

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ferramentas alternativas para identificação microbiana, determinação de suscetibilidade e detecção de mecanismos de resistência

MAIARA DOS SANTOS CARNEIRO

PORTO ALEGRE, 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ferramentas alternativas para identificação microbiana, determinação de suscetibilidade e detecção de mecanismos de resistência

Tese apresentada por Maiara dos Santos
Carneiro para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

PORTO ALEGRE, 2022.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de março de 2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Fuentefria

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Ana Lucia da Costa Darini

Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Marcelo Pilonetto

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PARANÁ)

CIP - Catalogação na Publicação

Carneiro, Maiara dos Santos
Ferramentas alternativas para identificação
microbiana, determinação de suscetibilidade e detecção
de mecanismos de resistência / Maiara dos Santos
Carneiro. -- 2022.
173 f.
Orientador: Afonso Luis Barth.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Papel filtro . 2. MALDI-TOF MS. 3. qPCR HRM. 4.
RT-qPCR. 5. Polimixina B. I. Barth, Afonso Luis,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#2020-0737) e do Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana (INPRA) - Brazil (INCT/CNPq: 465718/2014-0 e INCT/FAPERGS: 17/2551-0000514-7). A autora recebeu 10 meses de bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 88887.623908/2021-00).

AGRADECIMENTOS

No fechamento deste importante ciclo de minha vida, existem diversas pessoas com quem eu gostaria de dividir esta conquista e que merecem minha sincera gratidão.

Aos meus pais, Valdir e Suzana, por todo o amor e carinho a mim dedicados; por toda a confiança, motivação e incentivo na busca da concretização dos meus sonhos. Pai e mãe, não tenho palavras que expressem o tamanho da minha gratidão e admiração por tudo que fizeram para que essa conquista se tornasse realidade. O apoio incondicional que recebi de vocês, em todos os momentos da minha vida, foram decisivos para que eu chegasse até aqui.

Ao meu filho, Miguel, por ter me escolhido para a nobre missão de conduzir seus primeiros passos, por ter me transformado em um ser infinitamente melhor, mais forte e resiliente; por me ensinar tanto e diariamente, mesmo com apenas 2 anos e 6 meses, o valor das pequenas conquistas. Eu te desejo um mundo que te respeite, do jeito que você é.

Ao Dalas, por ter dividido boa parte desta caminhada comigo, por sempre ter conselhos práticos e por passar tranquilidade em momentos de dúvidas. Obrigada pelo incentivo, paciência e apoio emocional.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS, com quem compartilhei desde angústias microbiológicas até momentos de descontração. Eu tive muita sorte por ter a oportunidade de conviver, compartilhar conhecimento e experiências com pessoas diferenciadas como vocês. Nesses 7 anos de convívio neste laboratório, conheci muitas pessoas e alguns colegas de profissão se tornaram também grandes amigos, Tanise Dalmolin, Fabiana Volpato, Priscila Wink e Otávio Lovison obrigada por todo o apoio e ajuda nesta caminhada.

Às minhas amigas Camila Wilhelm e Lisiane Rech, as quais me apoiaram e se fizeram presentes durante todo esse percurso, tornando a vida muito mais leve. Obrigada por serem pessoas tão maravilhosas e acolhedoras.

À prof. Luciana Nunes, por ter me concedido a primeira oportunidade e por ter me apresentado ao “mundo da pesquisa”. Obrigada por ter me ensinado tanto, por ter acreditado no meu potencial e me conduzido desde a iniciação científica até o mestrado.

Ao PPGCF/UFRGS pela oportunidade de estudo e realização deste projeto.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e todos os funcionários do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) por toda estrutura, equipamentos, material e local para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, Afonso Luís Barth, pela oportunidade de ter sido sua orientanda. Agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho uma pessoa tão fantástica, que é exemplo de profissionalismo, competência, sabedoria e caráter. Fui muito privilegiada por ter a minha formação de mestrado e doutorado conduzidas por alguém com tantas qualidades. A gratidão, o orgulho e o carinho por ter dividido tantos momentos com o senhor são imensos. Obrigada por toda a orientação, confiança, dedicação, empenho, paciência e compreensão em todos esses anos.

RESUMO

O papel do laboratório de microbiologia clínica é realizar a identificação do microrganismo, determinar o perfil de suscetibilidade e, quando pertinente, os mecanismos de resistência, o mais breve possível. A microbiologia difere significativamente das demais áreas das análises clínicas, pois os processos são dependentes de crescimento microbiano, resultando em tempo maior para liberação de resultados. Tendo em vista que a replicação microbiana naturalmente demanda tempo, ferramentas para agilização de processos de caracterização microbiana devem ser priorizadas. O teste de referência para detecção de resistência à polimixina B, por exemplo, requer tempo de incubação prolongado (aproximadamente 24h). Tendo em vista a demora para obtenção do perfil de suscetibilidade através de métodos fenotípicos convencionais, se torna ainda mais importante a pesquisa por abordagens que forneçam resultados confiáveis em tempos de incubação menores. Por outro lado, as metodologias que utilizam as técnicas baseadas em espectrometria de massas (técnica de MALDI-TOF) e em amplificação de material genético (técnica de qPCR HRM) são consideradas referência para a identificação microbiana e de enzimas que degradam antibióticos carbapenêmicos (carbapenemases), respectivamente. Considerando a atual situação sanitária decorrente do crescente aumento no número de casos de COVID-19, mesmo mais de dois anos após o início da pandemia, ainda existe a necessidade de ampliar a testagem através de metodologias que forneçam resultados confiáveis. A principal metodologia para detecção de SARS-CoV-2 é o RT-qPCR. As técnicas acima mencionadas, requerem, no entanto, equipamentos que apresentam elevado investimento inicial, o que os torna restritos a laboratórios de grande porte, com grande demanda de exames. Então um desafio importante é tornar possível que as vantagens dessas tecnologias possam ser utilizadas por laboratórios de pequeno porte. O uso de papel filtro para o transporte de amostras microbianas/biológicas pode facilitar significativamente o envio de microrganismos entre laboratórios. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o papel filtro como meio de transporte de microrganismos/espécimes respiratórios inativados para identificação por MALDI-TOF MS, detecção de carbapenemases por qPCR HRM e SARS-Cov-2 por RT-qPCR. Assim como, propor e avaliar métodos rápidos para determinação de suscetibilidade à polimixina B. Para avaliar a capacidade do papel filtro como meio de transporte de microrganismos inativados para identificação por MALDI-TOF MS, foram avaliados 363 isolados da Ordem *Enterobacterales*, Bacilos Gram-negativos não-fermentadores, *Haemophilus influenzae*, micobactérias não tuberculosas e leveduras. Para detecção de carbapenemases por qPCR HRM foram avaliados 88 isolados da Ordem *Enterobacterales*. Para a detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR foram

avaliados 40 espécimes respiratórios de oro/nasofaringe transportados em papel de filtro. Os isolados/espécimes respiratórios foram inativados, impregnados em discos de papel filtro estéril, as proteínas (para identificação em MALDI-TOF MS) e o material genético (para as técnicas de qPCR HRM e RT-qPCR) foram extraídos. Os resultados após a impregnação em papel filtro foram comparados com os resultados diretamente da colônia/espécime respiratório. Para avaliação da leitura antecipada da microdiluição em caldo para polimixina B comparamos a concentração inibitória mínima (CIM) de 192 isolados de Bacilos Gram-negativos (*Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*) obtida em 8-9h de incubação (leitura antecipada) e em 16-20h de incubação (leitura padronizada) da microdiuição em caldo para polimixina B. Além disso, desenvolvemos um novo teste qualitativo de suscetibilidade à polimixina B através do MALDI-TOF MS (MALDI POLYMYXIN TEST – MPT). Para essa proposta, comparamos os resultados de microdiluição em caldo de polimixina B de 95 isolados de *Enterobacterales* frente ao MPT. Considerando a correta identificação dos isolados com scores >1.7 em MALDI-TOF MS, 354/363 isolados apresentaram a mesma identificação diretamente da colônia e após o processo de impregnação em papel filtro. O método de transporte de microrganismo inativado apresentou alta sensibilidade (97,6%) e especificidade (100%) quando comparados a identificação realizada diretamente da colônia. O papel filtro também foi avaliado quanto a capacidade de transportar isolados bacterianos inativados para detecção de carbapenemases por qPCR HRM e 87/88 isolados apresentaram o mesmo resultado (presença ou ausência de carbapenemases). Apenas um isolado caracterizado previamente como *bla_{NDM}* não apresentou o resultado esperado após a impregnação em papel filtro. Esse teste apresentou sensibilidade de 98,86% e especificidade de 100%. O papel filtro foi utilizado para o transporte de espécime respiratório para pesquisa de SARS-Cov-2 e apresentou resultados excelentes de concordância (97,2%) com o resultado obtido da extração direta do espécime respiratório. A leitura antecipada da técnica de microdiluição em caldo para polimixina B e o MPT apresentaram 97,9% e 95,8% de concordância categórica com o método de referência, respectivamente. O papel filtro pode ser utilizado como meio de transporte alternativo para os microrganismos e metodologias supracitadas. Tanto a leitura antecipada da microdiluição em caldo para polimixina B quanto o MPT apresentaram alta concordância com a microdiluição em caldo; portanto, essas metodologias poderiam ser empregadas na rotina do laboratório de microbiologia e possibilitariam a liberação do resultado de suscetibilidade à polimixina B no mesmo dia em que a bactéria é identificada.

Palavras-chave: Papel filtro, MALDI-TOF MS, qPCR HRM, RT-qPCR, Polimixina B

ABSTRACT

The role of the microbiology laboratory is to perform microorganism identification, to determine susceptibility profile and, when relevant, resistance mechanisms, as soon as possible. Microbiology differs from other areas of clinical analysis, as the processes are dependent of microbial growth, resulting in longer times to release results. Since microbial replication naturally takes time, approaches to optimize microbial characterization procedures must be prioritized. The reference method to detect polymyxin B resistance requires prolonged incubation time (approximately 24h). Due to delays in the susceptibility tests results using conventional phenotypic methods, research on approaches that could provide reliable results in shorter incubation times are important. Methodologies based on mass spectrometry (MALDI-TOF) and amplification of genetic material (qPCR HRM) are reference for the microbial identification and detection of carbapenemases, respectively. Considering the current health scenery due to the increase of COVID-19 cases, there is still a need to expand testing using reliable methodologies. The RT-qPCR is the main methodology to SARS-CoV-2 detection. All mentioned techniques require equipment with high investment, being only accessible to laboratories with high demand of exams. An important challenge is to enable the advantages of these technologies to be used by small laboratories. The use of filter paper to transport microbial/biological samples can be an advantage to send microorganisms between laboratories. This study aimed to evaluate filter paper as a means of transporting inactivated microorganisms/respiratory specimens to be identified by MALDI-TOF MS and for carbapenemases and SARS-CoV-2 detection by qPCR HRM and RT-qPCR, respectively. Moreover, to propose and evaluate rapid methods to determine polymyxin B susceptibility. For evaluate filter paper as a means of transporting inactivated microorganisms to identification in MALDI-TOF MS, 363 isolates of *Enterobacterales*, Gram-negative non-fermentative, *Haemophilus influenzae*, nontuberculous mycobacteria and yeasts were evaluated. For the filter paper evaluation for carbapenemases detection by qPCR HRM, 88 isolates of *Enterobacterales* were evaluated. For the filter paper evaluation for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR, 40 oro/nasopharyngeal respiratory specimens transported in filter paper were evaluated. Isolates/respiratory specimens were inactivated, impregnated in sterile filter paper disks, and proteins (for MALDI-TOF MS identification) and genetical material (for qPCR HRM and RT-qPCR methodologies) were extracted. Results after impregnation were compared to results obtained directly from colony/respiratory specimens. For the early reading of broth microdilution (BMD) for polymyxin B, minimal inhibitory concentration (MIC) of 192 isolates (*Enterobacterales*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*) were compared in 8-9h (early reading) and

16-20h (standard reading) of incubation of polymyxin B BMD. In addition, we described a new qualitative polymyxin B susceptibility test using MALDI-TOF MS (MALDI POLYMYXIN TEST – MPT). For this purpose, we compared MPT results of 95 *Enterobacterales* isolates with polymyxin B BMD. Considering the correct isolate identification with scores > 1.7 in MALDI-TOF MS, 354/363 isolates presented the same identification directly from the colony and after impregnation in filter paper. The method of transporting inactivated microorganism presented high sensitivity (97.6%) and specificity (100%) when compared to the identification performed directly from the colony. For the carbapenemases detection by qPCR HRM after filter paper impregnation, 87/88 isolates presented the same result (presence or absence of carbapenemases), resulting in 98.86% of sensitivity and 100% of specificity. Only one isolate previously characterized as *bla*NDM did not present the expected result. The filter paper evaluation for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR presented excellent results of concordance (97.2%) compared with the direct extraction of the respiratory specimens. The early reading of polymyxin B BMD and MPT presented 97.9% and 95.8% of categorical agreement with the reference method, respectively. The filter paper can be used as an alternative means of transporting of microorganisms in order to carry out methodologies above-mentioned. Both early reading of polymyxin B and MPT presented high concordance with BMD; therefore, these methodologies may be employed in routine of microbiological laboratory and would allow to release polymyxin B results in the same day that bacteria is identified.

Keywords: Filter paper, MALDI-TOF MS, qPCR HRM, RT-qPCR, Polymyxin B

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Principais testes fenotípicos de suscetibilidade às polimixinas..... | 31 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB - Ácido fenilborônico

AS - Ágar Sangue

BGNF - bacilos Gram negativos não fermentadores

BMD – *Broth Microdilution*

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CEVS-RS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde – Rio Grande do Sul

CGP - Cocos Gram-positivos

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMT - Complexo *Mycobacterium Tuberculosis*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ERC - Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos

ESBL - *Extended Spectrum Beta-Lactamase*

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GC – Guanina Citosina

GES – *Guiana-extended spectrum*

HRM – *High Resolution Melting*

IMP - Imipenemase

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LPS - Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*

MBL - Metallo- β -Lactamases

MBT – ASTRA - MALDI Biotyper - Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay

MCR - Micobactérias de Crescimento Rápido

MCR – *mobile colistin resistance*

MHCA - Mueller Hinton Cation ajustado

MNT - Micobactérias não Tuberculosas

MS - *Mass Spectrometry*

NDM - *New Delhi Metallo β -lactamase*

OXA – Oxacilinase

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH - Potencial hidrogeniônico

qPCR - PCR em tempo real

RA - Resistência Antimicrobiana

RAST - *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing*

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RG - *Relative Growth*

T_m - Temperatura de *melting*

VIM - Verona imipenemase

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Identificação de microrganismos de importância médica | 17 |
| 1.1.1 <i>Convencional</i> | 17 |
| 1.1.2 <i>MALDI-TOF MS</i> | 20 |
| 1.2 Resistência antimicrobiana | 23 |
| 1.2.1 <i>Carbapenemases</i> | 24 |
| 1.2.2 <i>Resistência às Polimixinas</i> | 25 |
| 1.2.3 <i>Deteção laboratorial de carbapenemases</i> | 27 |
| 1.2.4 <i>Determinação de suscetibilidade às polimixinas</i> | 29 |
| 1.3 SARS-Cov-2 | 33 |
| 2 OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 Objetivo Geral | 35 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 35 |
| 3 ARTIGOS CIENTÍFICOS | 37 |
| Artigo I - Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated bacteria for identification using the MALDI-TOF MS system | 37 |
| Artigo II – Evaluation of filter paper as a means of transporting inactivated Gram-negative non-fermentative bacteria and <i>Haemophilus</i> spp. for identification using the MALDI-TOF MS system | 39 |
| Manuscrito III - Evaluation of filter paper to transport inactivated Nontuberculous Mycobacteria and Yeast for identification using the MALDI-TOF MS system | 41 |
| Artigo IV – Evaluation of filter paper to transport inactivated bacteria to detect carbapenem resistance genes by multiplex real-time PCR using high-resolution melting | 43 |
| Manuscrito V – Evaluation of filter paper to transport oro/nasopharyngeal samples to detect SARS-CoV-2 by RT-qPCR | 45 |
| Manuscrito VI – A simple and rapid method to determine qualitative Polymyxin B susceptibility by MALDI-TOF MS | 47 |
| Manuscrito VII – Evaluation of early reading of Broth Microdilution technique for Polymyxin B | 49 |
| 5 PATENTE DE INTERESSE | 51 |
| 6 DISCUSSÃO GERAL | 137 |
| 7 CONCLUSÕES GERAIS | 143 |
| REFERÊNCIAS | 145 |
| ANEXOS | 157 |
| Anexo – 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa | 157 |
| Anexo – 2: Resumos publicados em congressos | 165 |
| Anexo – 3: Apresentações orais em congressos | 169 |
| Anexo – 4: Trabalhos publicados em colaboração não relacionados ao projeto da tese | |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Identificação de microrganismos de importância médica

1.1.1 Convencional

A identificação de microrganismos a partir de materiais clínicos obtidos de processos infecciosos é, tradicionalmente, baseada na cultura microbiológica. O processo da cultura é dependente do tempo de incubação para que o crescimento microbiano se torne visível. Assim, desde o recebimento do material clínico no laboratório de microbiologia até a emissão do laudo são necessárias pelo menos 24-48h. O longo tempo para a identificação microbiana é considerado um problema para o direcionamento de tratamento de um grande número de infecções (KELLEY, 2017), o que na prática acarreta em tratamentos empíricos, muitas vezes errôneos, que prolongam a infecção, o tempo de hospitalização, aumentam a morbi/mortalidade do paciente e os custos do tratamento (IDELEVICH; BECKER, 2019).

As infecções estão amplamente disseminadas e não se restringem apenas a ambientes nosocomiais, sabe-se que as infecções têm potencial capacidade de afetar qualquer pessoa, de qualquer idade em qualquer país e em qualquer contexto epidemiológico (WHO 2014). É consenso que o tempo até o início da terapia antimicrobiana e a escolha adequada da mesma impactam no desfecho das doenças infecciosas (MAURER et al., 2017).

Os bacilos Gram-negativos (BGN) são divididos em 2 grupos: as enterobactérias e os BGN não fermentadores (BGNNF). Esses grupos de bactérias são responsáveis pela maioria das infecções hospitalares e comunitárias e por isso sua identificação é de suma importância para o direcionamento terapêutico. A identificação convencional de BGN da ordem *Enterobacterales*, é feita pela avaliação da fermentação de diferentes carboidratos, produção de indol, H₂S e outros testes bioquímicos (OPLUSTIL et al., 2004). Eventualmente, a identificação de algumas espécies da ordem *Enterobacterales* pode requerer provas imunológicas como a reação de aglutinação com látex. As provas bioquímicas de fermentação de açúcares acima mencionadas podem ser realizadas tanto de forma manual quanto automatizada, sendo que ambas as metodologias fornecem a identificação em nível de espécie dos principais isolados de importância médica (O'HARA, 2006; PILONETTO; PILONETTO, 1998). No entanto, os testes

bioquímicos tradicionais apresentam algumas desvantagens, como fornecer resultados inconclusivos para alguns isolados e não serem capazes de identificar espécies novas ou subespécies (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Os BGNNF compreendem grande variedade de organismos, com características bioquímicas bastante diversas sendo que sua incapacidade de fermentar a glicose é o principal problema para sua identificação com a utilização de provas bioquímicas convencionais; assim, é necessária a utilização de sistemas mais apropriados de identificação e provas adicionais aos testes bioquímicos convencionais. A identificação de BGNNF representa um desafio para os laboratórios de bacteriologia clínica, já que esses microrganismos podem ser fenotipicamente muito semelhantes e a maioria dos sistemas comerciais de identificação de bactérias não consegue distinguí-los de forma confiável, principalmente devido à alta similaridade de resultados bioquímicos entre espécies (ENOCH et al, 2007; WHISTLER et al., 2019). De fato, para a identificação de BGNNF é necessário utilizar técnicas muito mais acuradas que as provas bioquímicas, que sejam capazes de fornecer a identificação de subespécies ou espécies que apresentam características fenotípicas muito similares (JUHÁSZ et al., 2018).

Os microrganismos fastidiosos são caracterizados por apresentarem maiores exigências nutricionais, sendo necessário suplementar os meios de cultura com fatores especiais de crescimento (LAMOTH et al., 2014). O tratamento de infecções causadas por bactérias fastidiosas incomuns pode requerer a utilização de tratamentos diferenciados, logo, é importante identificar pelo menos o gênero ao qual uma bactéria fastidiosa pertence (ANVISA 2012). Entre os microrganismos fastidiosos, destaca-se o gênero *Haemophilus* (JORDENS; SLACK, 1995). Esse gênero necessita de fatores de crescimento presentes no sangue: fatores X e V. Bactérias dependentes destes fatores não crescem em ágar sangue com eritrócitos íntegros, mas podem se desenvolver ao redor de colônias de microrganismos como o *S. aureus* que produz o fator V durante o seu crescimento - fenômeno conhecido como satelitismo. A diferenciação das espécies do gênero *Haemophilus* pode ser um problema para os laboratórios de microbiologia convencionais, já que o teste tradicionalmente disponível nessas instituições (satelitismo), não é capaz de diferenciar as espécies (NØRSKOV-LAURITSEN, 2014). Essa diferenciação é dependente de provas como fator X e fator V, os discos comerciais impregnados com esses fatores normalmente não estão disponíveis em laboratórios de rotina de pequeno porte, assim como, testes de detecção de antígeno. A diferenciação das espécies de *Haemophilus* é importante já que algumas espécies fazem parte da microbiota normal da

nasofaringe e orofaringe da maioria dos indivíduos, enquanto o isolamento de *H. ducreyi* e *H. influenzae* é geralmente relacionado a processos infecciosos (BRUIN et al., 2014).

Os cocos Gram positivos (CGP) são divididos, inicialmente, pelo teste da catalase e coagulase. As espécies catalase positiva mais comumente associadas à doença humana são *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*. Dentre as espécies de estafilococos que causam infecção no ser humano, o *S. aureus* é a única espécie que produz coagulase, logo, as outras espécies são referidas como coagulase negativas (CNS). O *S. aureus*, pode ser identificado com testes bastante simples, no entanto, deve-se realizar provas diferenciais para outras espécies do gênero (ANVISA 2012). Assim, a identificação de CNS é problemática para os laboratórios de microbiologia clínica, que, geralmente, não os identificam (exceto quando sugestivos de *S. saprophyticus* provenientes de material urinário), entretanto, a identificação desses microrganismos é importante em isolados de líquidos estéreis. A diferenciação de CNS requer grande variedade de provas bioquímicas, as quais, muitas vezes, não fornecem resultados confiáveis e não diferenciam subespécies dentro de um mesmo complexo (BORA et al., 2018).

Os CGP, catalase negativa, compõe um grupo de importantes patógenos humanos. A identificação de espécies de estreptococos é complexa, pode ser baseada nas propriedades hemolíticas, propriedades sorológicas (grupos de Lancefield) e algumas propriedades bioquímicas. Os estreptococos beta hemolíticos podem ser diferenciados através de aglutinação com soros específicos contra os antígenos de Lancefield (A, B, C, D, F e G), a qual é uma prova rápida e de fácil execução, porém não é acessível a todos os laboratórios devido ao elevado custo (REMMINGTON; TURNER, 2018). Já a identificação dos estreptococos alfa hemolíticos não deve ser realizada por aglutinação, então essas identificações necessitam de uma série de testes bioquímicos (ANVISA 2012).

Para identificação convencional das bactérias mencionadas acima são necessárias diversas etapas, diferentes testes bioquímicos e tempo. Por outro lado, um processo ainda mais demorado e laborioso é necessário quando se trata do gênero *Mycobacterium*. A identificação de micobactérias em nível de espécie é tradicionalmente realizada através da avaliação das características morfológicas e bioquímicas do organismo, em especial para distinção de espécies pertencentes ao Complexo *Mycobacterium Tuberculosis* (CMT) das Micobacérias não Tuberculosas (MNT) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Entretanto, os métodos fenotípicos bioquímicos tradicionais são técnicas significativamente trabalhosas, com alto custo financeiro

e demandam técnicos experientes para sua execução. Como o tratamento para as infecções causadas pelas micobactérias pode ser diferente conforme diferentes espécies, é importante para o direcionamento de terapia que a identificação seja realizada a esse nível taxonômico (GRIFFITH et al., 2007). Além disso, as micobactérias apresentam crescimento mais lento em relação às demais bactérias, corroborando para a implementação de técnicas que forneçam diagnóstico diferencial em tempo menor do que os obtidos pelas técnicas convencionais (ALCAIDE et al., 2018; KOH, 2017).

Cabe mencionar ainda que a identificação de leveduras em nível de espécie também é um processo árduo, porém muito importante, já que algumas espécies podem estar relacionadas à resistência antifúngica (ALAM et al., 2014). Os métodos convencionais de identificação incluem micromorfologia, crescimento em meios cromogênicos e assimilação de açúcares, normalmente esses microrganismos necessitam de um tempo prolongado para a identificação. Os testes de avaliação da assimilação de carboidratos podem ser realizados de forma manual ou automatizada, porém as bases de dados automatizadas são limitadas e podem fornecer identificações incorretas (NEPPELENBROEK et al., 2014).

1.1.2 MALDI-TOF MS

Uma das tecnologias mais modernas e revolucionárias de diagnóstico microbiológico que vem sendo utilizada em laboratórios de microbiologia e que reduz de forma muito significativa o tempo de identificação microbiana em comparação às técnicas da microbiologia convencional, é o “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS)*” (CROXATTO et al., 2012). As grandes vantagens do uso de MALDI-TOF MS na identificação microbiana se devem a simplicidade de execução do método, a rapidez na identificação de microrganismos, a classificação taxonômica exata e ao baixo custo de reagentes (SENG et al., 2010).

O MALDI-TOF MS consiste em um sistema no qual o microrganismo (bactéria, fungo ou micobactéria) é colocado em uma placa metálica juntamente com uma matriz polimérica. Esse conjunto é submetido a feixes de laser emitidos pelo equipamento, os quais ionizam e vaporizam as proteínas microbianas. Os fragmentos proteicos ionizados percorrem um tubo de vácuo até alcançarem um detector. O tempo de chegada ao detector (“*time of flight*”) varia conforme o tamanho e a carga da molécula (SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2017). Assim,

diferentes espécies microbianas, apresentam espectros proteicos específicos, os quais são comparados, em tempo real, com uma gama de espectros presentes no banco de dados do equipamento. Uma base de dados computadorizada interpreta os espectros e fornece a identificação e o nível de confiabilidade da mesma para cada isolado através de scores (ANGELETTI, 2017).

A implementação do MALDI-TOF MS nos laboratórios de microbiologia vem reduzindo o tempo para liberação de exames culturais em pelo menos 24 h, já que a identificação pode ser obtida no mesmo dia em que hajam colônias isoladas em meio de cultura (FLORIO et al., 2018).

Os materiais para identificação microbiana no sistema MALDI-TOF MS apresentam baixo custo, no entanto, é necessário um alto investimento inicial para a aquisição do equipamento. A maioria dos laboratórios brasileiros não possui equipamentos de MALDI-TOF MS. Estes laboratórios acabam por realizar a identificação bacteriana apenas através de testes fenotípicos convencionais, que muitas vezes não permitem a identificação em nível de espécie e no caso de bactérias incomuns ou fastidiosas, frequentemente sua identificação não se faz possível mesmo em nível de gênero. Então, um desafio importante é tornar possível que essa tecnologia possa ser utilizada por laboratórios de pequeno porte.

No Brasil, o transporte de isolados clínicos de laboratórios de menor porte para laboratórios de maior porte já tem sido rotina (OMBELET et al., 2018). O transporte de microrganismos entre laboratórios ocorre nas próprias placas/tubos de meios de cultivo ou em *swab* próprio para transporte (nessa forma ainda é necessário realizar nova semeadura para isolamento do microrganismo antes da identificação). Esse tipo de transporte apresenta risco biológico, tendo em vista que o microrganismo é transportado em sua forma viável (infectante). Assim, todos os aspectos de biossegurança devem ser seguidos para minimizar a possibilidade de contaminação durante o transporte de microrganismos viáveis. No Brasil, o transporte de amostras biológicas exige embalagens com rotulagem específicas e deve ser realizado somente por empresas que sigam normas estabelecidas para este fim, conforme a RDC N° 20 de 2014 (ANVISA 2014). Diante do potencial infeccioso dos microrganismos, o desenvolvimento de metodologias que reduzam ou eliminem o risco biológico associado ao transporte microbiano se torna necessário para que cada vez mais laboratórios de menor porte tenham acesso aos benefícios da tecnologia de MALDI-TOF MS, via laboratórios de apoio/referência.

O papel filtro vem sendo utilizado há mais de 20 anos com o propósito de coletar, armazenar e transportar amostras biológicas, como por exemplo, sangue de recém-nascidos,

com a finalidade de identificar e/ou medir componentes que auxiliem no diagnóstico de doenças (MOAT et al., 2020; SANDER; NIEHAUS, 1980; STORCHILO et al., 2019). Diversas publicações reportaram o uso de papel filtro previamente tratado com conservantes/anticoagulantes para possibilitar/otimizar o transporte e análise de analitos principalmente na área de bioquímica e biologia molecular (ANTHWAL et al., 2019; NEWMAN et al., 2019; RASOLONJATOVO et al., 2020). O uso de papel filtro como meio de transporte de amostras microbianas pode beneficiar significativamente o envio de microrganismos entre laboratórios (CARNEIRO et al., 2020).

1.2 Resistência antimicrobiana

Diversos fatores contribuem para os altos níveis de RA, em especial, destaca-se a capacidade dos microrganismos de adquirir elementos genéticos móveis contendo genes que conferem resistência a diversos antimicrobianos. Outro importante fator, que contribui para taxas crescentes de RA, é o uso excessivo de antimicrobianos que resulta em contínua pressão seletiva sobre os microrganismos (SEPTIMUS, 2018). Apesar dos esforços dos serviços de controle de infecção hospitalar, os quais acabam apresentando pouco sucesso na prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, a RA continua em curva ascendente (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

A RA é um processo evolutivo esperado, mas o surgimento de novos mecanismos de resistência, em resposta à exposição aos antimicrobianos, bem como a disseminação dos mecanismos de resistência bem estabelecidos e ausência de novos antibióticos ativos contra bactérias multirresistentes apresentam um impacto substancial na RA e esse somatório de fatores leva a uma visão pessimista na erradicação da RA (BONOMO et al., 2018; COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Diversos microrganismos estão associados à RA, sendo os bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos os que mais impactam atualmente na clínica. Entre eles destacam-se as bactérias pertencentes à ordem *Enterobacterales* e as bactérias não fermentadoras, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (ZAVASCKI et al., 2013; ZAVASCKI et al., 2010). Tais representantes estão distribuídos no meio ambiente e tem potencial de causar uma gama de infecções comunitárias e hospitalares, como: cistite, pielonefrite, septicemia, pneumonia, meningite, entre outras, disseminando-se facilmente entre os seres humanos (NORDMANN et al., 2011)

É recomendado que para o tratamento de infecções, utilize-se o agente de menor espectro que o microrganismo apresente suscetibilidade. Assim, em geral, as infecções não complicadas por enterobactérias foram, por bastante tempo, tratadas com antimicrobianos das primeiras gerações dos β -lactâmicos (DE WAELE; MARTIN-LOECHES, 2018). No entanto, para tentar controlar a propagação de cepas com resistência mediada por enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), as quais conferem resistência a maioria dos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e monobactâmicos (D'ANGELO et al., 2016), os carbapenêmicos foram introduzidos na prática médica para o tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos (SON et al., 2018). Após a crescente exposição das bactérias a essa

classe de antimicrobianos, novos mecanismos de resistência foram descritos, tais como: combinação de produção de ESBL com alteração na permeabilidade da membrana externa (perda de porinas e hiperexpressão de bombas de efluxo) e produção de β -lactamases (carbapenemases) que são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos (NORDMANN et al., 2012a).

1.2.1 *Carbapenemases*

As carbapenemases são consideradas o principal e o mais preocupante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias. Isso porque a maioria delas eleva significativamente os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos carbapenêmicos, além disso, apresentam disseminação facilitada por se encontrarem em elementos genéticos móveis passíveis de transferência o que facilita a disseminação entre os pacientes (DOI; PATERSON, 2015; LEE et al., 2016; NORDMANN et al., 2012b).

As carbapenemases podem ser divididas conforme os critérios de Ambler ou Bush-Jacoby. A classificação de Ambler agrupa as carbapenemases em grupos moleculares (A, B, C, D), conforme a estrutura primária da enzima (AMBLER, 1980). A classificação de Bush-Jacoby agrupa as enzimas conforme sua característica funcional relacionando sua estrutura com o espectro de antimicrobianos hidrolisados e ação dos inibidores de β -lactamases, devido aos critérios utilizados nessa classificação, ela se torna mais subjetiva e de difícil aplicação (BUSH; JACOBY, 2010).

Segundo a classificação de Ambler as classes A, C e D são compostas por enzimas que possuem o aminoácido serina no seu sítio ativo e a classe B são as metaloenzimas que contém um ou dois íons zinco no sítio ativo (AMBLER, 1980).

Simplificadamente, as carbapenemases da classe A de Ambler são fortemente hidrolíticas, suas representantes mais conhecidas são a “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” (KPC) e a “*Guiana-extended spectrum*” (GES), ambas codificadas por plasmídeos (NAAS et al., 2016). Em enterobactérias, a KPC é a enzima que mais impacta epidemiologicamente, clinicamente e microbiologicamente, e encontra-se disseminada globalmente, sendo a variante KPC-2 a mais comumente identificada (CHIU et al., 2013; GOMEZ et al., 2011; PAVEZ et al., 2009). As metalo- β -lactamases (MBLs) que são pertencentes a classe B de Ambler hidrolisam todos os β -lactâmicos e são bloqueadas por quelantes de íons metálicos, como o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) (BEBRONE,

2007). Em enterobactérias essa classe tem como representantes mais comuns a “*New Delhi metallo β -lactamase*” (NDM), a “*Imipenemase*” (IMP) e a “*Verona imipenemase*” (VIM) (LÓPEZ et al., 2019). As oxacilinas que são integrantes da classe D de Ambler são caracterizadas por apresentarem baixa atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos, o que dificulta sua identificação através de testes fenotípicos, e conseqüentemente, a real epidemiologia das oxacilinas é desconhecida (MANCINI et al., 2017; MATSUMURA; PITOUT, 2016).

1.2.2 Resistência às Polimixinas

O rápido aumento na prevalência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), notavelmente devido a carbapenemases, fez com que as opções terapêuticas se tornassem escassas e fármacos que estavam em desuso, devido principalmente à efeitos adversos (neurotoxicidade e nefrotoxicidade), fossem readmitidos na clínica médica (ZAVASCKI; NATION, 2017). Esse é o caso da classe das polimixinas, a qual é composta pela polimixina E (colistina) e pela polimixina B. A polimixina B e a colistina apresentam a mesma atividade *in vitro* e diferem apenas por um aminoácido na sua estrutura química. As polimixinas são antibióticos de amplo espectro que interagem com as membranas celulares, especificamente com os lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolípidios, promovendo a desestabilização do LPS através do aumento da permeabilidade, que leva ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e como consequência a morte celular bacteriana. Além do mecanismo de ação nas membranas celulares, outras formas de interação como o efeito de endotoxina e inibição de enzimas responsáveis pela respiração bacteriana tem sido discutidas como possíveis mecanismos de ação das polimixinas (POIREL et al., 2017; TRIMBLE et al., 2016).

As polimixinas foram descritas em 1947 a partir da bactéria *Bacillus polymyxa* (BENEDICT; LANGLYKKE, 1947) e foram utilizadas até a década de 1960 em infecções graves por bacilos Gram-negativos mas, a partir da década de 1970, elas foram substituídas por antimicrobianos menos tóxicos. No entanto, o aumento da prevalência de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes, associado ao fato que a indústria farmacêutica não tem lançado no mercado novos fármacos com mecanismos de ação diferentes, as polimixinas retornaram como opções terapêuticas imprescindíveis para o tratamento de infecções graves em particular por *Enterobacterales*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (MOFFATT et al., 2019).

As polimixinas são consideradas a última opção de tratamento de infecções causadas por ERC, contudo, com o crescente uso dessa classe de antibióticos em todo o mundo foi inevitável o surgimento de mecanismos de resistência a esses antimicrobianos (RIGATTO et al., 2019). A resistência às polimixinas pode existir de forma natural (normalmente devido a mutação no genoma bacteriano) nos seguintes grupos de bactérias: *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* e *Vibrio cholerae*. Além da resistência natural existe a resistência adaptativa (ou adquirida), na qual a bactéria era inicialmente sensível e torna-se resistente às polimixinas (POIREL et al., 2017).

Em membros da ordem *Enterobacteriales* o principal mecanismo de resistência adquirida às polimixinas se deve a mutações cromossômicas em genes envolvidos na síntese do LPS da parede celular bacteriana, como o *pmrAB* e *phoPQ* e no caso de *K. pneumoniae* também o seu regulador negativo o gene *mgrB*. Essas mutações são reguladas pelo sistema de dois componentes que pode ser ativado por fatores ambientais, tais como: presença de cátions, alteração de pH ou presença do próprio antimicrobiano. Esses fatores desencadeiam modificações no LPS, principalmente por uma adição de 4-amino-arabinose na porção do lipídio A do LPS bacteriano, diminuindo a afinidade do antimicrobiano pela superfície celular o que, por sua vez, faz com que a bactéria se torne resistente às polimixinas (MELETIS; SKOURA, 2018; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Em 2016, a partir da publicação de Liu et al. ficou evidenciado que a resistência às polimixinas em *Enterobacteriales* pode não ser mediada apenas por mutações cromossômicas, mas também por um mecanismo de resistência mediado por elemento genético móvel. Esse mecanismo mediado pelo gene *mcr* (*mobile colistin resistance*), pelo fato de ser transferível, gerou grande preocupação com relação a sua disseminação no mundo (LIU et al., 2016). Vários estudos foram conduzidos para elucidar o mecanismo de resistência móvel às polimixinas e ficou evidenciado que o gene *mcr* nem sempre eleva significativamente os níveis de CIM à essa classe de antimicrobianos (DALMOLIN et al., 2017; DALMOLIN et al., 2018; DALMOLIN, et al., 2019a).

Estudos sugerem que em 2050, se as medidas de controle de infecção não forem melhoradas ou novas estratégias que reduzam o tempo de elucidação de resistência não forem implementadas, as ERC se tornarão ainda mais importantes como causa de infecções relacionadas aos cuidados de saúde, tendo sua disseminação através dos mecanismos já evidenciados e talvez através de novos mecanismos de resistência, tal qual ocorreu com o gene

mcr em *Enterobacterales* (BASSETTI et al., 2017). Sabe-se que a microbiologia é um campo muito dinâmico e estratégias alternativas para reverter a tendência de ascensão da RA é de responsabilidade multidisciplinar, indo desde os laboratórios de microbiologia até os grupos de controle de infecção.

1.2.3 Detecção laboratorial de carbapenemases

Existem diversos métodos disponíveis para detecção laboratorial de carbapenemases, sendo que os principais incluem: 1) Discos combinados com inibidores enzimáticos: utilização de discos de carbapenêmicos em comparação a discos dos mesmos carbapenêmicos impregnados com substância inibidora ou potencializadora para expressão de carbapenemases, sendo utilizado, por exemplo, o ácido fenilborônico (AFB), que é capaz de realizar bloqueio enzimático de carbapenemases de classe A e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que inibe as metalo enzimas; cabe mencionar que estes testes requerem incubação *overnight*, atrasando o tempo para obtenção do resultado (ANVISA 2013); 2) Métodos colorimétricos/acidimétricos: as técnicas de CARBA NP e BLUE-CARBA são metodologias baseadas na redução do pH, na presença de uma carbapenemase, devido à hidrólise do anel β -lactâmico presente nos carbapenêmicos. Nesse método de triagem para detecção de carbapenemase é utilizado um indicador de pH, que no CARBA NP é o vermelho de fenol e no BLUE-CARBA é o azul de bromotimol; cabe mencionar que estes métodos, embora rápidos (necessitam de no máximo 4 horas), não conseguem diferenciar o tipo de carbapenemase e podem não detectar as enzimas quando produzidas em baixa quantidade (NORDMANN et al, 2012b); 3) Métodos imunocromatográficos: os quais utilizam anticorpos monoclonais específicos em membrana de nitrocelulose. Esses métodos são comerciais e os mais conhecidos são o RESIST-4 O.K.N.V. (diferencia OXA-48like, KPC, NDM e VIM) e o CARBA-5 (diferencia OXA-48like, KPC, NDM, VIM e IMP). Tais ensaios representam os métodos mais rápidos disponíveis, demonstram alta sensibilidade e especificidade, porém ainda apresentam custo considerado elevado (BIANCO et al., 2020).

A tecnologia de MALDI-TOF MS também pode ser utilizada para a detecção de carbapenemases, seja pela avaliação da hidrólise da molécula do carbapenêmico ou pela detecção da enzima carbapenemase propriamente dita. No método de hidrólise de carbapenêmicos é realizada a detecção da atividade hidrolítica através da avaliação de picos específicos da molécula do antimicrobiano intacta ou seus metabólitos em MALDI-TOF MS.

Esses ensaios são capazes de detectar a hidrólise devido a carbapenemases, mas não conseguem identificar a respectiva carbapenemase, além de requererem pessoal qualificado para interpretação das análises (HRABÁK et al., 2011). Outra possibilidade é o uso do sistema MALDI-TOF MS para a detecção direta da carbapenemase, embora promissores, esses ensaios são mais complexos pois requerem insumos diferenciados (como por ex.: ácido sinapínico para detecção de KPC), além de um modelo de equipamento de MALDI-TOF MS não disponível na maioria dos laboratórios (FIGUEROA-ESPINOSA et al., 2019; ZHONG et al., 2019).

Apesar de existirem diversos testes para triagem ou detecção de carbapenemases, o padrão de referência para identificação e diferenciação dessas enzimas é baseado em técnicas moleculares, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é capaz de identificar os genes que codificam as carbapenemases. A técnica de PCR permite, portanto, identificar especificamente todos os tipos de carbapenemases já descritos, mesmo que não estejam expressando o gene de resistência (MONTEIRO et al., 2012; WATSON et al., 2015). A PCR pode ser simplex ou multiplex, na PCR simplex é utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores (*forward* e *reverse*) os quais, com o auxílio da enzima *Taq* polimerase, são capazes de realizar a amplificação de apenas um gene alvo. Após a PCR, se necessário, é possível realizar o sequenciamento do amplicon para obtenção da sequência específica de nucleotídeos, que é empregado, principalmente, para o conhecimento de novas variantes gênicas de carbapenemases (WATSON et al., 2015). Na PCR multiplex, é possível utilizar vários pares de oligonucleotídeos iniciadores que permitem à amplificação de diferentes alvos na mesma reação (MONTEIRO et al., 2012).

Para a detecção de carbapenemases é interessante fazer uso da técnica de PCR em tempo real (qPCR), o qual é capaz de realizar ensaios simplex ou multiplex com excelente sensibilidade e especificidade (POIREL et al., 2011). A qPCR que emprega a técnica de *High Resolution Melting* (HRM) é ainda mais sensível que a qPCR tradicional e pode ser usada para identificar variações nas sequências de ácidos nucleicos, já que é baseado na detecção de pequenas diferenças nas curvas de dissociação de PCR, onde há um controle preciso de rampagem de temperatura e recursos avançados de captura de dados. Nessa técnica é determinada a temperatura de *melting* (T_m), que é a temperatura em que 50% da dupla fita de DNA se dissocia tornando-se fita simples. A T_m é correlacionada com o tamanho do fragmento e com o conteúdo de GC da dupla fita (SINGH et al., 2016). Essa determinação é possível pela utilização de um corante fluorescente que se intercala no DNA dupla fita e emite fluorescência, a qual é detectada pelo equipamento que demonstra em tempo real gráficos de T_m . As

vantagens da tecnologia de HRM são o fluxo de trabalho simples e rápido, a elevada especificidade que permite a detecção de fragmentos de genes com apenas 0,1°C de diferença (VOSSEN et al., 2009). Embora as vantagens dessa tecnologia sejam inúmeras, o custo para aquisição do equipamento é alto e apenas grandes instituições, especializadas em diagnóstico personalizado, são capazes de obtê-lo. Por essa razão, para ampliar o acesso a essa ferramenta considerada padrão ouro para a identificação de carbapenemases, também se tem a ideia de utilizar o papel filtro para transporte de bactérias inativadas para a detecção de genes de resistência. A vantagem sobre o transporte normalmente realizado é apresentar menor (ou nulo) risco biológico, já que o papel filtro não vaza, não quebra, não necessita de transporte refrigerado e, portanto, não necessitaria embalagem e transporte específicos, beneficiando os pequenos laboratórios e seus clientes.

1.2.4 *Determinação de suscetibilidade às polimixinas*

Os testes tradicionais empregados na microbiologia para avaliação de suscetibilidade aos antimicrobianos, como disco-difusão, gradiente de concentração e metodologias automatizadas, não são adequados para avaliação de suscetibilidade às polimixinas (GALES et al., 2001). Sabe-se que essa classe de antimicrobianos possui características peculiares que dificultam a avaliação de sua suscetibilidade *in vitro*. As polimixinas apresentam difusão lenta e irregular em ágar o que prejudica o teste de disco-difusão e gradiente de concentração, bem como propriedades catiônicas as quais facilitam sua aderência ao plástico. Além disso, deve ser considerado o fenômeno de heterorresistência que os bacilos Gram-negativos podem apresentar em relação às polimixinas (BAKTHAVATCHALAM; VEERARAGHAVAN, 2017). Levando em conta tais dificuldades, a metodologia referência para a determinação de suscetibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo (BMD), que é uma técnica com elevada confiabilidade e reprodutibilidade, entretanto, apresenta como desvantagens ser relativamente laboriosa e requerer elevado tempo de incubação (aproximadamente 24h) para obtenção dos resultados (POIREL et al., 2017).

Uma metodologia comercial alternativa à BMD é o Policimbac® (Probac do Brasil), o qual é um painel com o antibiótico polimixina B liofilizado. A utilização desse painel comercial requer a confecção manual de tubos de passagem com volumes definidos para a diluição do inóculo bacteriano, não apresentando grandes ganhos em agilidade de processos, além de também requerer incubação *overnight* (PROBAC 2018).

Outra opção comercial é o meio *Superpolymyxin*, o qual é um meio seletivo que inibe o crescimento de *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., fungos e é utilizado para realizar a triagem de bactérias Gram-negativas com suscetibilidade reduzida à colistina. Embora seja um teste de fácil execução, também requer incubação *overnight* (NORDMANN et al., 2016b).

Considerando a importância da manutenção da efetividade das polimixinas para o manejo de infecções por bactérias multirresistentes, a pesquisa por novas metodologias rápidas, confiáveis e menos laboriosas, para a detecção de resistência às polimixinas, se faz necessária (TSUJI et al., 2019).

Outras metodologias vêm sendo desenvolvidas para avaliação de suscetibilidade às polimixinas, tais como *Rapid Polymyxins NP Test* - desenvolvido em 2016 por Nordmann et al. O *Rapid Polymyxins NP Test* é baseado no metabolismo da glicose, ou seja, quando há crescimento bacteriano, mesmo na presença de uma concentração definida de polimixina, o meio é acidificado e ocorre a mudança de cor do indicador de pH (de vermelho para amarelo), embora esse teste seja um ensaio fenotípico rápido (aproximadamente 4 horas), não fornece resultado de CIM (NORDMANN et al., 2016a).

Outras duas técnicas, muito recentemente, padronizadas pelo Clinical & Laboratory Standards Institute – (CLSI 2020) são a técnica de Disco Eluição da Colistina e o ágar colistina. A técnica de Disco Eluição da Colistina se baseia na eluição do antibiótico a partir de discos de papel de filtro comerciais disponíveis nos laboratórios clínicos a baixo custo. O teste consiste na adição de um, dois e quatro discos impregnados com 10µg de colistina em 10 mL de Mueller Hinton Cation ajustado (MHCA), seguido por agitação dos tubos e pelo menos 30 minutos de eluição da colistina dos discos (CLSI 2020). A bactéria a ser testada é adicionada aos tubos e é avaliada sua capacidade de crescimento para determinar sua suscetibilidade a colistina.

Outro método fenotípico alternativo para avaliação de suscetibilidade às polimixinas é o *Colispot*, também conhecido como teste da gota, que consiste na aplicação de uma gota de solução de colistina ou polimixina B, na superfície do ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com suspensão bacteriana (escala 0,5 MacFarland) e posterior análise do diâmetro formado ao redor da gota. Se a bactéria é resistente às polimixinas não há zona de inibição bacteriana. Apesar da facilidade de execução, esse teste também requer 16-18 horas de incubação (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2020; JOUY et al., 2017). A tabela 1 sintetiza o conhecimento sobre os principais testes fenotípicos de suscetibilidade às polimixinas.

Tabela 1: Principais testes fenotípicos de suscetibilidade às polimixinas

| Teste | Espécies | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | Tempo | Referência |
|---|---------------------------------|-------------------|--------------------|-----------|---------------------------|
| Macrodiluição em caldo | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | 100 | 100 | 16-20 h | Haeili et al. (2019) |
| <i>Superpolymyxin</i> | <i>Enterobacterales</i> | 88.9 | 81.6 | 24-48 h | van Hout et al. (2020) |
| Policimbac | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | 100 | 100 | 18-20 h | Dalmolin et al. (2020a) |
| Teste da gota | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | >95 | >95 | 18-24 h | Perez et al. (2020) |
| CHROMagar™ | <i>E. coli</i> | 96 | 97 | 18-20 h | Thiry et al. (2019) |
| <i>Rapid Polymyxin NP</i> (Comercial) | <i>Enterobacterales</i> | 100 | 96,7 | 2-3 h | Malli et al. (2019) |
| <i>Rapid Polymyxin NP</i> (In-house) | <i>Enterobacterales</i> | 98 | 98 | 2-4 h | Dalmolin et al. (2019b) |
| <i>Rapid Acinetobacter</i> | <i>A.baumannii</i> | 100 | 100 | 3-4 h | Lescat et al. (2019) |
| <i>Rapid Pseudomonas</i> | <i>P.aeruginosa</i> | 100 | 100 | 3-4 h | Lescat et al. (2019) |
| <i>Rapid Resapolymyxin NP</i> | <i>Enterobacterales</i> | 100 | 100 | 3-4 h | Germ, Seme, et al. (2019) |
| Ágar diluição | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | 100 | 60,23 | 16-20 h | Haeili et al. (2019) |
| Microeluição em caldo de colistina | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | 95.35 | 84 | 16-20 h | Dalmolin et al. (2020b) |
| Teste de Microeluição em Placas | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | 88 | 80 | 16-20 h | Dalmolin et al. (2020b) |
| Tubo de ensaio de suscetibilidade à colistina | <i>Enterobacterales</i> + BGNNF | 93.02 | 88 | 16-20 h | Dalmolin et al. (2020b) |
| NG-TEST MCR-1 | <i>Enterobacterales</i> | 100 | 98, 99 | 15 min | Volland et al. (2019) |
| MALDIxin | <i>K. pneumoniae</i> | 100 | 100 | 15-30 min | Dortet et al. (2018) |

Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos estudos com uso do MALDI-TOF MS para a detecção de mecanismos de resistência e determinação de suscetibilidade à diversos antimicrobianos em diferentes espécies microbianas (AXELSSON; REHNSTAM-HOLM; NILSON, 2019; JUNG et al., 2016; LAU et al., 2014; IDELEVICH et al., 2018; WANG; SON; XU, 2021; LANGE et al., 2014; SPARBIER; SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2016), embora ainda existam poucos estudos avaliando a suscetibilidade às polimixinas por MALDI-TOF MS, esta abordagem parece ser promissora e reduz o tempo de detecção de resistência em

comparação com outros métodos já estabelecidos (SORENSEN et al., 2020; DORTET et al., 2018; FURNISS et al., 2019).

Considerando a importância das polimixinas na medicina humana, tem-se a necessidade de desenvolver e avaliar novas metodologias que forneçam resultados em tempo mais curtos do que as 18 a 24h dos métodos convencionais.

1.3 SARS-Cov-2

O início da epidemia do novo coronavírus pode ser relacionada ao mês de dezembro de 2019. Nessa época, vários pacientes foram diagnosticados com uma pneumonia viral primária e foi possível fazer uma associação epidemiológica dos casos dessa pneumonia ao mercado de frutos do mar de Huanan na cidade de Wuhan, província de Hubei, China (SOFI et al., 2020). Em 30 de janeiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou pandemia de COVID-19, causada por esse novo coronavírus, o SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2).

Desde o início da pandemia, o vírus se adaptou e evoluiu rapidamente ao redor do mundo, apresentando uma alta diversidade genética (YUAN et al., 2021). Semelhante a muitos vírus de RNA, o SARS-CoV-2 tem evoluído para novas variantes conforme ocorre o aumento na transmissão da doença entre indivíduos (KANNAN et al., 2021). Embora, a maioria das mutações tem pouco ou nenhum impacto nas propriedades do vírus, algumas alterações podem conferir maior transmissibilidade viral, agravar a doença ou influenciar no desempenho de vacinas e em ferramentas de diagnóstico (WHO, 2021).

Mesmo com todos os esforços de contenção, a rápida disseminação do vírus tem levado cada vez mais ao aparecimento de variantes de importância epidemiológica. Essa rápida evolução viral pode desencadear novas ondas de surto de COVID-19 aumentando drasticamente o número de novos casos, óbitos e o impacto global em diversos setores da economia.

O diagnóstico precoce de COVID-19 é uma medida fundamental na contenção da pandemia. Devido ao crescente aumento de casos, mesmo dois anos após o início da pandemia, ainda existe a necessidade da ampliação ao acesso a testes que forneçam resultados confiáveis. O principal teste laboratorial para a detecção do SARS-CoV-2 é o RT-qPCR. A detecção do vírus por RT-qPCR através da coleta de swab de oro/nasofaríngeo é caracterizada por boa sensibilidade e alta especificidade e tem sido considerada o "padrão ouro" na detecção do vírus (TORRES et al., 2021). Entretanto, equipamentos de PCR em tempo real são encontrados principalmente em centros de referência e pequenos laboratórios podem não possuir os equipamentos necessários para realizar testes com bom desempenho. Nesse contexto, a utilização de uma ferramenta de transporte da amostra biológica inativada, como o papel filtro,

tornaria o acesso a tecnologia de RT-qPCR mais rápido e eficiente na detecção de SARS-CoV-2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel filtro como meio de transporte de microrganismos inativados, bem como avaliar e desenvolver metodologias rápidas para detecção de resistência às polimixinas frente a bactérias Gram-negativas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Propor o transporte em papel filtro de bactérias inativadas comumente isoladas na rotina microbiológica para identificação no sistema MALDI-TOF MS;
2. Avaliar o papel filtro como meio de transporte de bacilos Gram-negativos não fermentadores e *Haemophilus influenzae* inativados para identificação no sistema MALDI-TOF MS;
3. Avaliar o papel filtro como meio de transporte de micobactérias não tuberculosas e leveduras inativadas para identificação no sistema MALDI-TOF MS;
4. Avaliar a utilização do papel filtro como meio de transporte de bactérias inativadas para análise de genes de resistências a carbapenêmicos através de qPCR HRM;
5. Avaliar a utilização do papel filtro como meio de transporte de amostras de oro/nasofaringe para pesquisa de SARS-CoV-2 através de RT-qPCR;
6. Desenvolver uma metodologia qualitativa para determinação do perfil de suscetibilidade a polimixina B através do MALDI-TOF MS;
7. Avaliar a leitura antecipada da microdiluição em caldo para polimixina B.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo I - Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated bacteria for identification using the MALDI-TOF MS system

Artigo publicado no “*Journal of Microbiological Methods*”.

Este capítulo é composto por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 37 – 42.

Carneiro, M. S., Fracasso, A., Lovison, O., Barreto, F., & Barth, A. L. (2020). Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated bacteria for identification using the MALDI-TOF MS system. *Journal of microbiological methods*, 171, 105863. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105863>

Artigo II – Evaluation of filter paper as a means of transporting inactivated Gram-negative non-fermentative bacteria and *Haemophilus* spp. for identification using the MALDI-TOF MS system

Artigo publicado na “Letters in Applied Microbiology”

Este capítulo é composto por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 43 – 52.

Carneiro, M. S., Crispim, M. N., Wilhelm, C. M., Volpato, F., & Barth, A. L. (2022). Evaluation of filter paper as a means of transporting inactivated Gram-negative non-fermentative bacteria and *Haemophilus* spp. for identification using the MALDI-TOF MS system. *Letters in applied microbiology*, 10.1111/lam.13695. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/lam.13695>

Manuscrito III - Evaluation of filter paper to transport inactivated Nontuberculous Mycobacteria and Yeast for identification using the MALDI-TOF MS system

O texto completo do presente capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 53 – 66, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Nele consta a avaliação do papel filtro para o transporte de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) e Leveduras inativadas para identificação utilizando o sistema MALDI-TOF MS, também compara a identificação de MNT diretamente da colônia bacteriana, após protocolo de extração proteico e após o transporte em papel filtro.

Artigo IV – Evaluation of filter paper to transport inactivated bacteria to detect carbapenem resistance genes by multiplex real-time PCR using high-resolution melting

Artigo publicado no “*Brazilian Journal of Microbiology*”.

Este capítulo é composto por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 67 – 72.

Carneiro, M. S., Crispim, M. N., Wink, P. L., & Barth, A. L. (2021). Evaluation of filter paper to transport inactivated bacteria to detect carbapenem resistance genes by multiplex real-time PCR using high-resolution melting. *Brazilian journal of microbiology*. [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 52(3), 1353–1356. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00530-2>

Manuscrito V – Evaluation of filter paper to transport oro/nasopharyngeal samples to detect SARS-CoV-2 by RT-qPCR

O texto completo do presente capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 73 – 82, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Nele consta a avaliação do papel filtro para o transporte de amostra de naso/orofaringe para a detecção de SARS-Cov-2 por qPCR. As amostras foram testadas em paralelo por dois protocolos: extração direta (método de referência) e extração após impregnação em papel filtro.

Manuscrito VI – A simple and rapid method to determine qualitative Polymyxin B susceptibility by MALDI-TOF MS

O texto completo do presente capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 83 – 96, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Nele consta a avaliação de um novo método para detectar a suscetibilidade a polimixina B de forma qualitativa através do MALDI-TOF MS. O MALDI-TOF Polimixina B Teste (MPT) foi realizado através da incubação bacteriana em dois meios de cultura líquidos, com e sem polimixina B; lavagem e extração de células bacterianas e análise qualitativa da identificação em MALDI-TOF MS.

Manuscrito VII – Evaluation of early reading of Broth Microdilution technique for Polymyxin B

O texto completo do presente capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 97 – 108, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Nele consta a avaliação da leitura antecipada da placa de microdiluição em caldo para polimixina B. Neste trabalho, foi realizada a comparação da leitura antecipada (8-9 horas) e da leitura padronizada (16-20 horas)

5 PATENTE DE INTERESSE

TÍTULO: MÉTODO E KIT PARA TRANSPORTE DE CÉLULAS BACTERIANAS INATIVADAS EM PAPEL FILTRO PARA ANÁLISE

O texto completo do presente capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 109 – 136, foi suprimido por tratar-se de patente de interesse ainda não aprovada. A presente invenção propõe uma forma inovadora de transportar bactéria inativada em papel filtro para análise em equipamento de MALDI-TOF MS e, portanto, facilitando o envio de amostras de laboratórios de pequeno porte que não dispõem dessa tecnologia para laboratórios de referência. A presente invenção emprega uma metodologia que tem revolucionado a forma de identificação microbiana, entretanto, a forma convencional de identificação através do MALDI-TOF MS requer crescimento bacteriano fresco em meio de cultura (elevado risco biológico), já nessa proposta a bactéria é transportada de forma inativada em papel filtro, dessa forma, apresenta facilidades, não só no transporte bacteriano, como também na logística, uma vez que a amostra inativada não requer medidas de biossegurança no transporte bacteriano, acarretando em diminuição do custo associado ao mesmo. A invenção permite o envio das amostras em envelope padrão e em temperatura ambiente, com alta estabilidade e sem prejuízo da qualidade de identificação bacteriana, dispensando a necessidade de medidas de contenção do risco biológico.

6. DISCUSSÃO GERAL

Em um cenário ideal, o tratamento com antimicrobianos deveria ser baseado na identificação e no perfil de suscetibilidade *in vitro* do agente causador do processo infeccioso (WHO 2015). Entretanto, para a identificação microbiana convencional são requeridos diversos testes que necessitam de, no mínimo, 16 h de incubação para que haja avaliação dos substratos e o microrganismo seja identificado. Além disso, deve ser considerado que os teste de identificação só podem ser feitos após a formação de colônias visíveis em meio de cultura o que necessita de no mínimo 12 h de incubação para *Enterobacterales* e Cocos Gram-positivos; 16 h para *Haemophilus* e BGNNF; 24h para leveduras e 48 h para micobactérias de crescimento rápido. Neste contexto, destaca-se uma das tecnologias mais modernas e revolucionárias de diagnóstico microbiológico que vem sendo utilizada em laboratórios de microbiologia e que reduz significativamente o tempo de identificação microbiana em comparação às técnicas da microbiologia convencional, o MALDI-TOF MS (OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021).

A resistência antimicrobiana (RA) é reconhecida como uma das maiores ameaças globais para a saúde humana, dificultando o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos (WHO 2014). Sendo as carbapenemases o principal e o mais preocupante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias. O padrão de referência para identificação e diferenciação dessas enzimas é baseado em técnicas moleculares, tais como qPCR HRM (SINGH et al., 2016).

O diagnóstico precoce de COVID-19 sempre foi uma medida fundamental na contenção da pandemia. Devido ao crescente aumento de casos, mesmo mais de dois anos após o início da pandemia, ainda existe a necessidade de ampliar a testagem. O principal teste laboratorial para a detecção do SARS-CoV-2 é o RT-qPCR (TORRES et al., 2021).

A maioria dos laboratórios brasileiros de pequena e média complexidade não possui equipamentos de MALDI-TOF MS, qPCR e RT-qPCR devido ao alto investimento para obter esses equipamentos. Essas instituições, quando não conseguem identificar os isolados bacterianos, carbapenemases ou SARS-Cov-2 acabam por enviar o microrganismo ou amostra biológica para outra instituição de maior complexidade que execute esses serviços. O transporte de microrganismos entre laboratórios ocorre, tradicionalmente, nas próprias placas/tubos de meios de cultivo ou em *swab* próprio para transporte. O transporte de material biológico para

detecção de SARS-Cov-2 ocorre no próprio Falcon onde foi realizada a coleta. Vale ressaltar que, todas essas formas de transporte apresentam alto risco biológico.

Diante do papel fundamental do laboratório na identificação microbiana, detecção de mecanismos de resistência e detecção de SARS-CoV-2 de forma rápida e acurada, fica clara a importância da adequação das técnicas tradicionais de envio de amostras microbianas, através do desenvolvimento de alternativas de transporte entre laboratórios. O nosso grupo de pesquisa propôs a utilização do papel filtro como meio de transporte de microrganismos inativados para análise em MALDI-TOF MS, qPCR HRM e RT-qPCR. Para a proposta de identificação de isolados por MALDI-TOF MS foram avaliados 363 microrganismos transportados em papel filtro. Esses microrganismos foram separados nos seguintes grupos: a) CGP e BGN comumente encontrados na rotina microbiológica; b) BGNNF e *Haemophilus influenzae*; c) MNT e leveduras. Para a proposta de detecção de carbapenemases por qPCR HRM foram avaliados 88 isolados de *Enterobacterales* transportados em papel de filtro, e, por fim, para a proposta de detecção de SARS-Cov-2 por RT-qPCR foram avaliados 40 espécimes respiratórios de oro/nasofaringe transportados em papel de filtro.

Demonstramos que o papel filtro pode ser empregado como meio de transporte para esses grupos de microrganismos e técnicas acima mencionadas, através da impregnação de biomassa microbiana/espécime respiratório, sem perda da qualidade de identificação de espécie/genes de resistência/SARS-Cov-2. Os discos de papel filtro impregnados passam por processo de inativação prévio ao transporte, o que confere redução do risco biológico, e consequentemente, esse meio de transporte pode ser considerado uma alternativa mais segura para o transporte dos microrganismos entre laboratórios. Além disso, o papel filtro requer volumes menores, ao passo que, confere maior tempo de conservação do analito. Os discos impregnados podem ser transportados em temperatura ambiente, em envelopes padronizados, reduzindo significativamente os custos relacionados ao frete e os custos institucionais de descarte de resíduos potencialmente infectantes. Este meio de transporte alternativo tende a facilitar o acesso às tecnologias supracitadas para muitos laboratórios que não possuem os equipamentos necessários para estas análises.

O rápido aumento na prevalência de ERC, notavelmente devido a carbapenemases, fez com que as polimixinas fossem amplamente utilizadas em infecções complicadas por BGN. Com o crescente uso dessa classe de antibióticos foi inevitável o surgimento de mecanismos de resistência a esses antimicrobianos. O teste de referência para determinação da suscetibilidade

às polimixinas é a microdiluição em caldo, porém esse método é considerado bastante demorado para a liberação do resultado (CLSI-EUCAST, 2016).

A demora para obtenção de resultados com a utilização dos métodos padrão de teste de suscetibilidade fenotípica é o principal obstáculo para um tratamento com antibióticos direcionado e/ou implementação de medidas de controle de infecção em tempo hábil (IDELEVICH; BECKER, 2019; MAGIORAKOS et al., 2017). Por esta razão, o Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST) (EUCAST, 2017), propôs um método rápido de teste fenotípico de sensibilidade antimicrobiana (RAST) baseado em disco difusão diretamente de frascos de hemocultura para vários antimicrobianos usados rotineiramente na clínica médica. De acordo com dados obtidos na literatura, nosso grupo de pesquisa evidenciou a carência de pesquisas avaliando a leitura antecipada de técnicas como a microdiluição em caldo.

No presente estudo, também foram avaliadas metodologias que facilitam a detecção da resistência às polimixinas na rotina laboratorial. Foram avaliados isolados de bacilos Gram-negativos frente à metodologia de leitura antecipada de microdiluição em caldo para polimixina B e também foi proposto um teste simples e rápido através do MALDI-TOF MS para detecção qualitativa de suscetibilidade às polimixinas, nomeado MALDI-TOF POLYMYXIN TEST (MPT).

Para avaliação da leitura antecipada da microdiluição em caldo para polimixina B comparamos a concentração inibitória mínima (CIM) de 192 isolados de BGN (*Enterobacterales*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*). obtida em 8-9h de incubação (leitura antecipada) e em 16-20h de incubação (leitura padronizada) da microdiuição em caldo para polimixina B.

A leitura antecipada da polimixina B apresentou resultados satisfatórios de concordância com os tempos de incubação padrão, foram observadas apenas 4 discrepâncias quando as leituras antecipadas foram comparadas às leituras padrão. Sabe-se que principais espécies de bactérias que necessitam de CIM para polimixina B, são da Ordem *Enterobacterales* ou não fermentadores como o *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, esses microrganismos são capazes de formar colônias visíveis em meio de cultura sólido em aproximadamente 16h, levando em conta que a taxa de multiplicação celular bacteriana em meio líquido é mais rápida, esses microrganismos podem apresentar crescimento em menor tempo, possibilitando a otimização do tempo de leitura da microdiluição em caldo para polimixina B.

A leitura antecipada da técnica de microdiluição em caldo para polimixina B fornece resultados confiáveis para bacilos gram negativos multirresistentes em 8-9 h de incubação e pode reduzir o tempo para liberar o resultado de suscetibilidade à polimixina B em 8 a 12 horas quando comparada com o tempo de leitura padrão. Portanto, a leitura antecipada possibilita que o laboratório de microbiologia clínica informe a CIM da Polimixina B no mesmo dia em que a bactéria é identificada e isso favoreceria o tratamento adequado do paciente. Além da diminuição do tempo de leitura, avaliamos a diminuição do número de diluições de polimixina B testadas na microplaca. A confecção de placas de microdiluição é laboriosa e demanda tempo, então a otimização de concentrações direcionadas à prática clínica leva a ganhos de praticidade sem perder a obtenção do valor de CIM. Conforme nosso conhecimento, na literatura não há outros estudos avaliando a leitura antecipada da microdiluição em caldo para compararmos com os nossos resultados.

As principais metodologias capazes de detectar resistência às polimixinas por MALDI-TOF MS estão relacionadas a modificações no lipídio A, entretanto, os métodos atuais de extração de lipídios exigem um tempo significativo de processamento e, portanto, podem não ser adequados para serem realizados na rotina de um laboratório de microbiologia. Além disso, podem ser necessários espectrômetros de massa que não são comumente encontrados em laboratórios de microbiologia clínica (operando em modo de íons negativos) (FURNISS et al., 2020; DORTET et al., 2020a; DORTET et al., 2020b; JEANNOT et al., 2021).

Está disponível um ensaio denominado MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA) (SPARBIER et al., 2016), o qual é um ensaio semiquantitativo que avalia o crescimento bacteriano após um curto período de incubação na presença e ausência de um antibiótico (LANGE et al., 2014). O MBT-ASTRA requer o uso de um controle (geralmente proteína RNase B) para permitir a normalização dos picos de proteína bacteriana. A área sob a curva (AUC) das bactérias incubadas com o antibiótico (AUC_{ATB}), calculada a partir dos picos das proteínas bacterianas, é comparada com a AUC das bactérias incubadas sem o antibiótico ($AUC_{controle}$). Uma redução significativa na relação $AUC_{ATB}/AUC_{controle}$ indica suscetibilidade. A metodologia MBT-ASTRA utiliza a taxa de crescimento para estabelecer a suscetibilidade do isolado independentemente de seu mecanismo de resistência e, portanto, pode ser usada para testar todas as classes de antibióticos. Os estudos que descrevem esta metodologia utilizam um software protótipo do pacote Bruker ou MALDIquant para software R para fornecer o resultado final da suscetibilidade dos isolados testados. O primeiro software não está disponível comercialmente e o último requer conhecimento de informática

para ser usado. No entanto, é possível realizar adaptações dessa metodologia para obtenção do perfil de suscetibilidade. Tais adaptações são baseadas na seleção manual de 3 picos específicos da bactéria na presença e ausência do antimicrobiano. Embora factível, essa adaptação requer grande manipulação de dados, tais como: transposição manual de valores relativos aos picos de massa/carga para planilhas, aplicação em fórmulas matemáticas, a fim de se obter o que é chamado de crescimento relativo (RG). O RG é estabelecido arbitrariamente por um valor capaz de separar os isolados sensíveis dos resistentes em comparação à técnica de referência (microdiluição em caldo).

O equipamento de MALDI-TOF MS apresenta alta sensibilidade e capacidade de identificar microrganismos mesmo na presença de pequenas quantidades de biomassa bacteriana (KOSTRZEWA; SCHUBERT, 2016); no presente trabalho, desenvolvemos um novo método qualitativo para testar a suscetibilidade à polimixina B. Para tal, foi estabelecido o inóculo bacteriano no qual uma bactéria sensível a polimixina B não pode ser identificada no sistema MALDI-TOF MS, a técnica foi otimizada para a determinação de suscetibilidade à polimixina B de forma qualitativa, apenas considerando presença ou ausência de crescimento bacteriano. Essa avaliação foi realizada através do programa padrão de identificação do equipamento. Esse teste é muito mais simplificado do que a técnica MBT-ASTRA adaptada, com menos possibilidade de erro, pois não requer manipulação de dados, é rápido e relevante na decisão terapêutica.

Descrivemos um novo teste de suscetibilidade à polimixina B (MPT) que apresentou alta concordância com a microdiluição em caldo; foi observado apenas 4 discrepâncias. Além disso, o MPT apresenta várias vantagens: (i) é rápido (requer apenas 3 horas de incubação); (ii) não requer solventes especiais; (iii) é de fácil execução; (iv) é confiável e (v) não depende de leitura pelo olho humano. Ademais, o teste MPT proposto neste estudo, foi realizado em um MALDI-TOF MS convencional e utiliza a mesma matriz orgânica padrão (HCCA) comumente utilizada em laboratórios de microbiologia clínica.

7 CONCLUSÕES GERAIS

A utilização do papel filtro como meio de transporte de isolados microbianos entre laboratórios favorece o acesso seguro a ferramentas de ponta para a identificação de microrganismos, detecção de mecanismos de resistência e SARS-Cov-2, auxiliando pequenos laboratórios que não dispõem de tais tecnologias. A realização de um antibiograma que forneça resultado sobre resistência ou suscetibilidade de isolados bacterianos em algumas horas trará enormes benefícios para a saúde dos pacientes. Ambas as linhas de pesquisa vêm ao encontro dos objetivos propostos pela Organização Mundial da Saúde e pela ANVISA para combater o aumento da resistência antimicrobiana.

De acordo com os objetivos deste estudo, podemos observar como conclusões gerais:

- O papel filtro pode ser utilizado como meio de transporte de CGP, bactérias da Ordem *Enterobacterales*, BGNNF, microrganismos fastidiosos como *Haemophilus* sp., MNT e leveduras para identificação utilizando o sistema MALDI TOF MS;
- O papel filtro pode ser utilizado como meio de transporte de bactérias da Ordem *Enterobacterales* para detecção de carbapenemases utilizando a tecnologia de qPCR HRM;
- O papel filtro pode ser utilizado como meio de transporte de espécimes respiratórios para detecção de SARS-Cov-2 por RT-qPCR;
- O papel filtro é uma forma alternativa e segura de transporte de microrganismos, pois transporta microrganismos previamente inativados, diferentemente do que ocorre tradicionalmente, onde o microrganismo é transportado na sua forma viável; O transporte de microrganismo inativado em papel filtro reduz/elimina o risco biológico inerente ao transporte, não necessitando de embalagem própria para amostras biológicas;
- O papel filtro reduz os custos relacionados ao frete para envio de isolados, assim como para o descarte de material biológico;
- A leitura antecipada da microdiluição em caldo para polimixina B demonstrou desempenho excelente quando comparada ao método de referência.
- O MPT apresentou ótima concordância categórica com a microdiluição em caldo para polimixina B;
- O MPT pode ser utilizado na rotina de laboratórios que já utilizem o MALDI-TOF MS para identificar microrganismos, para também determinar o perfil de suscetibilidade a polimixina B,

uma vez que esse teste é de fácil execução, barato e utiliza materiais comumente encontrados em laboratórios de microbiologia;

- É possível observar uma expressiva redução no tempo para obtenção do resultado de suscetibilidade à polimixina B utilizando ambas as metodologias.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. Z. et al. Candida identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 1437-1451, 2014.

ALCAIDE, F. et al. How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 599-603, 2018.

AXELSSON, C. et al. Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infectious diseases**, v. 52, n. 1, p. 45–53, 2020.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 16, n. 289(1036), p. 321-31, 1980.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.

ANTHWAL, D. et al. Development and evaluation of novel bio-safe filter paper-based kits for sputum microscopy and transport to directly detect *Mycobacterium tuberculosis* and associated drug resistance. **PloS one**, v. 14, n. 8, p. e0220967, 2019.

ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 6: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. 2012.

ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013 Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

ANVISA. RESOLUÇÃO - RDC Nº 20, de 10 de Abril de 2014. Ministério da Saúde, 2014.

BAKTHAVATCHALAM, Y. D.; VEERARAGHAVAN, B. Challenges, issues and warnings from CLSI and EUCAST working group on polymyxin susceptibility testing. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 11, n. 8, p. DL03, 2017.

BASSETTI, M. et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. **Intensive care medicine**, v. 43, n. 10, p. 1464-1475, 2017.

BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 12, p. 1686-1701, 2007.

BENEDICT, R. G.; LANGLYKKE, A. F. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. **Journal of bacteriology**, v. 54, n.24, 1947.

BIANCO, G. et al. RESIST-5 O.O.K.N.V and NG-Test Carba 5 assays for the rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* from positive blood cultures: a comparative study. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, n. 2, p. 162-166, 2020.

BONOMO, R. et al. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 8, p. 1290-1297, 2018.

BORA, P. et al. Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. **Journal of laboratory physicians**, v. 10, n. 4, p. 414, 2018.

BUSH K, JACOBY GA. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

BRUIN, J. et al. Identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 33, n. 2, p. 279-284, 2014.

CARNEIRO, M. et al. Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated bacteria for identification using the MALDI-TOF MS system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 171, p. 105863, 2020.

CHIU, S.-K. et al. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e69428, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th Edition. CLSI guideline M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

CLSI-EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf (acesso 21 de janeiro, 2022).

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One health—its importance in helping to better control antimicrobial resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 1, p. 22, 2019.

CONCEIÇÃO-NETO, O. et al. Difficulty in detecting low levels of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates: evaluation of Rapid Polymyxin NP test, Colispot Test and SuperPolymyxin medium. **New Microbes and New Infections**, v. 36, p. 100722, 2020.

CROXATTO, A. et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

D'ANGELO, R. G. et al. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 17, n. 7, p. 953-967, 2016.

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of MCR-1 and BLAKPC-2 genes in a clinical isolate of *Escherichia coli* from Brazil. **Clinical and biomedical research**, v. 72, p. n. 8, p. 2404–2406, 2017.

DALMOLIN, T. V. et al. Plasmid-mediated colistin resistance: what do we know. **Journal of Infection**, v. 1, p. 16-22, 2018.

DALMOLIN, T. V. et al. Low prevalence of the MCR-1 gene among carbapenemase producing clinical isolates of enterobacteriales. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.40, n. 2, p. 263-264, 2019a.

DALMOLIN, T. V. et al. Detection of *Enterobacteriales* resistant to polymyxins using rapid polymyxins NP test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 425– 428, 2019b.

DALMOLIN, T. V. et al. Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1135-1137, 2020a.

DALMOLIN, T. V. et al. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 96, n 1, p, 114910,2020b.

DE WAELE, J. J.; MARTIN-LOECHES, I. Optimal duration of antibiotic treatment in Gram-negative infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 606-611, 2018.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 74-84, 2015.

DORTET, L. et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3359-3367, 2018.

DORTET, L. et al. Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI- TOF MS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, p. 110– 116, 2020a.

DORTET, L. et al. Detection of Colistin Resistance in *Salmonella enterica* Using MALDIxin Test on the Routine MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometer. **Frontiers in microbiology**, n. 3, n. 11, p. 1141, 2020b.

ENOCH, D. et al. Non-fermentative Gram-negative bacteria. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, p. S33-S41, 2007.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST 2017: Version 7.1. 2017.

FIGUEROA-ESPINOSA, R. et al. MALDI-TOF MS based procedure to detect KPC-2 directly from positive blood culture bottles and colonies. **Journal of microbiological methods**, v. 159, p. 120-127, 2019.

FLORIO, W. et al. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1097, 2018.

FURNISS, R. C. D. et al. Detection of Colistin Resistance in *Escherichia coli* by Use of the MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometry System. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 57, e01427-19, 2019.

GALES, A. C. et al. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2001.

GERM, J. et al. Evaluation of resazurin- based rapid test to detect colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, n. 11, p. 2159– 2162, 2019.

GOMEZ, S. A. et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. **Clinical microbiology and infection**, v1 17, n. 10, p. 1520-1524, 2011.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

HAEILI, M. et al. Comparison of susceptibility testing methods for determining the activity of colistin against Gram-negative bacilli of clinical origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 60-66, 2019.

HRABÁK, J. et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3222-3227, 2011.

IDELEVICH, E. A. et al. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. **Clinical Microbiology Infection**, v. 24, n. 7, p. 738-743, 2018.

IDELEVICH, E.; BECKER, K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1347-1355, 2019.

JEANNOT, K. et al. Detection of Colistin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Using the MALDIxin Test on the Routine MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometer. **Frontiers in microbiology**, v. 31; n. 12, p. 725383, 2021.

JORDENS, J.; SLACK, M. *Haemophilus influenzae*: then and now. **European journal of clinical microbiology and infectious diseases**, v. 14, n. 11, p. 935-948, 1995.

JOUY, E. 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.

JUHÁSZ, E. et al. Uncommon non-fermenting Gram-negative rods as pathogens of lower respiratory tract infection. **Orvosi Hetilap**, v. 159, n. 1, p. 23-30, 2018.

JUNG, J. S. et al. Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2820-2824, 2016.

KANNAN, S. et al. Evolutionary analysis of the Delta and Delta Plus variants of the SARS-CoV-2 viruses. **Journal of Autoimmunity**, v. 124, 2021.

KELLEY, S. O. New technologies for rapid bacterial identification and antibiotic resistance profiling. **SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation**, v. 22, n. 2, p. 113-121, 2017.

KOH, W.-J. Nontuberculous mycobacteria—overview. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**, p. 653-661, 2017.

KOSTRZEWA, M.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology. **Caister Academic Press**, 2016. 1910190411.

LAMOTH, F. et al. Diagnostic approach of intracellular bacteria and fastidious microorganisms. **Revue medicale suisse**, v. 10, n. 450, p. 2130-2136, 2014.

LANGE, C. et al. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4155-4162, 2014.

LAU, A. F. et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 8, p. 2804-12, 2014.

LEE, C.-R. et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 895, 2016.

LESCAT, M. et al. Performances of the rapid polymyxin acinetobacter and pseudomonas tests for colistin susceptibility testing. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 520-523, 2019.

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

LÓPEZ, C. et al. Protein determinants of dissemination and host specificity of metallo- β -lactamases. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2019.

MAGIORAKOS, A. et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 113, 2017.

MALLI, E. et al. Implementation of the rapid polymyxin NP test directly to positive blood cultures bottles. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 4, p.114889, 2019.

MANCINI, S. et al. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP and β-CARBA® tests for rapid detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 88, n. 4, p. 293-297, 2017.

MATSUMURA, Y.; PITOUT, J. D. Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 16, n. 7, p. 783-794, 2016.

MAURER, F. P. et al. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. **Infectious disease reports**, v. 9, n. 1, p. 6839, 2017.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 521-547, 2018.

MELETIS, G.; SKOURA, L. Polymyxin resistance mechanisms: from intrinsic resistance to Mcr genes. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 13, n. 3, p. 198-206, 2018.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: Módulo V Detecção e identificação de bactérias de importância médica. ANVISA. Brasília 2000.

Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2019.

MOAT, S. J. et al. Performance of laboratory tests used to measure blood phenylalanine for the monitoring of patients with phenylketonuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 43, n. 2, p. 179-188, 2020.

MOFFATT, J. H. et al. Mechanisms of polymyxin resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 71, p. 1145-55, 2019.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906-909, 2012.

NAAS, T. et al. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. **Current drug targets**, v. 17, n. 9, p. 1006-1028, 2016.

NEPPELENBROEK, K. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, v. 20, n. 4, p. 329-344, 2014.

NEWMAN, M. et al. Evaluating urinary estrogen and progesterone metabolites using dried filter paper samples and gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **BMC chemistry**, v. 13, n. 1, p. 20, 2019.

NORDMANN, P. et al. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 5, p. 263-272, 2012a.

NORDMANN, P. et al. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1395-1399, 2016b.

NORDMANN, P. et al. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, 2016a.

NORDMANN, P. et al. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

NORDMANN, P. et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 9, p. 1503, 2012b.

NØRSKOV-LAURITSEN, N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 2, p. 214-240, 2014.

O'HARA, C. M. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 928-933, 2006.

OMBELET, S. et al. Clinical bacteriology in low-resource settings: today's solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. e248-e258, 2018.

OPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. **São Paulo: Sarvier**, 2004.

OVIANO, M., & RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 39, n. 4, p. 192–200, 2020.

PAVEZ, M. et al. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702-2702, 2009.

PEREZ, L. R. R. 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.

PILONETTO, M.; PILONETTO, D. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica. Curitiba: Microscience 1998.

POIREL, L. et al. P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 1, p. 119-123, 2011.

PROBAC. Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. **Available from:** <http://probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/POLICIMBAC%20Rev%2004.pdf>, 2018.

RASOLONJATOVO, F. S. et al. Enabling animal rabies diagnostic in low-access areas: Sensitivity and specificity of a molecular diagnostic test from cerebral tissue dried on filter paper. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008116, 2020.

REMMINGTON, A.; TURNER, C. E. The DNases of pathogenic Lancefield streptococci. **Microbiology**, v. 164, n. 3, p. 242-250, 2018.

RIGATTO, M. H. et al. Clinical Use of Polymyxin B. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1145, p. 197-218, 2019.

SANDER, J.; NIEHAUS, C. Rubella screening using the haemolysis-in-gel test from dried newborn blood on filter paper. **Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)**, v. 105, n. 23, p. 827-829, 1980.

SCHUBERT, S.; KOSTRZEWA, M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 23, p. 17-20, 2017.

SENG, P. et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1733-1754, 2010.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial resistance: an antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach. **Medical Clinics**, v. 102, n. 5, p. 819-829, 2018.

SINGH, P. et al. Multiplex real-time PCR assay for the detection of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase genes using melting curve analysis. **Journal of microbiological methods**, v. 124, p. 72-78, 2016.

SOFI, M. S.; HAMID, A.; BHAT, S. U. SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. **Biosafety and Health**, v. 2, n. 4, p. 217-225, 2020.

SON, S. K. et al. Clinical effectiveness of carbapenems versus alternative antibiotics for treating ESBL-producing *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2631-2642, 2018.

SORENSEN, M. et al. Rapid microbial identification and colistin resistance detection via MALDI-TOF MS using a novel on-target extraction of membrane lipids. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21536, 2020.

SPARBIER, K., SCHUBERT, S., KOSTRZEWA, M. MBT-ASTRA: a suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? **Methods**, v. 15, n. 104, p. 48-54, 2016.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, p. 38, 2017.

STORCHILO, H. R. et al. Basic heel prick test: inclusion of screening, diagnosis and criteria for early confirmation of congenital infection by *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, n. 61, p. e30, 2019.

THIRY, D. et al. Assessment of two selective agar media to isolate colistin-resistant bovine *Escherichia coli*: correlation with minimal inhibitory concentration and presence of *mcr* genes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 159, p. 174-178, 2019.

TORRES, A. et al. Comparison between RT-qPCR for SARS-CoV-2 and expanded triage in sputum of symptomatic and asymptomatic COVID-19 subjects in Ecuador. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 2021.

TRIMBLE, M. J. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.

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

VAN HOUT, D. et al. The added value of the selective SuperPolymyxin medium in detecting rectal carriage of Gram-negative bacteria with acquired colistin resistance in intensive care unit patients receiving selective digestive decontamination. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 2, p. 265-271, 2020.

VOLLAND, H. et al. Development and multicentric validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of MCR-1-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 57, p. e01454-18, 2019.

VOSSSEN, R. H. et al. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. **Human mutation**, v. 30, n. 6, p. 860-866, 2009.

WANG, G., SONG, G., XU, Y. A Rapid Antimicrobial Susceptibility Test for *Klebsiella pneumoniae* Using a Broth Micro-Dilution Combined with MALDI TOF MS. **Infection and Drug Resistance**, v. 14; n. 14, p. 1823-1831, 2021.

WATSON, J. D. et al. Biologia molecular do gene. **Artmed Editora**, 7ed, 2015.

WHISTLER, T. et al. Identification of Gram negative non-fermentative bacteria: How hard can it be? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007729, 2019.

WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014. 9241564741.

WHO. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso: 29 de janeiro de 2022.

WHO. Mendelson, Marc. Matsoso, Malebona Precious. The World Health Organization global action plan for antimicrobial resistance. **SAMJ: South African Medical Journal**, 105, n. 5, p. 325-325, 2015.

YUAN, F. et al. Global SNP analysis of 11,183 SARS-CoV-2 strains reveals high genetic diversity. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 6, p. 3288–3304, 2021.

ZAVASCKI, A. P. et al. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 12, p. 1333-1353, 2013.

ZAVASCKI, A. P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZAVASCKI, A. P.; NATION, R. L. Nephrotoxicity of polymyxins: is there any difference between colistimethate and polymyxin B? **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 3, 2017.

ZHONG, H. et al. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 21, p. 138-147, 2019.

ANEXOS

Anexo – 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FERRAMENTAS ALTERNATIVAS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA, DETERMINAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41738520.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.507.506

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto de doutorado do PPG em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. O papel do laboratório de microbiologia clínica é realizar a identificação do microrganismo, determinar o perfil de suscetibilidade e os mecanismos de resistência o mais breve possível. A microbiologia difere significativamente das demais áreas das análises clínicas, pois os processos são dependentes de crescimento microbiano, resultando em tempo maior para liberação de resultados. Tendo em vista que os processos de replicação microbiana

naturalmente demandam tempo, todas as ferramentas para otimização dos mesmos devem ser avaliadas. As metodologias que utilizam as técnicas baseadas em espectrometria de massas (técnica de MALDI-TOF) e em amplificação de material genético (técnica de qPCR HRM) são consideradas referência para a identificação microbiana e de enzimas que degradam antibióticos carbapenêmicos (carbapenemases), respectivamente. As técnicas acima requerem, no entanto, equipamentos os quais tem alto custo como investimento inicial, sendo acessíveis apenas para laboratórios de grande porte os quais trabalham com grande demanda de exames. Então um desafio importante é tornar possível que as vantagens dessas tecnologias possam ser utilizadas por laboratórios de pequeno porte. O uso de papel filtro para o transporte de amostras microbianas pode beneficiar significativamente o envio

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.507.508

de microrganismos entre laboratórios. Os testes de suscetibilidade também requerem tempo de incubação prolongados (aproximadamente 24h) para obtenção do perfil de suscetibilidade, tendo em vista, o surgimento de microrganismos multirresistentes se torna ainda mais importante a determinação do perfil de suscetibilidade e a pesquisa por abordagens que forneçam resultados confiáveis em tempos de incubação menores. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o papel filtro como meio de transporte de bactérias inativadas para identificação em MALDI-TOF MS e detecção de carbapenemases em qPCR HRM. Esse trabalho também objetiva avaliar a metodologia de MALDI-TOF MS para determinação qualitativa de suscetibilidade às polimixinas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Propor e avaliar novas metodologias de identificação e de detecção de mecanismos de resistência bacterianos e otimização de testes de determinação de suscetibilidade à polimixina B.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o papel filtro como meio de transporte de bactérias inativadas comumente isoladas na rotina microbiológica para identificação no sistema MALDI-TOF MS;
2. Avaliar o papel filtro como meio de transporte de bacilos Gram-negativos não fermentadores e microrganismos fastidiosos inativados para identificação no sistema MALDI-TOF MS;
3. Avaliar o papel filtro como meio de transporte de micobactérias e leveduras inativadas para identificação no sistema MALDI-TOF MS;
4. Avaliar a capacidade do papel filtro como meio de transporte de bactérias inativadas para análise de genes de resistências a carbapenêmicos através de qPCR HRM;
5. Avaliar o MALDI-TOF MS para determinação do perfil de suscetibilidade a polimixina B de forma qualitativa (presença ou ausência de crescimento bacteriano);
6. Comparar os resultados da técnica de microdiluição em caldo padrão com os resultados da avaliação qualitativa de suscetibilidade através do MALDI-TOF MS para polimixina B.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O papel filtro não se mostrar adequado para o transporte de biomassa bacteriana. A metodologia de MALDI TOF MS não ser adequada para fazer a avaliação de suscetibilidade à polimixina B de

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.507.506

forma qualitativa.

Benefícios:

Ampliar o acesso seguro a tecnologias de ponta para a identificação bacteriana e de genes de resistência através do envio de amostras microbianas impregnadas em papel filtro. Diminuição do risco biológico associado ao transporte de amostras microbianas, já que nessa proposta elas se estarão inativadas. Redução do tempo para obtenção do perfil de suscetibilidade à polimixina B de isolados multirresistentes. Produção de conhecimento científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa vai contribuir, testando se é viável a identificação de microrganismos a partir de isolados colocados em papel filtro como meio de transporte. Fornecerá ainda uma evidência para que laboratórios que não possuem metodologias avançadas e acesso a Espectrometria de massas, por exemplo, possam se beneficiar enviando amostras para outros centros agilizando o processo de diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estudo propõe dispensa de TCLE, pois as amostras são isolados dos microrganismos oriundos de um banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do HCPA.

Recomendações:

Lembramos que em razão da recente pandemia de COVID-19 as atividades de pesquisa possuem algumas restrições. Em caso de dúvidas, consultar o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) para mais informações (gppgcontingencia@hcpa.edu.br).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão de 05/01/2021 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

a) Este projeto está aprovado sem inclusão de participantes no Centro HCPA, considerando tratar-se de pesquisa em isolados bacterianos. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.507.506

- ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto está cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa (2020-0737) para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- d) Deverão ser adicionados relatórios semestrais e um relatório final do projeto no cadastro do mesmo, no Sistema AGHUse Pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|--|------------------------|----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1684677.pdf | 05/01/2021 12:34:08 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_DE_DOUTORADO_FERRAMENTAS_ÁLTERNATIVAS.docx | 05/01/2021 12:33:33 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | PlanodeRecrutamento_signed.pdf | 30/12/2020 14:10:24 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Funcoes_signed.pdf | 30/12/2020 14:10:03 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | protocolo.pdf | 30/12/2020 14:09:00 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |
| Orçamento | ORCAMENTO.docx | 30/12/2020 14:06:15 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |
| Cronograma | CRONOGRAMA.docx | 30/12/2020 14:04:04 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto_signed.pdf | 30/12/2020 14:01:59 | Maiara dos Santos Carneiro | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.507.506

PORTO ALEGRE, 22 de Janeiro de 2021

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Anexo – 2: Resumos publicados em congressos

CARNEIRO, M.S. ; WILHELM, C. M. ; WINK, P. L. ; BARTH, A. L. . Evaluation of early reading of Broth Microdilution technique for Polymyxin B. In: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021.

MOREIRA, N. K. ; WILHELM, C. M. ; **CARNEIRO, M.S.** ; WINK, P. L. ; BARTH, A.L. ; CAIERAO, J. . MALDI-TOF mass spectrometry for direct KPC detection in Enterobacterales. In: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021.

WILHELM, C. M. ; **CARNEIRO, M.S.** ; LOUREIRO, C. ; LEITE, C. M. ; FOGACA, C. P. ; SCHERNER, L. ; NESELLO, J. ; ALEXANDRIA, J. ; MARQUES, C. G. ; INAMINE, E. . Prevalence of *Candida* species identified by MALDI-TOF/MS from 2013 to 2019 in a hospital from south region of Brazil. In: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021.

CARNEIRO, M.S.; ECHEVARRIA, A. D. ; WILHELM, C. M. ; VOLPATO, F. Z. ; WINK, P. L. ; BARTH, A. L. . Early reading of the susceptibility test by Broth Microdilution for Polymyxin B: comparative analysis of visual reading with an automated (SpectraMax M3) microplate reader. In: 41ª SEMANA CIENTÍFICA DO HCPA, 2021, Porto Alegre. 41ª SEMANA CIENTÍFICA DO HCPA, 2021.

CARNEIRO, M.S.; VOLPATO, F. Z. ; WINK, P. L. ; BARTH, A.L. . EVALUATION OF FILTER PAPER TO TRANSPORT INACTIVATED RAPIDLY GROWING NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA FOR IDENTIFICATION USING THE MALDI-TOF MS SYSTEM. In: 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021, On-line. Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021.

CARNEIRO, M. ; CRISPIM, M. N. ; WILHELM, C. M. ; VOLPATO, F. ; BARTH, A. L. . EVALUATION OF FILTER PAPER AS A MEANS TO TRANSPORT INACTIVATED

GRAM NEGATIVE NON-FERMENTATIVE BACTERIA AND FASTIDIOUS MICROORGANISMS FOR IDENTIFICATION USING THE MALDI-TOF MS SYSTEM. In 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020, on-line. Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020.

WILHELM, C. M. ; **CARNEIRO, M. S.** ; BARTH, A. L. MEROPENEM HYDROLYSIS INDEX FOR DETECTING KPC AND NDM BY MALDI-TOF/MS. In: 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2020, Paris. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2020.

CARNEIRO, M. S. ; CRISPIM, M. N. ; WINK, P. L. ; ALMEIDA, E. K. ; BARTH, A. L. EVALUATION OF FILTER PAPER TO TRANSPORT BACTERIA FOR CARBAPENEMASE GENES DETECTION USING PCR BY HIGH MELTING RESOLUTION. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

AVILA, H. ; DALMOLIN, T. V. ; **CARNEIRO, M. S.** ; WINK, P. L. ; VOLPATO, F. C. Z. ; CASTRO, L. P. ; MORALES, D. L. ; BARTH, A. L. . AVALIAÇÃO DA VERSÃO ATUALIZADA DE TESTE COMERCIAL (POLICIMBAC®) PARA A DETECÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS. In: 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre, RS. 39ª Semana Científica do HCPA, 2019.

INAMINE, E. ; **CARNEIRO, M. S.** ; WINK, P. L. ; ASSIS, D. ; BARTH, A. L. . Evaluation of the rapid semi-quantitative approach for the determination of meropenem susceptibility in *Enterobacteriaceae* by rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF MS). In: 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2018, Madrid. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018.

CARNEIRO, M. S. ; FRACASSO, A.; LOUVISON, O. V. ; BARRETO, F. ; MARTINS, A. ; BARTH, A. L. EVALUATION OF FILTER PAPER TO TRANSPORT BACTERIA FOR MALDI-TOF/MS ANALYSIS. In: 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2018, São Paulo. 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2018.

CARNEIRO, M. S.; CRISPIM, M. N. ; BAETHEGEN, L. F. ; NUNES, L. S. ; BARTH, A. L. . SUSCEPTIBILITY TO IMPENEM OF CLINICAL ISOLATES OF *Mycobacterium abscessus complex*: COMPARISON OF BROTH MICRODILUTION AND ETEST. In: 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2018, São Paulo. 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2018.

CARNEIRO, M. S.; MORALES, D. L. ; NUNES, L. S. ; BARTH, A. L. ST 262: A new Sequence Type of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* in Porto Alegre, Brazil. In: 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - Medtrop 2018, 2018, Olinda. 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - Medtrop 2018, 2018.

CARNEIRO, M. S.; MORALES, D. L. ; CRISPIM, M. N. ; NUNES, L. S. ; BARTH, A. L. . ANALISYS OF RESISTOME OF *Mycobacterium abscessus* SUBSP. *massiliense* BY NEXT GENERATION SEQUENCING. In: 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2018, São Paulo. 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2018.

CARNEIRO, M. S.; DALMOLIN, T. ; MAGAGNIN, C. ; ZAVASCKI, A. ; BARTH, A. L. . TESTE NP PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM ENTEROBACTÉRIAS. In: XII Sul Encontro de Controle de Infecção, 2017, Gramado. Anais do XII Sul Encontro de Controle de Infecção, 2017.

Anexo – 3: Apresentações orais em congressos

CARNEIRO, M. ; CRISPIM, M. N. ; WILHELM, C. M. ; VOLPATO, F. ; BARTH, A. L. EVALUATION OF FILTER PAPER AS A MEANS TO TRANSPORT INACTIVATED GRAM NEGATIVE NON-FERMENTATIVE BACTERIA AND FASTIDIOUS MICROORGANISMS FOR IDENTIFICATION USING THE MALDI-TOF MS SYSTEM. In 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020, on-line. Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020.

CARNEIRO, M. S.; DALMOLIN, T. ; MAGAGNIN, C. ; ZAVASCKI, A. ; BARTH, A. L. . TESTE NP PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM ENTEROBACTÉRIAS. In: XII Sul Encontro de Controle de Infecção, 2017, Gramado. Anais do XII Sul Encontro de Controle de Infecção, 2017.

Anexo – 4: Trabalhos publicados em colaboração não relacionados ao projeto da tese

WILHELM, C. M.; FORNI, G. R.; **CARNEIRO, M. S.**; BARTH, A. L. Establishing a quantitative index of meropenem hydrolysis for the detection of KPC- and NDM-producing bacteria by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 187, p. 106268, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106268>

CARNEIRO, M. S.; MORALES, D. L.; CRISPIM, M. N.; NUNES, L. S.; BARTH, A. L. Novel mutations in the resistome of a new sequence type (ST262) of clarithromycin resistant *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 294-295, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.030>

DALMOLIN, T. V.; CASTRO, L. ; **CARNEIRO, M.** ; VOLPATO, F. Z. ; WINK, P. L. ; MORALES, D. L. ; BARTH, A. L. Evaluation of the susceptibility test of Polymyxin B using the commercial test Policimbac ®. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00246-9>