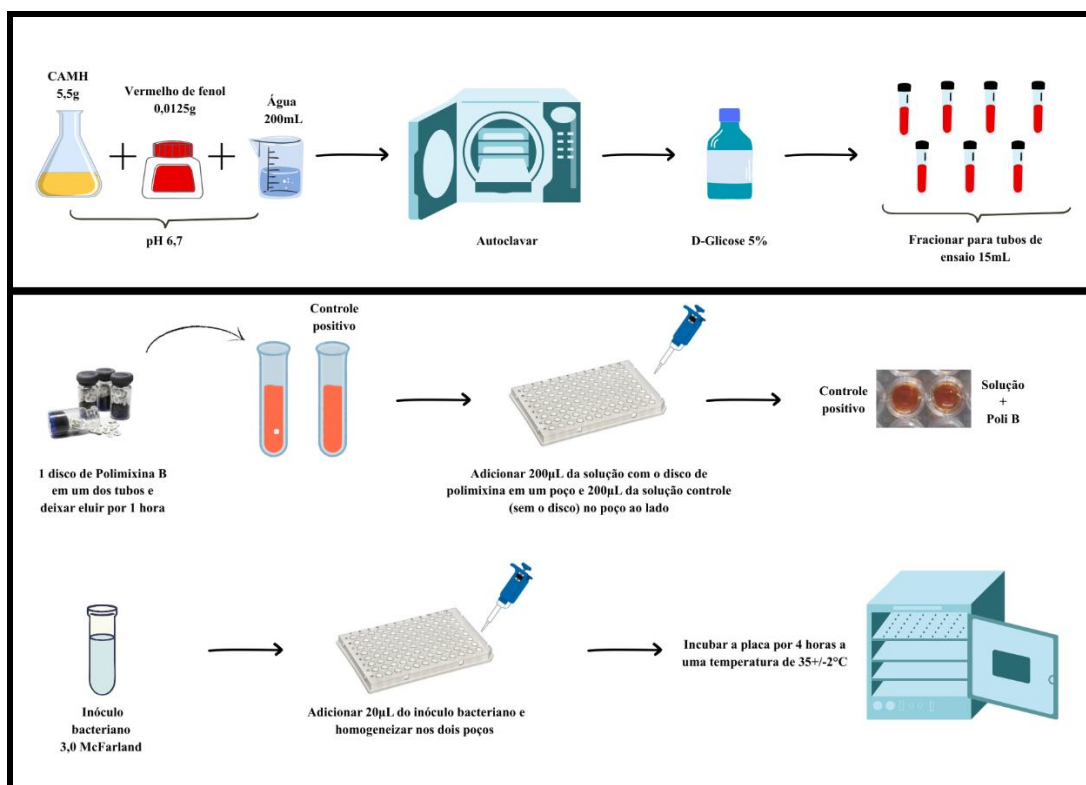


Figura 10. Preparação e fluxo de trabalho do Red-Poli.

Fonte: elaborado pelo autor.

Inicialmente, a solução foi preparada a partir de 5,5g do pó de MHCA, 0,005% de vermelho de fenol (0,0125g) e 200 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,7 e então autoclavado. Posteriormente, foram adicionados 30mL de uma solução de glicose 25%. Essa solução foi fracionada em tubos de ensaio com 15mL e mantivemos na geladeira em 2 e 8 °C por até 3 meses, sem congelar.

No dia da realização do experimento, foram separados dois tubos de ensaio com os 15mL da solução. Um tubo foi destinado ao preenchimento dos poços de controle positivo e o outro tubo foi adicionado 1 disco de polimixina B para eluir em um período de 60 minutos. Sabendo que cada disco de polimixina contém 300 UI, ou seja, 30µg, com a adição de um disco em 15mL foi possível obter uma concentração de 2µg/mL. Após o período de eluição do disco foram adicionados 200µL das soluções em dois poços da placa: um poço com a solução pura destinada para controle positivo e um poço com a solução contendo o disco eluído.

A suspensão bacteriana foi padronizada a uma escala 3 de McFarland (9×10^8 UFC/mL) e foram adicionados 20µL nos dois poços (controle e teste). Para cada placa foi possível testar 16 bactérias.

As placas foram incubadas em temperatura de 35 ± 2 °C por até 4h. A mudança de coloração de vermelho para amarelo indica crescimento bacteriano. Dessa forma, a mudança de coloração apenas no primeiro poço (controle positivo: solução + inóculo bacteriano) indicou resultado negativo, ou seja, a bactéria foi classificada como sensível à polimixina B. Em caso de mudança de coloração nos dois poços, o resultado foi interpretado como positivo, ou seja, a bactéria foi considerada como resistente à polimixina B.

Os resultados também são interpretados de acordo com os critérios de ponte de corte do BrCAST (BrCAST, 2025). Dessa forma, para casos de resistência à polimixina B, é possível observar uma mudança da coloração de vermelho para amarelo, apresentando uma CIM $>2\mu\text{g/mL}$. Em casos de sensibilidade, a coloração permanece a mesma.

4.9 Análise dos resultados

A metodologia de microdiluição em caldo foi utilizada como referência para comparação com os resultados obtidos nas outras metodologias. As novas metodologias foram analisadas quanto à sensibilidade, especificidade, concordância categórica (CA), concordância essencial (EA), Erro Maior (ME) e Erro Muito Maior (VME).

A sensibilidade das metodologias foi calculada conforme a fórmula:

$$S: VP / VP + FN$$

onde VP (verdadeiro positivo) são os isolados classificados como resistentes pela metodologia de referência e pela metodologia nova; e FN (falso negativo) são os isolados classificados como resistentes pela metodologia de referência, porém apresentam resultados sensíveis pela metodologia nova (ISO, 2021).

A especificidade das metodologias foi calculada conforme a fórmula:

$$E: VN / VN + FP$$

onde VN (verdadeiro negativo) são os isolados classificados como sensíveis pela metodologia de referência e pela metodologia nova; e FP (falso positivo) são os isolados classificados como sensíveis pela metodologia de referência, porém apresentam resultados resistentes pela metodologia nova. Sensibilidade e especificidade são consideradas aceitáveis quando apresentarem valor $\geq 90\%$ (ISO, 2021).

CA é a porcentagem de isolados classificados com o mesmo resultado (resistente ou sensível) quando comparada à metodologia nova. Seu resultado é considerado aceitável quando apresentar valor $\geq 90\%$. EA é a porcentagem de isolados com CIM +/- 1 diluição entre a metodologia de referência e a metodologia nova. Seu resultado é considerado aceitável quando apresentar valor $\geq 90\%$ (ISO, 2021).

ME é a porcentagem de isolados com resultados resistentes, de acordo com a metodologia nova, mas que deveriam apresentar resultados sensíveis, de acordo com a metodologia de referência. VME é a porcentagem de isolados resistentes à polimixina B na metodologia de referência e na metodologia nova o isolado foi caracterizado como sensível. ME e VME são considerados aceitáveis quando apresentarem valores $\leq 3\%$ (ISO, 2021).

5. RESULTADOS

Na metodologia de microdiluição com eluição do disco de polimixina B os resultados demonstraram uma boa concordância com o teste de referência (microdiluição em caldo). 45 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 40 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 2 *E. coli*. E 55 isolados demonstraram ser sensíveis à polimixina B: 11 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 40 *E. coli* (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos resultados da metodologia de referência (microdiluição em caldo) com os resultados encontrados na microdiluição com eluição do disco de polimixina B.

		Microdiluição em caldo				
		≤2µg/mL Sensível	4µg/mL Resistente	8µg/mL Resistente	16µg/mL Resistente	>16µg/mL Resistente
Microdiluição com eluição do disco de polimixina B	≤2µg/mL Sensível	50	2*	1*	2*	
	4µg/mL Resistente		3	2	1	2
	8µg/mL Resistente		2	4	1	1
	16µg/mL Resistente			1	4	4
	>16µg/mL Resistente			1	5	14

Azul: Valor de CIM para microdiluição em caldo é exatamente o mesmo para microdiluição com eluição do disco de polimixina B.

*Erro Muito Maior (VME).

A microdiluição com eluição do disco de polimixina B apresentou sensibilidade de 90% e uma especificidade de 100%. A CA foi de 95% e a EA de 92%. Não foram encontrados ME. No entanto, foram encontrados VME de 5%, sendo este valor fora dos resultados considerados como aceitáveis. Foram considerados VME: 1 isolado de *E. coli* que apresentou CIM 2µg/mL pela metodologia nova e 4µg/mL pelo teste de referência; 1 isolado de *E. coli* que apresentou CIM 1µg/mL pela metodologia nova e 4µg/mL pelo teste de referência; 1 isolado de *E. coli* que apresentou CIM 1µg/mL pela metodologia nova e CIM 8µg/mL pela metodologia de referência; 1 isolado de *E. coli* que apresentou CIM 2µg/mL pela metodologia nova e CIM

16µg/mL pela metodologia de referência e 1 isolado de *K. pneumoniae* que apresentou CIM 0,25µg/mL pela metodologia nova e CIM 16µg/mL pela metodologia de referência.

Para a metodologia de *Agar Spot*, 47 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 39 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 5 *E. coli*. 53 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B, sendo eles: 12 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 37 *E. coli*. Os resultados encontrados no *Agar Spot*, bem como a sua comparação com a microdiluição em caldo, estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação dos resultados da metodologia de referência com os resultados encontrados no *Agar Spot*.

		Microdiluição em caldo			
		≤2µg/mL Sensível	4µg/mL Resistente	8µg/mL Resistente	≥16µg/mL Resistente
<i>Agar Spot</i>	≤2µg/mL Sensível	50			3*
	4µg/mL Resistente		2		
	8µg/mL Resistente		3	4	8
	≥16µg/mL Resistente		2	5	23

Azul: Valor de CIM para microdiluição em caldo é exatamente o mesmo para *Agar Spot*.

*Erro Muito Maior (VME).

A metodologia do *Agar Spot* apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 100%. A CA foi de 97% e a EA de 95%. Não foram encontrados ME, no entanto, foram encontrados 3% de VME, sendo este valor considerado admissível, pois está dentro do valor aceitável. Foram considerados VME: 2 isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram CIM ≥16µg/mL pela metodologia de referência, mas apresentaram CIM 2µg/mL pela metodologia nova e um isolado de *E. coli* que apresentou CIM ≥16µg/mL pela metodologia de referência, mas apresentou CIM 2µg/mL pela metodologia nova testada.

Para a metodologia de *Drop Test*, 48 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 40 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 5 *E. coli*. 52 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B, sendo eles: 11 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 37 *E. coli*. Os resultados encontrados

no *Drop Test*, bem como a sua comparação com a microdiluição em caldo, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação dos resultados da metodologia de referência com os resultados encontrados no *Drop Test*.

		Microdiluição em caldo				
		≤2µg/mL	4µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	≥32µg/mL
		Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Drop Test	≤2µg/mL Sensível	50			2*	
	4µg/mL Resistente					
	8µg/mL Resistente		1	2		
	16µg/mL Resistente			1	1	1
	≥32µg/mL Resistente		6	6	10	20

Azul: Valor de CIM para microdiluição em caldo é exatamente o mesmo para *Drop Test*.

*Erro Muito Maior (VME).

A metodologia do *Drop Test* apresentou sensibilidade de 96% e uma especificidade de 100%. A CA foi de 98% e a EA de 86%. Para essa metodologia não foram encontrados ME e foram encontrados 2% de VME, sendo este valor considerado admissível, pois está dentro do valor aceitável. Foram considerados VME: 1 isolado de *E. coli* que apresentou CIM 16µg/mL pela metodologia de referência e 2µg/mL pela metodologia nova e 1 isolado de *K. pneumoniae* que apresentou CIM 16µg/mL pela microdiluição em caldo e apresentou CIM 2µg/mL pela metodologia nova.

Para a metodologia de Microeluição da polimixina B, 48 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 39 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 6 *E. coli*. 52 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B, sendo eles: 12 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 36 *E. coli*. A partir dos resultados encontrados, foi possível obter sensibilidade de 96% e especificidade de 100%. Além disso, apresentou uma CA de 98%, que está dentro do valor aceitável de ≥90%. A EA não foi possível calcular, tendo em vista que foi testada apenas uma concentração. Não foram encontrados ME e foram encontrados 2% de VME, valor considerado aceitável, sendo eles: 2 isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram CIM 32µg/mL e 64µg/mL pela

metodologia de referência, mas que apresentaram CIM de $\leq 2\mu\text{g/mL}$ pela metodologia nova testada.

Para a metodologia de Blue-Poli, 48 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 41 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens* e 6 *E. coli*. 48 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B, sendo eles: 10 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii* e 36 *E. coli*. Nessa metodologia não foram testados os 2 isolados de *P. aeruginosa* (um sensível e outro resistente à polimixina B) e os 2 isolados de *A. baumannii* (um sensível e outro resistente à polimixina B), pois na literatura esse teste é desenvolvido apenas para espécies de Enterobacterales, uma vez que essa metodologia é baseada no metabolismo de glicose. Dessa forma, o teste se aplica apenas a espécies fermentadoras de glicose. Com isso, foi possível obter sensibilidade, especificidade e CA de 100%. Não foi calculada a EA, tendo em vista que foi testada apenas uma concentração nessa metodologia. Não foram encontrados ME e VME.

Por fim, para a metodologia de Red-Poli, 48 isolados foram categorizados como resistentes à polimixina B: 41 *K. pneumoniae*, 1 *S. marcescens* e 6 *E. coli*. 48 isolados foram considerados sensíveis à polimixina B, sendo eles: 10 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *C. freundii* e 36 *E. coli*. Assim como o Blue-Poli, essa metodologia não testou isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, uma vez que essa metodologia também é baseada no metabolismo de glicose. Com isso, foi possível obter sensibilidade, especificidade e CA de 100%. Não foi calculada a EA, tendo em vista que foi testada apenas uma concentração nessa metodologia. Não foram encontrados ME e VME.

Os resultados das metodologias alternativas para pesquisa da resistência à polimixina B estão resumidos na tabela a seguir (Tabela 4):

Tabela 4. Desempenho das metodologias alternativas para pesquisa da resistência à polimixina B.

	Sensibilidade	Especificidade	CA	EA	ME	VME
Microdiluição com eluição do disco de polimixina B	90%	100%	95%	92%	0	5%
<i>Agar Spot</i>	94%	100%	97%	95%	0	3%
<i>Drop Test</i>	96%	100%	98%	86%	0	2%
Microeluição da polimixina B	96%	100%	98%	Não aplicável	0	2%
Blue-Poli	100%	100%	100%	Não aplicável	0	0
Red-Poli	100%	100%	100%	Não aplicável	0	0

CA: Concordância Categórica. Valor aceitável $\geq 90\%$ (ISO, 2021). EA: Concordância Essencial. Valor aceitável $\geq 90\%$ (ISO, 2021). ME: Erro Maior. Valor aceitável $\leq 3\%$ (ISO, 2021). VME: Erro Muito Maior. Valor aceitável $\leq 3\%$ (ISO, 2021).

Rosa: Valor considerado fora do padrão aceitável.

6. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana disseminou-se rapidamente em todo o mundo, ocasionando uma escassez de novos antimicrobianos. Como opção de tratamento, as polimixinas foram então reintroduzidas na prática clínica em 1990, como um dos tratamentos de último recurso no combate a bactérias multirresistentes (El-Sayed *et al.*, 2020; Pillonetto *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022). No entanto, com o aumento do seu uso, houve um rápido aumento da resistência bacteriana às polimixinas. Dessa forma, fez-se necessário o desenvolvimento de metodologias alternativas para a detecção rápida e prática da sensibilidade de isolados às polimixinas, tendo em vista as dificuldades da execução e o alto custo da metodologia de referência (Lee *et al.*, 2022; O'Neill, 2016; Poirel *et al.*, 2017; Serna *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022).

Dessa forma, o desempenho das metodologias *Agar Spot*, *Drop Test*, Microeluição da polimixina B e Blue-Poli foi avaliado, bem como o desenvolvimento da metodologia Red-Poli e microdiluição com eluição do disco de polimixina B.

Apesar da microdiluição em caldo ser a metodologia recomendada pelo CLSI e pelo EUCAST para testes de sensibilidade antimicrobiana às polimixinas, ela apresenta muitas desvantagens, dentre elas ser extremamente suscetível a erros. Além disso, essa metodologia pode ser muito falha para espécies de *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Poirel *et al.*, 2017).

A microdiluição com eluição do disco de polimixina B demonstrou resultados positivos, apesar de serem observados VME ligeiramente acima do aceitável. Apesar do valor levemente aumentado de VME, a modificação na metodologia da microdiluição em caldo realizada neste estudo apresentou ser sensível e específica, além de ter um custo mais baixo, quando comparada à microdiluição em caldo que utiliza o pó de polimixina. Essa metodologia é de extrema utilidade na triagem de isolados resistentes à polimixina B.

Já para a metodologia de *Ágar Spot*, Pasteran e colaboradores avaliaram a resistência cromossomal e plasmidial à colistina em bacilos gram-negativos e obtiveram 100% de CA para *P. aeruginosa*, 94,6% para *Acinetobacter* spp., e 97,9% a 98,5% para Enterobacterales (Pasteran *et al.*, 2020). Raro e colaboradores (2021) realizaram um estudo avaliando Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos utilizando metodologias baseadas na diluição em ágar (MH contendo 0,25 à 4µg/mL de polimixina B) e ágar de triagem (MH com 3µg/mL de polimixina B). O estudo obteve sensibilidade de 86,2% e especificidade de 98,7% para o teste de triagem e 86,2% e 97,5% para a diluição em ágar. ME foi de 0,73% para triagem e

1,5% para diluição em ágar. VME foi de 5,8% para ambas as metodologias, sendo este um valor fora do padrão considerado aceitável. Dessa forma, os autores concluíram que o desempenho do estudo de um modo geral foi bom e seria uma boa alternativa para a microdiluição em caldo, apesar da presença de uma alta taxa de VME (Raro *et al.*, 2021). Nossos resultados foram bem mais promissores e todos os valores obtidos foram aceitáveis, corroborando a ideia de que *Ágar Spot* é uma excelente metodologia para ser implementada nos laboratórios clínicos.

O estudo de Pasteran e colaboradores (2020) também avaliou o desempenho da metodologia do *Drop Test*, onde foram avaliados 271 isolados clínicos e foi observado 100% de CA para *Acinetobacter* spp., 97,9% para Enterobacterales e 97,4% para *P. aeruginosa* (Pasteran *et al.*, 2020). Outro estudo que analisou o *Drop Test* foi o de Llorente e colaboradores (2022), o qual obteve CA de 100% para Enterobacterales e 99,2% para *P. aeruginosa*. Não foram encontrados ME para as espécies de Enterobacterales e *P. aeruginosa* e apenas 1 VME foi encontrado para *P. aeruginosa* (Llorente *et al.*, 2022).

Perez e colaboradores (2021) também avaliaram o desempenho do *Drop Test* para detecção de resistência à polimixina B em 87 isolados de bacilos gram-negativos não-fermentadores e 628 isolados de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Os resultados do estudo revelaram uma CA de 95,5% para Enterobacterales, mais especificamente para *K. pneumoniae* e nenhum VME foi encontrado. Diante disso, *Drop Test* foi considerado um teste fácil e viável, além de apresentar baixo custo (Perez *et al.*, 2021).

Em nosso estudo os resultados do *Drop test* foram bem similares aos dos estudos citados, comprovando o desempenho da metodologia. Embora os valores de VME estivessem dentro dos valores aceitáveis, a metodologia apresentou uma EA de 86%, fora dos valores aceitáveis. Apesar disso, ela continua sendo uma metodologia alternativa sensível e com uma excelente especificidade. Além disso, é uma metodologia de fácil manuseio, apresenta resultados de fácil visualização e custo muito menor, se comparado à microdiluição em caldo. Dessa forma, é uma metodologia que pode ser levada em consideração, uma vez que pode ser implementada como uma metodologia auxiliar à considerada como padrão de referência.

No que tange à metodologia de Microeluição das polimixinas, Simner e colaboradores avaliaram o desempenho dessa metodologia através da eluição do disco de colistina em 121 isolados retrospectivos e 45 isolados prospectivos de bacilos gram-negativos, além de 6 isolados de *E. coli* positivos para *mcr-1*. O estudo identificou uma CA de 98% e uma EA de 99%, no entanto, a taxa geral de VME foi de 8% devido a 3 isolados de *E. coli* produtores de *mcr-1* (Simner *et al.*, 2019).

O estudo realizado por Humphries e colaboradores também avaliou o desempenho da metodologia desenvolvida por Simmer com algumas modificações. Em seu estudo foram analisados 270 isolados de Enterobacterales, 122 isolados de *P. aeruginosa* e 106 isolados de *Acinetobacter* spp., em que os autores encontraram EA de 94,4% e CA de 97,9% e foram identificados 3,2% de VME e 0,9% de ME. Quando avaliados individualmente, observou-se 98,6% de CA para Enterobacterales (2,5% VME, 0% ME), 99,3% de CA para *P. aeruginosa* (0% VME, 0,7% ME) e 93,1% de CA para *Acinetobacter* spp. (5,6% VME, 3,3% ME) (Humphries *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos em nosso estudo em relação à metodologia de Microeluição da polimixina B foram considerados melhores que os estudos citados anteriormente, devido ao valor de CA de 98% e apenas 2% de VME, sendo uma porcentagem de erro muito menor em comparação ao estudo de Simner e colaboradores. Além disso, em nosso estudo não foram relatadas dificuldades ou diluições inferiores à metodologia de referência com relação a isolados de *E. coli* portadores do gene *mcr-1*. Sendo assim, essa metodologia se mostrou eficaz, precisa e com uma pequena faixa de erro.

Quando analisamos a metodologia Blue-Poli, apenas o estudo idealizador da metodologia foi encontrado até o presente momento. Pillonetto e colaboradores analisaram 115 isolados bacterianos, dos quais 55 isolados eram considerados sensíveis à colistina e 60 eram resistentes. O estudo obteve resultados com 100% de CA e nenhum ME ou VME foi encontrado. Sendo assim, o estudo idealizador concluiu que a metodologia, que combina a metodologia de eluição do disco com a metodologia colorimétrica, é de rápida preparação, fácil manuseio, baixo custo e tempo rápido para leitura e apresenta 100% de especificidade, sensibilidade e precisão para amostras de isolados de Enterobacterales (Pillonetto *et al.*, 2022).

Em nosso estudo, testamos 96 isolados e obtivemos valores de 100% para sensibilidade e especificidade. Além disso, foi possível chegar a um valor de CA de 100% e não foram encontrados ME e VME. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, é possível concluir que essa metodologia é eficaz e precisa na pesquisa de resistência à polimixina B em Enterobacterales, além de ser uma metodologia de baixo custo e fácil de executar.

A metodologia do Red-Poli foi proposta em nosso estudo, baseada na metodologia do Blue-Poli (Pillonetto *et al.*, 2022) e no teste rápido NP (Nordmann *et al.*, 2016). Testamos 48 isolados considerados como sensíveis e 48 considerados como resistentes à polimixina B e os resultados do nosso estudo apresentaram sensibilidade, especificidade e CA de 100%. Não foram encontrados valores de ME e VME. Dessa forma, a nova metodologia denominada Red-Poli se mostrou muito eficaz e sensível, além de ser prática e de fácil manuseio.

Devido aos resultados positivos encontrados, pode-se afirmar que houve uma boa eluição da polimixina B a partir do disco, tornando assim essas metodologias com um menor custo, pois não há a necessidade da aquisição do pó de polimixina B. Dessa forma, a utilização dessas metodologias apresenta um excelente custo-benefício. Além de ser mais fácil sua manipulação dentro dos laboratórios clínicos, uma vez que as metodologias se baseiam na introdução do disco ao meio de cultura para sua total eluição, não sendo necessário realizar a pesagem do pó, bem como todo o seu processo de preparação da solução, que além de tornar a microdiluição em caldo uma metodologia cara, também necessidade de um longo preparo, sendo muitas vezes um problema para a rotina laboratorial (Pasteran *et al.*, 2020; Raro *et al.*, 2021).

Futuros estudos com maior número de isolados e espécies, principalmente bacilos gram-negativos não-fermentadores como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, se fazem necessários. Além disso, são necessários mais estudos para o aprimoramento das técnicas Blue-Poli e Red-Poli, para que essas metodologias possam abranger mais espécies bacterianas e assim ser possível realizar uma análise mais ampla e precisa.

7. CONCLUSÃO

Diante de um cenário crítico onde se observa um aumento da resistência antimicrobiana e a falta de antimicrobianos eficazes, a reintrodução das polimixinas no mercado foi necessária. No entanto, com o aumento do uso das polimixinas no tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, fica evidenciada a importância da pesquisa e utilização de metodologias rápidas, eficazes, precisas e de alta sensibilidade e especificidade na prática clínica para detecção dos isolados bacterianos resistentes à polimixina B.

Diante dos resultados obtidos nesse estudo e da análise comparativa com a metodologia de referência, é possível afirmar que as metodologias de Microdiluição em caldo com modificações, *Agar Spot*, *Drop Test*, Microeluição da polimixina B, Blue-Poli e Red-Poli apresentaram resultados satisfatórios, em especial o Blue-Poli e Red-Poli, que apresentaram altas taxas de sensibilidade, especificidade e CA.

Altas taxas de sensibilidade, especificidade, CA e EA foram encontradas no estudo, bem como baixos valores para VME e ME. Embora a Microdiluição em caldo com a eluição do disco de polimixina B tenha demonstrado alguns erros, apresentando um VME de 5%, as demais metodologias apresentaram uma taxa de erro muito pequena, dentro do padrão considerado aceitável.

Sendo assim, conclui-se que as metodologias utilizadas neste estudo são fortes candidatas à inclusão na rotina dos laboratórios de microbiologia para a detecção de isolados bacterianos resistentes à polimixina B, contribuindo para uma terapia mais adequada e obtendo melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- ABNIKI, Reza et al. Global resistance of imipenem/relebactam against gram-negative bacilli: systematic review and meta-analysis. **Current Therapeutic Research**, v. 100, p. 100723, 2024.
- AYSERT-YILDIZ, Pınar et al. Polymyxin B vs. colistin: the comparison of neurotoxic and nephrotoxic effects of the two polymyxins. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 862, 2024.
- BARAN, Aleksandra; KWIATKOWSKA, Aleksandra; POTOCKI, Leszek. Antibiotics and bacterial resistance—A short story of an endless arms race. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, p. 5777, 2023.
- BOUVIER, Maxime et al. RapidResa polymyxin acinetobacter NP® test for rapid detection of polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 558, 2021.
- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), 2025. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>.
- CHANDANKHEDE, Priyanka M. et al. Comparison of Broth Disk Elution and Broth Microdilution Methods for Colistin Susceptibility Testing in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Cureus**, v. 17, n. 9, 2025.
- CRUZ-LOPEZ, Flora et al. Efficacy and in vitro activity of novel antibiotics for infections with carbapenem-resistant gram-negative pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 884365, 2022.
- SUMEET, Chhabra; TAKSANDE, Avinash B.; PRATIKSHA, Munjewar. The Penicillin Pioneer: Alexander Fleming's Journey to a Medical Breakthrough. **Cureus**, v. 16, n. 7, 2024.
- DUDA-MADEJ, Anna; VISCARDI, Szymon; TOPOLA, Ewa. Meropenem/vaborbactam: β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination, the future in eradicating multidrug resistance. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1612, 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.
- FÓLDES, Annamária et al. Comparison of six phenotypic assays with reference methods for assessing colistin resistance in clinical isolates of carbapenemase-producing Enterobacterales: Challenges and opportunities. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 377, 2022.
- GAUBA, Anusha; RAHMAN, Khondaker Miraz. Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1590, 2023.
- GUPTA, Nitin et al. Ceftazidime-avibactam and aztreonam combination for Carbapenem-resistant Enterobacterales bloodstream infections with presumed Metallo- β -lactamase production: a systematic review and meta-analysis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 22, n. 4, p. 203-209, 2024.

HUEMER, Markus et al. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51034, 2020.

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.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices against reference broth micro-dilution. International Standard ISO 20776-2:2021, Geneva: ISO, 2021.

JEAN, Shio-Shin; HARNOD, Dorji; HSUEH, Po-Ren. Global threat of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 823684, 2022.

JOUY, Eric et al. Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of microbiological methods**, v. 132, p. 125-127, 2017.

KAR, Punyatoya et al. Detection of colistin resistance in carbapenem resistant Enterobacteriaceae by reference broth microdilution and comparative evaluation of three other methods. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 13, n. 03, p. 263-269, 2021.

LANCET, The. Antimicrobial resistance: time to repurpose the Global Fund. **Lancet (London, England)**, v. 399, n. 10322, p. 335, 2022.

LARROUY-MAUMUS, Gerald et al. Two-site study on performances of a commercially available MALDI-TOF MS-based assay for the detection of colistin resistance in *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 6, p. 669-679, 2023.

LEE, Yu-Lin et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 2, p. 106528, 2022.

LI, Xueyong et al. Population pharmacokinetics of polymyxin B in patients with liver dysfunction. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 89, n. 12, p. 3561-3572, 2023.

LING, Zhuoren et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087-3095, 2020.

LIU, Yi-Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LLORENTE, Laura et al. Evaluating the drop test method in measuring colistin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 001628, 2022.

MOFFATT, Jennifer H.; HARPER, Marina; BOYCE, John D. Mechanisms of polymyxin resistance. **Polymyxin antibiotics: From laboratory bench to bedside**, p. 55-71, 2019.

MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NANG, Sue C.; LI, Jian; VELKOV, Tony. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. **Critical reviews in microbiology**, v. 45, n. 2, p. 131-161, 2019.

NORDMANN, Patrice; JAYOL, Aurélie; POIREL, Laurent. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, 2016.

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

PASTERAN, Fernando et al. Simple phenotypic tests to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 10.1128/jcm. 01701-20, 2020.

PEREZ, Leandro Reus Rodrigues et al. Evaluation of a polymyxin drop test for polymyxin resistance detection among non-fermentative gram-negative rods and enterobacterales resistant to carbapenems. **Apmis**, v. 129, n. 3, p. 138-142, 2021.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, 2013.

PILLONETTO, Marcelo et al. Blue-Poli (BP): an accessible and rapid method for detecting colistin resistance in Enterobacterales. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 2195-2197, 2022.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

PULINGAM, Thiruchelvi et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.

RARO, O. H. F. et al. Performance of polymyxin B agar-based tests among carbapenem-resistant Enterobacterales. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 767-773, 2021.

RUBENS, Rebeca Siqueira et al. Challenges in the Detection of Polymyxin Resistance: From Today to the Future. **Microorganisms**, v. 12, n. 1, p. 101, 2024.

SERNA, Carlos; GONZALEZ-ZORN, Bruno. Antimicrobial resistance and one health. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 35, n. Suppl 3, p. 37, 2022.

SHINOHARA, Danielle Rosani et al. Evaluation of phenotypic methods for detection of polymyxin B-resistant bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 199, p. 106531, 2022.

SILVA, Kesia Esther da et al. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. e0349-2021, 2022.

SIMNER, Patricia J. et al. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 10.1128/jcm. 01163-18, 2019.

SOMAN, Rajeev et al. Is it time to move away from polymyxins?: evidence and alternatives. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 3, p. 461-475, 2021.

TRAN, Thien B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 592-597, 2016.

WANG, Chengcheng et al. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 508-516, 2020.

WISE, Mark G. et al. Global trends in carbapenem-and difficult-to-treat-resistance among World Health Organization priority bacterial pathogens: ATLAS surveillance program 2018–2022. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 37, p. 168-175, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. World Health Organization, 2024.

XIAO, Gang; LI, Jiyun; SUN, Zhiliang. The combination of antibiotic and non-antibiotic compounds improves antibiotic efficacy against multidrug-resistant bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 20, p. 15493, 2023.

XU, Xiaohong et al. Risk factors and molecular mechanism of polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary hospital in Fujian, China. **Infection and Drug Resistance**, p. 7485-7494, 2022.



XUAN, Jiaqi et al. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, v. 68, p. 100954, 2023.

Anexo 1 - Artigos publicados durante o mestrado.



Review

Challenges in the Detection of Polymyxin Resistance: From Today to the Future

Rebeca Siqueira Rubens ¹, Isabel de Souza Andrade Arruda ¹, Rosane Mansan Almeida ¹, Yanna Karla de Medeiros Nóbrega ¹,, Maiara dos Santos Carneiro ² and Tanise Vendruscolo Dalmolin ^{1,*}

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília 70910-900, DF, Brazil; rebecarubens9@gmail.com (R.S.R.); isabelarruda21@gmail.com (I.d.S.A.A.); rmansan@gmail.com (R.M.A.); yannanobrega@gmail.com (Y.K.d.M.N.)

² Centro de Medicina Laboratorial, Farroupilha 95170-476, RS, Brazil; maiaracarneiro7@gmail.com

* Correspondence: tanise.dalmolin@unb.br

Abstract: Antimicrobial resistance is known to be one of the greatest global threats to human health, and is one of the main causes of death worldwide. In this scenario, polymyxins are last-resort antibiotics to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria. Currently, the reference test to evaluate the susceptibility of isolates to polymyxins is the broth microdilution method; however, this technique has numerous complications and challenges for use in laboratory routines. Several phenotypic methods have been reported as being promising for implementation in routine diagnostics, including the BMD commercial test, rapid polymyxin NP test, polymyxin elution test, culture medium with polymyxins, and the Polymyxin Drop Test, which require materials for use in routines and must be easy to perform. Furthermore, Sensititre[®], molecular tests, MALDI-TOF MS, and Raman spectroscopy present reliable results, but the equipment is not found in most microbiology laboratories. In this context, this review discusses the main laboratory methodologies that allow the detection of resistance to polymyxins, elucidating the challenges and perspectives.

Keywords: antimicrobial susceptibility; polymyxins; Gram-negative bacteria; polymyxin resistance



Citation: Rubens, R.S.; Arruda, I.d.S.A.; Almeida, R.M.; Nóbrega, Y.K.d.M.; Carneiro, M.d.S.; Dalmolin, T.V. Challenges in the Detection of Polymyxin Resistance: From Today to the Future. *Microorganisms* **2024**, *12*, 101. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010101>

Academic Editor: Sofia Costa de Oliveira

Received: 30 October 2023

Revised: 12 December 2023

Accepted: 20 December 2023

Published: 4 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The antimicrobial resistance has emerged as a major threat to human health in the 21st century, and is one of the leading causes of death worldwide [1,2]. Along with the increase in antibiotic resistance, polymyxins (colistin and polymyxin B) have been reintroduced for clinical use as valuable therapeutic options, through new formulations and dosage regimens that have considerably reduced the toxicity previously attributed to this class of antimicrobials [3,4].

In recent years, new antimicrobials have been approved for clinical use against multidrug-resistant Gram-negative bacteria, but most do not have activity against all resistance mechanisms and are not available in many parts of the world. Therefore, polymyxins are considered one of the last therapeutic alternatives and are often used as first-line therapy for treating infections caused by multidrug-resistant microorganisms, particularly the Gram-negative bacilli resistant to carbapenems [5].

It was believed that the mechanisms of resistance to polymyxins were mediated by chromosomal mutations, which led to the modification of lipid A (a component of bacterial lipopolysaccharide) through cationic substitutions, to reduce the polymyxin outer membrane interaction [6]. However, in 2015, Liu and collaborators described for the first time the polymyxin resistance mediated by a gene called mobile colistin resistance (*mcr-1*) with plasmid localization. This discovery changed the scenario of polymyxin resistance, due to the possibility of horizontal transfer and the high dissemination of this gene, becoming a



Review

Changes in the Gut Microbiota of Patients After SARS-CoV-2 Infection: What Do We Know?

Isabel de Souza Andrade Arruda, Caio da Silva Cavalcante, Rebeca Siqueira Rubens, Larissa Nava Pinto de Faria Castro, Yanna Karla de Medeiros Nóbrega and Tanise Vendruscolo Dalmolin *

Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília 70910-900, Brazil; isabelarruda21@gmail.com (I.d.S.A.A.); caioscfarma@gmail.com (C.d.S.C.); rebecarubens9@gmail.com (R.S.R.); larissa.navajob@gmail.com (L.N.P.d.F.C.); yannanobrega@gmail.com (Y.K.d.M.N.)

* Correspondence: tanise.dalmolin@unb.br

Abstract

COVID-19 can cause long-term symptoms, such as a post-infection syndrome, known as Long-COVID. Among the symptoms present during this period, the most reported are gastrointestinal symptoms. This study discusses the effects of changes in the gut microbiota of post-COVID-19 patients. SARS-CoV-2 infection is associated with significant alterations in gut microbial composition, disturbing its homeostasis and promoting a reduction in the abundance of beneficial symbiotic bacteria and an increase in the abundance of opportunistic pathogens. Furthermore, the composition of the gut microbiota may play a role in the prognosis of patients with post-COVID-19 infection. The microbiota of the intestinal tract and the respiratory tract influence each other; therefore, the gut–lung axis has attracted increasing interest in understanding COVID-19. Moreover, the brain–gut axis has been studied, since there have been reports of anxiety and depression along with post-COVID-19 gastrointestinal symptoms. Treatments options for intestinal dysbiosis in Long-COVID patients include probiotics, prebiotics, and fecal microbiota transplantation. These treatments may serve as an approach to improve gastrointestinal symptoms during Long-COVID, increasing microbiome diversity, strengthening the integrity of intestinal barrier functions, and consequently influencing the treatment of COVID-19.

Keywords: dysbiosis; long-COVID-19; gut microbiota; post-acute COVID-19 syndrome; SARS-CoV-2; gut–lung axis; brain–gut axis



Academic Editors: Sotirios Tsiodras and Roberto Di Marco

Received: 26 August 2025

Revised: 14 October 2025

Accepted: 3 November 2025

Published: 4 November 2025

Citation: Arruda, I.d.S.A.; Cavalcante, C.d.S.; Rubens, R.S.; Castro, L.N.P.d.F.; Nóbrega, Y.K.d.M.; Dalmolin, T.V. Changes in the Gut Microbiota of Patients After SARS-CoV-2 Infection: What Do We Know? *Microorganisms* **2025**, *13*, 2529. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13112529>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

On 30 January 2020, the World Health Organization (WHO) declared that the pandemic of the new coronavirus SARS-CoV-2, which causes the disease COVID-19, was considered a public health emergency of international importance [1]. Currently, COVID-19 has a prevalence of more than 775 million confirmed cases, resulting in more than 7 million deaths worldwide [2].

SARS-CoV-2 is a single-stranded RNA virus with a high rate of evolution and is highly contagious. Several variants have already been identified, each with a higher infectivity rate. Therefore, a series of vaccines has been developed to contain the virus [3].

The main symptoms of COVID-19 are fever, headache, dry cough, sore throat, shortness of breath, fatigue, and the loss of smell and taste [3–5]. Among the symptoms of COVID-19 are also gastrointestinal problems, the most reported being diarrhea, vomiting, the loss of appetite, abdominal pain, constipation, nausea, and dysphagia [3,5–9].

Anexo 2. Resumos aceitos em congresso.

RUBENS, R. S.; ARRUDA, I.; DALMOLIN, T. V. Resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos hospitalizados. In: SIMPÓSIO INPRA 2024, 2024. Anais Simpósio INPRA 2024, 2024.

ARRUDA, I.; RUBENS, R. S.; DALMOLIN, T. V. ÁGAR SPOT E DROP TEST: ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM ENTEROBACTERIALES. In: SIMPÓSIO INPRA 2024, 2024. Anais Simpósio INPRA 2024.

SOUSA EEDA; RUBENS RS; SILVA MSD; ARRUDA IDSA; CASTRO LNPDF; BATISTA PDOMD; NÓBREGA YKDM; DALMOLIN TV. SINERGISMO ENTRE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO: ALTERNATIVA TERAPÊUTICA FRENTE À RESISTÊNCIA BACTERIANA. Pôster - Microbiologia Clínica. 33° Congresso Brasileiro de Microbiologia 2025.

YANNA KARLA DE MEDEIROS NÓBREGA; THÁSSIA ALMEIDA DE OLIVEIRA; REBECA SIQUEIRA RUBENS; ISABEL DE SOUZA ANDRADE ARRUDA; LÍVIA CUSTÓDIO PEREIRA; LARISSA NAVA PINTO DE FARIA CASTRO; TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN. Resistência antimicrobiana de *Mycoplasma genitalium* no contexto da pandemia de COVID-19. 57° Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do Distrito Federal 2025.