

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

Avaliação de metodologias alternativas para a detecção rápida e acurada de resistência às opções terapêuticas no tratamento de bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos

GABRIELA DA SILVA COLLAR

Porto Alegre, 2024

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

Avaliação de metodologias alternativas para a detecção rápida e acurada de resistência às opções terapêuticas no tratamento de bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos

Dissertação apresentada por **Gabriela da Silva Collar** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Juliana Caierão

Porto Alegre, 2024

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada dia 30 de Julho de 2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profª Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Instituto Oswaldo Cruz

Profª Dra. Andreza Francisco Martins
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Cezar Vinícius Würdig Riche
Universidade Luterana do Brasil

CIP - Catalogação na Publicação

Collar, Gabriela da Silva
Avaliação de metodologias alternativas para a
detecção rápida e acurada de resistência às opções
terapêuticas no tratamento de bacilos gram-negativos
resistentes aos carbapenêmicos / Gabriela da Silva
Collar. -- 2024.
92 f.
Orientadora: Juliana Caierão.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2024.

1. Resistência bacteriana. 2. Teste rápido. 3.
Enterobacterales. I. Caierão, Juliana, 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 Bacteriologia Clínica (LaBaC) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana (LABRESIS) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE/HCPA), com financiamento do Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana (INPRA – INCT/CNPq 465718/2014-0) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA – projeto 2023-0061).

A todos os pacientes que tiveram desfechos desfavoráveis devido a infecções causadas por bactérias multirresistentes, especialmente a Itamar de Oliveira Collar (“in memoriam”).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho:

Primeiramente, dedico meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora Juliana, pela orientação cuidadosa, pela imensa paciência e pelo incentivo ao longo deste processo. Agradeço pela parceria desde os primórdios do LaBaC, pelo aceite de cada ideia, às vezes maluca e sem fundamento, que saem da minha mente "pirulita". Além da orientação acadêmica, quero agradecer pelo suporte nos momentos de dificuldade não relacionados ao laboratório; teu apoio foi fundamental. Por fim, agradeço por ser meu exemplo; tua paixão pela pesquisa, pela docência e, principalmente, pela bacteriologia, serve como inspiração.

Agradeço também ao Professor Afonso, colaborador fundamental deste projeto. Além da colaboração, agradeço pelas oportunidades de participação na disciplina de bacteriologia clínica e pelo compartilhamento de tuas experiências e histórias. Obrigado também por ser um grande exemplo de professor e pesquisador.

Agradeço às integrantes do LaBaC: à Júlia, aluna de iniciação científica, pela imensa ajuda na realização dos experimentos, por ser meu vórtex e por me permitir plantar a sementinha do amor por testes colorimétricos. Às minhas fiéis escudeiras bacteriológicas, Natália e Luana, obrigada por serem tanto. Além da parceria na pesquisa, pela ajuda nos experimentos e até mesmo pela hora da pausa pro café, obrigada por serem minha dose de ansiolítico diária e por dividirem tantos momentos memoráveis. Vocês deixaram minha trajetória mais alegre. Agradeço também à Mariana, por toda ajuda, pela separação das amostras no HCPA, pelo incentivo e motivação.

Aos meus amigos, Ana, Elis, Juliana, Leonardo, Luiza e Sara: vocês foram fundamentais durante toda minha trajetória acadêmica, desde o primeiro dia de graduação. Vocês foram minha muleta emocional nos momentos em que achei que não ia mais conseguir; minha eterna gratidão.

Por fim, o maior agradecimento aos meus pais, Sandra e Itamar, por permitirem que eu chegasse até aqui. Não existem palavras que possam expressar tamanha gratidão. Devo tudo a vocês.

Muito obrigada.

“Um especialista é alguém que cometeu todos os erros possíveis numa determinada área”.

Niels Bohr

RESUMO

Infecções causadas por bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (BGN-RC) frequentemente resultam em desfechos desfavoráveis, incluindo falhas no tratamento, internação prolongada, aumento dos custos hospitalares e maior mortalidade. A combinação aztreonam/ceftazidima-avibactam e as polimixinas são opções terapêuticas essenciais para o tratamento de infecções por BGN-RC, especialmente em casos de isolados produtores de metalo-beta-lactamases, associadas ou não a serina-carbapenemases. A administração precoce e eficaz da antibioticoterapia está associada a melhor prognóstico em casos graves. No entanto, a demora para obtenção de resultados a partir de testes de suscetibilidade baseados em metodologias convencionais têm dificultado a escolha inicial de antimicrobianos, aumentando o risco de terapia empírica ineficaz. Para enfrentar esse desafio, foram propostas e avaliadas neste estudo duas técnicas de diagnóstico rápido: a “Aztreonam/ceftazidime-avibactam microelution” (mATM/CZA) e a “Rapid Colorimetric Polymyxin B microelution” (RCPEm). mATM/CZA utiliza a eluição do conteúdo do disco de antibiótico e o indicador resazurina para detectar resistência ao aztreonam (ATM), à ceftazidima-avibactam (CZA) e à combinação ATM/CZA em Enterobacterales. Por sua vez, o RCPEm permite a detecção da resistência à polimixina B a partir de frascos de hemoculturas positivas para Enterobacterales, utilizando solução NP, onde um disco de polimixina B é previamente eluído. O crescimento bacteriano é detectado por alteração colorimétrica. Ambas as metodologias, mATM/CZA e RCPEm, fornecem resultados em até 4h. No geral, mATM/CZA demonstrou excelente desempenho, com especificidade de 98,1% e sensibilidade de 100% na avaliação da suscetibilidade à combinação ATM/CZA. Para RCPEm, a especificidade foi de 99,1% e a sensibilidade, de 94,1%. Metodologias rápidas, como mATM/CZA e RCPEm, representam avanços cruciais no diagnóstico e tratamento de infecções graves causadas por BGN-RC. A implementação dessas metodologias nos laboratórios clínicos pode não só influenciar de forma positiva os desfechos clínicos de pacientes com infecções graves, mas também contribuir significativamente para o uso otimizado de antimicrobianos, alinhando-se às necessidades atuais de saúde pública no combate à resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Diagnóstico rápido, aztreonam/ceftazidima-avibactam, polimixina B, hemoculturas, bacilos gram-negativos.

ABSTRACT

Infections caused by carbapenem-resistant gram-negative bacilli (CR-GN) often lead to unfavorable outcomes, including treatment failures, prolonged hospitalization, increased healthcare costs and increased mortality. The combination of aztreonam/ceftazidime-avibactam and polymyxins are essential therapeutic options for treating CR-GN infections, particularly in cases involving isolates producing metallo-beta-lactamases, with or without serino-carbapenemases. Early and effective administration of antibiotic therapy is associated with improved prognosis in severe cases. However, delays in obtaining results from susceptibility testing based on conventional methodologies have compromised the initial choice of antibiotics, increasing the risk of ineffective empirical therapy. To address this challenge, two rapid methodologies were proposed and evaluated in this study: Aztreonam/ceftazidime-avibactam microelution (mATM/CZA) and Rapid Colorimetric Polymyxin B microelution (RCPEm). mATM/CZA utilizes antibiotic disk elution and the indicator resazurin to detect resistance to aztreonam (ATM), ceftazidime-avibactam (CZA), and the ATM/CZA combination in Enterobacterales. Meanwhile, RCPEm enables detection of polymyxin B resistance from positive blood culture bottles for Enterobacterales using NP solution, where a polymyxin B disk is pre-eluted. Bacterial growth is detected by colorimetric alteration. Both methodologies, mATM/CZA and RCPEm, provide results within 4h. Overall, mATM/CZA demonstrated excellent performance with a specificity of 98.1% and sensitivity of 100% in evaluating susceptibility to ATM/CZA. For RCPEm, specificity was 99.1%, and sensitivity was 94.1%. Rapid methodologies such as mATM/CZA and RCPEm represent crucial advancements in the diagnosis and treatment of severe infections caused by CR-GN. Implementing these methodologies in clinical laboratories can not only positively influence clinical outcomes for patients with severe infections but also significantly contribute to rational and optimized use of antibiotics, aligning with current public health needs in combating antimicrobial resistance.

Keywords: Rapid diagnosis, aztreonam/ceftazidime-avibactam, polymyxin B, blood cultures, gram-negative bacilli.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	REVISÃO DO TEMA	23
4	ARTIGOS	41
4.1	Artigo 1	41
4.2	Artigo 2	51
5	DISCUSSÃO GERAL	63
6	CONCLUSÃO GERAL	67
	REFERÊNCIAS	69
	TRABALHOS E ATIVIDADES COMPLEMENTARES NA VIGÊNCIA DO MESTRADO	83
	Detecção rápida de resistência à polimixina B em bacilos gram-negativos não-fermentadores da glicose	83
	Detecção rápida e fenotípica de enzimas carbapenemases	83
	Participação em outros estudos publicados	83
	Publicação de resumos em anais de eventos	84

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos (RAM) é um problema de saúde pública mundial e tem sido reconhecida como um dos maiores desafios atuais da medicina (O'NEILL, 2014). Dentre outros fatores, a emergência e disseminação de bactérias multirresistentes está associada ao uso, por vezes inadequado e/ou exagerado, de antimicrobianos na medicina humana, na agricultura, na pecuária e na indústria (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes tendem a estar mais frequentemente relacionadas à falha terapêutica, ao aumento nos custos, à hospitalização prolongada e à maior mortalidade (ZHEN et al., 2020). Nesse contexto, sabe-se que a implementação precoce de antibioticoterapia eficaz relaciona-se a melhores desfechos em pacientes com infecções graves (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et al., 2017; LUO et al., 2023).

As terapias empíricas são baseadas na utilização de um ou mais antimicrobianos de amplo espectro, possivelmente eficazes contra os agentes etiológicos epidemiologicamente mais prováveis nas infecções, sem o respaldo de resultados de testes de suscetibilidade "in vitro". Entretanto, o aumento da RAM têm tornado a seleção inicial de antimicrobianos desafiadora, culminando em maiores taxas de terapia empírica inapropriada (CARRARA et al., 2018; KADRI et al., 2021).

Além da escolha adequada do antibiótico, o início precoce da sua administração, conforme mencionado, tem impacto na mortalidade dos pacientes com infecções graves. De fato, foi demonstrado que a administração da terapia antimicrobiana adequada dentro de 24h após a coleta da hemocultura relaciona-se a taxas de mortalidade inferiores a 30%, comparado a 37,4% e 57,1% quando a administração é feita entre 24-48h e 48-72h, respectivamente (FALCONE et al., 2020). É digno de nota que, segundo "guidelines" de sepse, após a identificação de possível choque séptico, é recomendada a administração imediata de antimicrobianos, de preferência dentro de 1h após seu reconhecimento (EVANS et al., 2021).

Assim, tanto para guiar a escolha de antimicrobianos eficazes, quanto para oportunizar uma terapia precoce adequada (sem uso excessivo de antibioticoterapia de amplo espectro), metodologias que detectem de forma rápida e acurada a suscetibilidade das bactérias aos antimicrobianos são essenciais. De fato, resultados obtidos a partir de técnicas classicamente utilizadas, tais como disco-difusão ou

microdiluição em caldo (“broth microdilution” – BMD), que exigem longos períodos de incubação (16-20h), têm menor impacto nas decisões clínicas iniciais

Dentre os objetivos do plano de ação global sobre resistência antimicrobiana, da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2015), a otimização e aceleração dos procedimentos diagnósticos, principalmente para as bactérias consideradas uma ameaça para saúde humana, são vitais, consonante com políticas de “stewardship” (MESSACAR et al., 2017; RUIZ-RAMOS et al., 2023).

Nesse contexto, bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (BGN-RC) ganham notoriedade, pela reconhecida dificuldade em estabelecer terapia antimicrobiana eficaz e a consequente associação frequente destas bactérias com infecções de maior mortalidade (ZHEN et al., 2020). Essa resistência pode ocorrer devido a diferentes mecanismos, sendo a produção de carbapenemases o de maior relevância clínica (NORDMANN; POIREL, 2019).

Ceftazidima-avibactam (CZA) é uma alternativa terapêutica para BGN-RC. Trata-se de uma combinação de beta-lactâmico com inibidor de beta-lactamase, o qual inibe carbapenemases de classes A de Ambler (como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC), mas não metalo-beta-lactamases (MBL), enzimas da classe B de Ambler (por exemplo, “New Delhi metallo-beta-lactamase” – NDM) (MOREIRA; CAIERÃO, 2021).

Entretanto, especialmente no contexto pós pandemia de COVID-19, a emergência e disseminação de isolados produtores de MBL e/ou coprodutores (classes A e B), têm restringido ainda mais as opções terapêuticas (ESTABROOK et al., 2023; FACCONI et al., 2023; KIFFER et al., 2023). Carbapenemases de classe B inativam todos os beta-lactâmicos, exceto aztreonam (ATM). No entanto, bactérias produtoras de MBL frequentemente produzem outras beta-lactamases, tais como beta-lactamases de espectro estendido (“extended-spectrum beta-lactamase” - ESBL) ou AmpC, as quais inativam ATM. Assim, a combinação aztreonam-avibactam (AZA) surge como uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por estas bactérias, já que avibactam é um inibidor de beta-lactamases, com excelente atividade contra enzimas das classes A (incluindo ESBL) e classe C (AmpC). Esta combinação ainda não está licenciada para uso clínico. Enquanto sua comercialização não é legalizada, a associação “in vivo” de ATM com CZA (ATM/CZA) têm sido fortemente

recomendada (FALCONE et al., 2021; LI et al., 2024; MAURI et al., 2021; ZENG et al., 2023).

Idealmente, o uso da combinação deveria ser orientado por resultados de testes de suscetibilidade “in vitro”. Porém, atualmente, não existem metodologias rápidas e de fácil execução para este fim. Métodos que avaliam tal sinergismo, tais como “checkerboard”, curvas de “time-kill” e cruzamento de tiras de gradiente de concentração de antimicrobianos são metodologicamente complexas e/ou exigem incubação prolongada, reduzindo o impacto clínico dos seus resultados (DOERN, 2014; HARRIS et al., 2023; KHAN et al., 2021; LIMA et al., 2022).

Devido à ineficácia da maioria das combinações de beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases para o tratamento de infecções causadas por isolados produtores de MBL ou coprodutores de carbapenemases das classes A e B, e, também, à indisponibilidade destas combinações em alguns países (ou, quando disponível, seu elevado custo), os regimes terapêuticos centrados nas polimixinas continuam a ser uma opção essencial em muitas regiões, incluindo o Brasil (TSUJI et al., 2019).

Embora as taxas de resistência às polimixinas permaneçam baixas em alguns países, há um aumento sustentado em outros, coincidindo com o aumento na frequência de isolamento de BGN-RC (LATIFI et al., 2023; LI et al., 2019; SILVA et al., 2022; SULAYYIM et al., 2022). Assim, a detecção rápida e precisa desta resistência é relevante, principalmente em situações de infecções graves, como bacteremias (TJANDRA et al., 2022). Apesar disso, para resultados de suscetibilidade através da metodologia de referência são necessárias, pelo menos, 36h após a positividade da hemocultura, o que, por óbvio, reduz o impacto clínico deste resultado.

Para reverter este cenário, têm sido descritos testes rápidos para a detecção da resistência às polimixinas, como o teste “Rapid Polymyxin NP” (RPNP), avaliado a partir de colônias isoladas em meios de cultura sólidos e, também, diretamente de frascos de hemoculturas positivas, com bons resultados (JAYOL et al., 2016; NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016). No entanto, a metodologia possui algumas desvantagens, tais como o uso do antibiótico em pó, o que confere um custo maior para o teste, além da necessidade do preparo de soluções, podendo levar a erros técnicos.

Recentemente, foi proposta a metodologia “Rapid Colorimetric Polymyxin B Microelution” (RCPEm), que é realizada através da eluição de disco de polimixina B

em solução contendo glicose e indicador de pH, com posterior aliquotagem em placa de microtitulação (COLLAR et al., 2023). A técnica tem a capacidade de detectar a resistência de forma rápida, acurada, e com ótimo custo-benefício para os laboratórios. A avaliação da utilização desta metodologia diretamente de frascos de hemoculturas positivas é desejada, já que tem potencial de reduzir ainda mais seu “turnaround time”.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a performance de metodologias alternativas para a determinação da suscetibilidade à combinação ATM/CZA e à polimixina B em BGN-RC recuperados de espécimes clínicos.

2.2 Objetivos Específicos

(a) Avaliar a performance de uma metodologia rápida para determinação do sinergismo entre ATM e CZA em BGN-RC;

(b) Avaliar a performance do teste RCPEm na determinação da suscetibilidade à polimixina B a partir de frascos de hemocultura positivos com Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos.

3 REVISÃO DO TEMA

Os bacilos gram-negativos (BGN) são responsáveis pela maioria dos casos de infecções bacterianas relacionadas aos cuidados com a saúde, tais como pneumonia associada à ventilação mecânica, infecção da corrente sanguínea relacionada ou não a cateteres, dentre outras. As principais bactérias gram-negativas causadoras destas complicações são Enterobacterales e BGN não-fermentadores da glicose, tais como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020).

Os BGN possuem um envelope celular composto por três camadas distintas. A camada mais interna é a membrana citoplasmática, uma bicamada fosfolipídica que desempenha funções estruturais, biossintéticas e de transporte. A segunda camada, a parede celular, é um exoesqueleto rígido de peptidoglicano que determina o formato celular e protege contra o dano osmótico. A terceira camada, exclusiva dos BGN, é a membrana externa, que oferece proteção e contém fosfolipídios no folheto externo, além de proteínas de membrana, como porinas e outros canais que permitem a passagem de pequenas moléculas. A membrana externa é a principal responsável pela resistência intrínseca dos BGNs a uma ampla gama de antimicrobianos, já que a maioria dessas drogas precisaria atravessar essa barreira protetora para atingir seus alvos, limitando sua eficácia (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

Desde a sua descoberta, os antimicrobianos tornaram-se essenciais para a medicina humana. Dentre eles, merecem notoriedade a classe dos beta-lactâmicos, pelo grande número de antimicrobianos disponíveis, mas, principalmente, pela sua segurança e eficácia no tratamento de infecções. Eles são subdivididos em quatro subclasses químicas: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Os carbapenêmicos, assim como os demais beta-lactâmicos, atuam como agentes bactericidas, inibindo a síntese da parede celular bacteriana através da ligação às proteínas ligadoras de penicilina (“penicilin-binding proteins” – PBPs). Devido a uma diferença estrutural em relação aos demais beta-lactâmicos, os carbapenêmicos possuem maior potência, espectro de atividade e estabilidade frente à hidrólise por beta-lactamases, sendo considerados, historicamente, os antimicrobianos mais ativos contra BGN multirresistentes, e portanto, utilizados como

terapia empírica em pacientes com infecções graves (DOI, 2019; EL-GAMAL et al., 2017).

No entanto, a resistência aos carbapenêmicos em BGN clinicamente relevantes tem emergido e disseminado com notável intensidade nas últimas décadas, representando um desafio significativo para as instituições de saúde em âmbito global. Este fenômeno é agravado pela escassez de agentes terapêuticos seguros e eficazes, pelas altas taxas de mortalidade associadas às infecções por essas bactérias, e pela consequente elevação dos custos para as instituições de saúde. Estudos indicam que pacientes infectados ou colonizados por esses microrganismos apresentam maior carga clínica e econômica em comparação àqueles infectados ou colonizados por bactérias sensíveis aos carbapenêmicos. Economicamente, a infecção por patógenos resistentes demanda maior utilização de recursos devido aos piores desfechos clínicos observados. Fatores como prolongamento da doença, necessidade de testes diagnósticos adicionais, internações prolongadas e uso de medicamentos mais caros contribuem para o aumento substancial da carga econômica das infecções causadas por essas bactérias resistentes aos carbapenêmicos (JEAN; HARNOD; HSUEH, 2022; POUDEL et al., 2023; ZHEN et al., 2020).

Em relação à mortalidade, uma meta-análise que avaliou o impacto das infecções por patógenos resistentes aos antimicrobianos revelou que pacientes com tais infecções apresentam um risco 84,4% maior de óbito em comparação àqueles com infecções causadas por bactérias sensíveis aos antimicrobianos, além de uma probabilidade de readmissão hospitalar 49,2% maior (POUDEL et al., 2023). Esses achados corroboram a crescente preocupação com a carga clínica e econômica associada às infecções por patógenos resistentes aos antimicrobianos e reiteram a necessidade urgente do desenvolvimento/implementação de estratégias eficazes para combater a RAM.

Dados apresentados pelo relatório global do sistema de vigilância de uso e resistência antimicrobiana (“Global antimicrobial resistance and use surveillance system” - GLASS) evidenciam o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Como exemplo, de acordo com a série histórica referente à *K. pneumoniae* isolada de infecções da corrente sanguínea, a resistência ao meropenem aumentou de 10,6% em 2017 para 11,9% em 2021. Similarmente, ao avaliar os dados

para *Acinetobacter* spp., também recuperados de bacteremias, as taxas de resistência ao meropenem elevaram-se de 73,1% em 2017 para 77,3% em 2021 (WHO, 2022). Considerando a mortalidade, um estudo que avaliou a carga global da resistência antimicrobiana em 2019 atribuiu diretamente 243.000 mortes à resistência aos carbapenêmicos, das quais 38.000 foram de pacientes com infecções por *P. aeruginosa*, 55.700 por *K. pneumoniae* e 57.700 por *A. baumannii* (MURRAY et al., 2022). Do mesmo modo, em estudo semelhante focado nas Américas, foi demonstrado que 114.000 mortes foram associadas à resistência aos carbapenêmicos, com 22.400 mortes diretamente atribuídas a esse fenótipo em 2019 (AGUILAR et al., 2023).

A ameaça à saúde pública global causada por BGN-RC é tão significativa que, em 2017, foi estabelecida pela OMS a primeira lista de bactérias prioritárias, para as quais novos antimicrobianos eram urgentemente necessários. No topo dessa lista, na categoria crítica, estavam *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos, *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e a família *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos (WHO, 2017). Desde a publicação, novos antimicrobianos com atividade contra os patógenos prioritários foram desenvolvidos, embora isolados resistentes a virtualmente todos esses novos compostos já tenham sido relatados. Como a RAM é uma ameaça em constante evolução, a lista de prioridades foi atualizada em maio de 2024, reordenando a classificação de acordo, principalmente, com a eficácia dos tratamentos existentes para esses patógenos. Atualmente, como prioridades críticas estão Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de terceira geração, e *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (WHO, 2024).

A resistência aos carbapenêmicos está associada a mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Essencialmente, os mecanismos não enzimáticos envolvem a limitação do influxo dos antimicrobianos para o interior da célula, seja através da perda/modificação da expressão de genes que codificam porinas, e/ou superexpressão de genes codificadores de bombas de efluxo. Já os mecanismos enzimáticos estão relacionados com a destruição irreversível dos antimicrobianos, através de hidrólise do anel beta-lactâmico, por diferentes enzimas (GAUBA; RAHMAN, 2023; NORDMANN; POIREL, 2019).

O mecanismo chave de resistência aos carbapenêmicos é a produção de enzimas carbapenemases, que são uma família de beta-lactamases conhecidas por sua alta versatilidade hidrolítica, visto que degradam virtualmente todos os beta-lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). A classificação das beta-lactamases baseia-se em características funcionais das enzimas ou na sua estrutura primária. A classificação mais simples, e também mais utilizada, é a proposta por Ambler, que categoriza as enzimas em 4 grupos (A, B, C e D), considerando a estrutura molecular, com base em sequências de aminoácidos conservados (AMBLER, 1980). Por outro lado, a classificação funcional atualizada considera as preferências de substrato e os respectivos inibidores enzimáticos, organizando as beta-lactamases em subgrupos (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Dentre as 4 classes de Ambler, as carbapenemases pertencem a 3 delas: A, B e D. Carbapenemases de classe A têm como substrato penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. A hidrólise por essas enzimas ocorre através do aminoácido serina na posição 70 do sítio catalítico, que medeia um ataque nucleofílico ao grupo carbonila do anel beta-lactâmico do carbapenêmico, e, por isso, são também denominadas serina-beta-lactamases. Além disso, carbapenemases de classe A são eficientemente inibidas por inibidores de beta-lactamases, tais como avibactam, relebactam e vaborbactam (PHILIPPON et al., 2016; VÁZQUEZ-UCHA et al., 2020). Fazem parte desse grupo enzimas como GES (“Guiana extended spectrum”) e KPC, sendo esta última considerada a mais relevante da classe, uma vez que é amplamente disseminada horizontalmente através de plasmídeos e codificada por genes carregados por diversas espécies de BGN-RC. Esta importância também é reflexo da sua grande relevância clínica, por estar associada a valores de concentração inibitória mínima (CIM) elevados para os beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos (HUSSEIN et al., 2022; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020).

As MBL, carbapenemases de classe B, são um grupo único de beta-lactamases tanto estrutural quanto funcionalmente, diferindo de outras carbapenemases pela necessidade de um ou dois íons de zinco no sítio ativo da enzima para a realização da hidrólise do anel beta-lactâmico. Apesar do amplo espectro de substratos para catálise, as MBL não são capazes de hidrolisar monobactâmicos. Devido à necessidade de zinco, estas enzimas são inativadas por quelantes metálicos, como

ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido dipicolínico (BUSH; JACOBY, 2010; PALZKILL, 2013).

Inicialmente, as carbapenemases da classe B não foram consideradas um sério problema, uma vez que eram codificadas por genes cromossômicos e encontradas em organismos não-patogênicos. Contudo, o cenário se modificou na década de 1990, quando MBL do tipo IMP (Imipenemase) e VIM (“Verona Integron-encoded metallo-beta-lactamase”) disseminaram-se em patógenos gram-negativos, como bactérias da ordem Enterobacterales, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, dessa vez em elementos horizontalmente transferíveis (BUSH; JACOBY, 2010; PALZKILL, 2013). Assim, enzimas da classe B ganharam devida notoriedade, o que foi significativamente reforçado pela detecção e caracterização da enzima NDM, no ano de 2009. Isso porque, em contrastaste com outras MBL, a NDM disseminou-se rapidamente por todo o mundo, devido, dentre outros motivos, à “promiscuidade” dos genes *bla*_{NDM}, passíveis de serem carreados por uma vasta gama de elementos genéticos móveis (BUSH, 2018; BUSH; BRADFORD, 2020; YONG et al., 2009).

Dentro da classe D de beta-lactamases, estão as oxacilinasas (OXA) e apenas algumas destas têm papel funcional como carbapenemase. Sendo cada vez mais prevalente, a OXA-48 e suas variantes (OXA-48-*like*) são umas das principais representantes da classe. Carbapenemases do tipo OXA possuem atividade hidrolítica de alto nível para penicilinas e hidrólise de baixo nível contra carbapenêmicos, e são pouco inibidas por inibidores de beta-lactamases, com exceção do avibactam. Durante muito tempo, quase todos os relatos de isolados produtores de OXA-48 foram provenientes de pacientes epidemiologicamente associados à Turquia. Atualmente, no entanto, esta enzima é mais prevalente em grande parte da Europa Ocidental, além de serem endêmicas no Oriente Médio não-Mediterrâneo (BOYD et al., 2022; BUSH; BRADFORD, 2020; MAIRI et al., 2018; POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

No Brasil, a partir de 2015, a enzima KPC se disseminou e tornou-se endêmica, assim como em outros países da América Latina. É digno de nota, no entanto, que um estudo retrospectivo que avaliou isolados bacterianos coletados entre 2015 e 2022 observou uma redução no percentual de bactérias carregando o gene *bla*_{KPC} entre Enterobacterales, com taxas de detecção decaindo de 74,5% em 2015 para 55,1%

em 2022. Em contrapartida, observou-se um aumento na detecção do gene *bla*_{NDM}, de 4,1% em 2015 para 39,4% em 2022, sendo que o aumento foi mais relevante a partir de 2017 (KIFFER et al., 2023; SAMPAIO; GALES, 2016).

Para a detecção de carbapenemases estão disponíveis métodos fenotípicos e genotípicos. A implementação do teste de detecção ideal depende de fatores como o conhecimento da epidemiologia local, o desempenho do teste diagnóstico, o “expertise” necessário, o tempo de resposta do teste e o custo (LUTGRING; LIMBAGO, 2016).

A maioria das técnicas genotípicas é baseada na reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction” - PCR), podendo ser seguida de sequenciamento (BONOMO et al., 2018; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; ROOD; LI, 2017). Embora estes testes sejam considerados padrão-ouro, eles não são realizados rotineiramente pela maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, porque, dentre outros motivos, possuem alto custo. Além disso, a reação de PCR não é capaz de detectar novas enzimas/variantes, uma vez que o alvo tem que ser conhecido.

Nesse contexto, é habitual que laboratórios clínicos implementem métodos fenotípicos para detectar isolados produtores de carbapenemases. Atualmente, existe uma grande quantidade de métodos para este fim, com diferentes abordagens, tempos de resposta e performances (TAMMA et al., 2017). Essas metodologias podem ser classificadas da seguinte forma: (i) ensaios que detectam a resistência baseado no crescimento do isolado na presença do antibiótico (e, em alguns casos, de inibidores enzimáticos específicos), tais como o teste de disco combinado e método de inativação de carbapenêmico; (ii) detecção direta das enzimas carbapenemases, como os ensaios imunocromatográficos e a detecção direta da enzima KPC por espectrometria de massa; e (iii) métodos que detectam a hidrólise do anel beta-lactâmicos pela alteração colorimétrica resultante da variação de pH, como o teste de Carba NP e suas variantes (BONOMO et al., 2018; LUTGRING; LIMBAGO, 2016; TAMMA; SIMNER, 2018).

A detecção de isolados produtores de carbapenemases é fundamental por diversos motivos, destacando-se o manejo de pacientes para controle de infecção, a

monitorização para fins epidemiológicos e a orientação do tratamento. De fato, a identificação do mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é crucial no contexto da utilização clínica das novas combinações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases, especialmente quando realizada de forma rápida, pois pode prever, ao menos parcialmente, a suscetibilidade a algumas dessas combinações, acelerando a administração da terapia apropriada para os pacientes (EVANS et al., 2021; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Aprovada para uso clínico pelo “Food and Drug Administration” (FDA) em 2015, CZA foi a primeira combinação de nova geração de beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases liberada para uso clínico e aumentou significativamente a capacidade de tratar infecções causadas por BGN-RC. Esta combinação une a ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração, com o avibactam, um inibidor de beta-lactamase não beta-lactâmico, com capacidade de inibir enzimas das classes A, C e algumas da classe D. Atualmente, CZA, aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2018, é reservado principalmente para o tratamento de infecções graves causadas por BGN produtores de carbapenemases do tipo KPC, tornando-se uma importante opção de primeira linha (FALCONE; PATERSON, 2016; MOREIRA; CAIERÃO, 2021).

Pouco após sua introdução, foi relatado o primeiro isolado resistente à CZA, e, desde então, outros episódios de colonização ou infecção por bactérias resistentes têm sido documentados, embora as taxas gerais de resistência permaneçam baixas (APPEL et al., 2020; MOREIRA; CAIERÃO, 2021; NICHOLS et al., 2023; STONE; PONCE-DE-LEON, 2020; STONE; SEIFERT; NORD, 2020; WANG et al., 2024). A resistência à CZA é comumente devida à presença de MBL, uma vez que o avibactam não inibe enzimas da classe B. Entretanto, mutações em beta-lactamases de classe A e classe C também estão relacionadas ao perfil não suscetível dos isolados. Além disso, alterações de permeabilidade de membrana, como diminuição da expressão e/ou mutação em genes de porinas, associadas com superexpressão de bombas de efluxo, podem culminar em aumento de CIM para CZA (DI BELLA et al., 2021; MOREIRA; CAIERÃO, 2021; SHIRLEY, 2018).

Conforme mencionado anteriormente, no contexto brasileiro tem sido observado um aumento na incidência de isolados produtores de MBL, especialmente

NDM. Além disso, um aumento na ocorrência de isolados carreando determinantes genéticos para mais de uma enzima carbapenemase tem sido evidenciado, especialmente durante e após a pandemia de COVID-19 (ESTABROOK et al., 2023; FACCONI et al., 2023). De fato, na América Latina, os relatos de isolados com múltiplas carbapenemases eram esporádicos antes da pandemia; contudo, a situação modificou significativamente após o seu início. No Brasil, por exemplo, a detecção concomitante de genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* passou de 2% antes da pandemia para 4,7% durante a pandemia (THOMAS et al., 2022). Esta situação alarmante levou à publicação de um alerta epidemiológico pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) em outubro de 2021 (PAHO, 2021).

Assim, a emergência e disseminação de isolados produtores de MBL e/ou coprodutores de MBL e KPC, restringe ainda mais um arsenal terapêutico já escasso. Embora o monobactâmico ATM seja estável frente à hidrólise por MBL, seu uso isolado é contraindicado devido à presença maciça de outros mecanismos de resistência concomitantes nestas bactérias, tais como AmpC, ESBL ou outras serina-carbapenemases. A estratégia utilizada para superar essa resistência tem sido a combinação de ATM com o avibactam, resultando na associação AZA, que demonstrou excelentes resultados “in vitro” contra isolados de BGN-RC (MAURI et al., 2021; SADER et al., 2023).

Embora reconhecida como uma opção terapêutica promissora, AZA ainda não recebeu aprovação para comercialização. No aguardo da liberação para uso clínico pelas agências reguladoras, a utilização clínica de ATM/CZA tem ganhado destaque, consolidando-se como uma alternativa eficaz para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de MBL (FALCONE et al., 2021; PAUL et al., 2022; SEMPERE et al., 2022; SREE et al., 2024; TAMMA et al., 2021; ZENG et al., 2023).

Sempre que possível, é preferível que a terapia clínica possa ser guiada por resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. No caso de ATM/CZA, são desejáveis metodologias que possam avaliar o sinergismo “in vitro” dos compostos, determinando se o efeito dos dois antimicrobianos combinados é superior à soma de suas atividades individuais (ZENG et al., 2023). Em suma, ao combinar compostos, pode haver uma ação aditiva, onde não há ganho de atividade, ou uma ação sinérgica, na qual a atividade combinada é maior do que a soma das atividades

dos antimicrobianos quando utilizados isoladamente. Além disso, os testes de sinergia são capazes de identificar combinações antagônicas (DOERN, 2014). Segundo Doern, existem três métodos principais para avaliação de sinergismo “in vitro”:

- (i) Método de “Checkerboard”: Este método avalia a atividade da combinação antimicrobiana testada em concentrações clinicamente alcançáveis, utilizando diluições seriadas de duas vezes. Os resultados são analisados através do índice de concentração inibitória fracionária (“fractional inhibitory concentration index” - FICI). O FICI é calculado comparando-se o valor da CIM de cada agente isoladamente com a CIM derivada da combinação. Combinações que resultam em uma redução de 4 vezes na CIM em comparação com as CIM dos agentes isolados são consideradas sinérgicas ($FICI \leq 0,5$). FICI na faixa de 0,5 a 1,0 estão associados a efeito aditivo ou não sinérgico, enquanto valores entre 1 e 4 são definidos como indiferentes. Valores superiores a 4 são considerados antagônicos (DOERN, 2014; KUAI et al., 2023; ZHOU et al., 2020);
- (ii) Ensaio de “Time-Kill” (“time-kill assay” - TKA): Este método é derivado do teste de concentração bactericida mínima e estabelece a concentração de antimicrobiano necessária para matar 99,9% de um inóculo após 24h de exposição. O diferencial do TKA é a avaliação da atividade antibiótica ao longo do tempo. A sinergia no TKA é definida como um aumento de $> 2 \log_{10}$ na redução da contagem bacteriana quando comparado a combinação antimicrobiana em relação ao constituinte mais ativo isolado (DOERN, 2014; KUAI et al., 2023); e
- (iii) Sinergia por tiras de gradiente de concentração dos antimicrobianos: Para avaliar a sinergia através desta metodologia, foram realizadas modificações no procedimento original, resultando em duas variações. Na primeira, duas tiras, cada uma representando um dos antimicrobianos da combinação, são colocadas perpendicularmente entre si, cruzando-se na CIM de cada antimicrobiano quando testado isoladamente. O cálculo do FICI é utilizado como critério de interpretação. Na segunda variação, a primeira tira do antimicrobiano é colocada no ágar inoculado com o isolado a ser testado. Após 60 minutos, a primeira tira é removida e a tira do segundo antimicrobiano é colocada no mesmo local. A sinergia é definida como uma

diminuição de ≥ 3 diluições na CIM, enquanto o efeito aditivo é caracterizado por uma diminuição de ≥ 2 diluições (DOERN, 2014; SEMPERE et al., 2022).

Apesar de possuírem suas vantagens específicas, as metodologias para a detecção do sinergismo “in vitro” descritas são complexas, trabalhosas, exigem incubação prolongada e podem ser de difícil interpretação (ZENG et al., 2023). Em função disso, várias técnicas menos dispendiosas, baseadas no uso de discos, têm sido descritas e avaliadas para a análise do sinergismo entre ATM e CZA. Entre essas técnicas destacam-se:

- (i) Empilhamento de discos: Simultaneamente, o disco de ATM é colocado sobre o disco de CZA previamente posicionado no ágar inoculado. Após 16-20h de incubação, o diâmetro da zona de inibição é medido e interpretado de acordo com os critérios estabelecidos para o ATM (BAKTHAVATCHALAM; WALIA; VEERARAGHAVAN, 2022; KHAN et al., 2021); e
- (ii) Eluição de disco: Discos de ATM, CZA e ATM+CZA são adicionados a tubos contendo caldo de cultura estéril para eluição dos seus conteúdos. Após 30 minutos, uma suspensão bacteriana padronizada é adicionada aos tubos. Após incubação de 16-20h, a leitura é feita com base na presença ou ausência de turvação nos tubos (BAKTHAVATCHALAM; WALIA; VEERARAGHAVAN, 2022; KHAN et al., 2021).

Além dessas metodologias, inúmeras outras foram descritas, seja utilizando discos de antibiótico e tiras de gradiente de concentração, ou utilizando tecnologias como a de espectrometria de massa (LIU et al., 2023; MARSHALL et al., 2017; WENZLER et al., 2017; WILHELM et al., 2023).

Ressalta-se que, mesmo antes de sua comercialização, a diminuição da suscetibilidade à combinação AZA já foi relatada. Ela foi identificada em um isolado de *Escherichia coli* produtora de NDM e o decréscimo da suscetibilidade foi atribuído, pelo menos em parte, a uma inserção no gene codificador da PBP3, comprometendo a ação do ATM (ALM; JOHNSTONE; LAHIRI, 2015). Além disso, certas variantes da cefalosporinase CMY, como a CMY-42, que é uma variante da CMY-2, quando em

combinação com a PBP3 alterada, podem conferir alto nível de resistência ao AZA em *E. coli* (MA et al., 2020). A documentação destes fenótipos de resistência reitera a importância de testes que avaliem a suscetibilidade “in vitro” dos isolados à combinação.

Apesar dos relatos esporádicos de resistência, ATM/CZA é considerado atualmente um dos regimes preferidos para o tratamento de Enterobacterales produtores de MBL (TAN et al., 2021). Entretanto, um dos principais limitadores do seu uso é o custo elevado. Mesmo após alguns anos de comercialização, o preço de CZA permanece extremamente alto, limitando sua disponibilidade em muitos países. Foi demonstrado que, em um horizonte de 5 anos, o custo incremental de um tratamento baseado em CZA pode ser superior a US\$ 47.000,00, quando comparado a outros, tornando-o financeiramente insustentável para uso sistemático no Brasil e, provavelmente, em muitos outros países de média e baixa renda (SIMON et al., 2019).

Portanto, quando a utilização de ATM/CZA não é viável, outros agentes antibacterianos são necessários para o manejo de infecções causadas por isolados produtores de MBL. Nesses casos, terapias combinadas centradas nas polimixinas têm, ainda, papel primordial (PAUL et al., 2022; SOMAN et al., 2021; ZENG et al., 2023).

As polimixinas, polimixina B e colistina (polimixina E) foram aprovadas para uso na medicina humana no final da década de 1950, porém foram rapidamente substituídas, na década de 1970, por antimicrobianos mais seguros, uma vez que apresentam elevado potencial neuro e nefrotóxico. Desde então, seu uso ficou bastante limitado, restringindo-se ao uso oftálmico e tópico (NANG et al., 2021; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

As polimixinas são antibióticos polipeptídicos catiônicos constituídos por um heptapeptídeo cíclico e uma cadeia lateral tripeptídica com uma cauda de ácido graxo. Devido à sua natureza catiônica, as polimixinas possuem carga positiva e se ligam aos grupos fosfato, carregados negativamente, do lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS). Essa interação provoca o deslocamento dos cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), que normalmente se ligam ao LPS para manter a estabilidade da membrana externa, resultando em sua desestabilização, permitindo que a porção hidrofóbica do

antibiótico se insira na membrana externa, o que compromete ainda mais sua estrutura e possibilita o acesso à membrana citoplasmática, que também é desestabilizada, levando à lise celular (LI; VELKOV, 2019; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Este mecanismo de ação único, além de proporcionar rápida atividade bactericida, pode aumentar a atividade de outras classes de antimicrobianos, que acabou levando ao seu ressurgimento. Em meados da década de 1990, as polimixinas ressurgem como opção terapêutica para o tratamento de BGN multirresistente e extensivamente resistentes, essencialmente em combinação com outros antimicrobianos. Assim, assumindo um importante papel como terapia de resgate para infecções por essas bactérias, majoritariamente BGN-RC, independentemente dos mecanismos de resistência subjacentes (SOMAN et al., 2021; TSUJI et al., 2019).

Como consequência lógica da evolução, a pressão seletiva resultante desse uso, que se tornou maciço ao longo dos anos (refletindo a disseminação de BGN-RC) culminou na emergência de isolados resistentes (LUO et al., 2024; YUSOF et al., 2022). A resistência às polimixinas é resultante de alterações no lipídio A do LPS. Essas alterações reduzem a carga negativa dos grupos fosfato, o que diminui a interação eletrostática entre o antibiótico e seu sítio de ligação. As principais modificações no LPS incluem a adição de fosfoetanolamina (pETN) ou de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N). De fato, certos microrganismos, como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Serratia* spp., apresentam resistência intrínseca às polimixinas devido à expressão constitutiva do operon *arnBCADTEF* (ou *pmrHFIJKLM*) e/ou do gene *eptB*, que promovem a adição de pETN e/ou L-Ara4N ao lipídio A (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

A resistência adquirida a esses antibióticos está associada a mutações em genes que (i) codificam enzimas modificadoras do LPS (operon *pmrCAB*), (ii) sintetizam o grupo L-Ara4N e o fixam no LPS (*pmrHFIJKLM* e *pmrE*), (iii) codificam sistemas de dois componentes que regulam a expressão de *pmrHFIJKLM*, *pmrCAB* e *pmrE* (operon *phoPQ*, operon *crrAB*, *pmrA* e *pmrB*) e/ou (iv) regulam a expressão dos sistemas de dois componentes (*mgrB*) (NANG et al., 2021; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Inicialmente e historicamente, a resistência às polimixinas foi associada a mecanismos cromossômicos e, portanto,

sem possibilidade de transferência horizontal. Entretanto, em 2015, Liu e colaboradores identificaram o gene *mcr-1*, mediado por plasmídeos, que codifica uma fosfoetanolamina transferase, responsável por alterações pós-tradução no lipídio A (LIU et al., 2016).

Embora as taxas de resistência às polimixinas permaneçam baixas em alguns países, há um aumento constante em outros, coincidindo com o aumento na frequência de isolamento de BGN-RC. Por exemplo, na China, após o início de uso de polimixinas em 2018 para o tratamento de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, houve um aumento nas taxas de resistência de 3,6% em 2020 para 10,1% na primeira metade de 2023 (LUO et al., 2024). No Irã, uma meta-análise demonstrou que as taxas de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* elevaram-se de 4,8% em 2013-2018 para 8,2% em 2019-2021. No mesmo estudo foi observado maior percentual dessa resistência entre isolados produtores de carbapenemases (31,7%) em comparação com isolados sensíveis aos carbapenêmicos (6,9%) (NARIMISA; GOODARZI; BAVARI, 2022).

No Brasil, a situação é semelhante. Nos últimos anos, o aumento do isolamento de BGN-RC, causado principalmente pela disseminação de KPC, também levou ao aumento da resistência às polimixinas, como foi observado em estudo realizado na cidade de São Paulo, onde, de 2011 a 2015, houve um aumento de 27,1% nessa resistência (BARTOLLETTI et al., 2016). É digno de nota que, como consequência do elevado consumo de polimixinas durante a pandemia de COVID-19 (aumento de 204% no uso de polimixina B), as taxas de resistência em *K. pneumoniae* ultrapassaram, em algumas regiões, 40% (MASSARINE et al., 2023).

Diante do exposto, há uma iminente necessidade de vigilância epidemiológica para compreender e, eventualmente, reduzir a disseminação de microrganismos resistentes. Nesse contexto, o laboratório de bacteriologia clínica reveste-se de particular importância, já que a rápida e acurada identificação da resistência às polimixinas é imprescindível.

Por diversos motivos, a determinação da suscetibilidade “in vitro” às polimixinas é desafiadora. Entre os métodos tradicionais, o disco-difusão é amplamente utilizado devido à sua simplicidade e baixo custo. No entanto, não se aplica para a

determinação da suscetibilidade às polimixinas, visto que a difusão lenta e fraca das moléculas através do ágar resulta em zonas de inibição pequenas e inconsistentes. Estudos demonstram altas taxas de falsa-suscetibilidade (“very major errors” – VME), assim como baixo nível de reprodutibilidade em comparação aos resultados obtidos pela BMD, fazendo com que o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) e o “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) não recomendem técnicas baseadas na difusão do antimicrobiano (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2019; NANG et al., 2021; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

A diluição em ágar é outro método clássico que, apesar de evitar a adsorção das polimixinas às superfícies plásticas em decorrência da sua carga e de não exigir difusão no ágar, é considerado muito trabalhoso e, por isso, raramente utilizado em laboratórios clínicos. Estudos realizados com essa metodologia demonstram boa reprodutibilidade. Entretanto, CIMs mais elevadas em comparação à BMD limitam sua aceitação, o que pode ser atribuído à diferentes concentrações de cátions presentes no ágar (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2019; RARO et al., 2021; TURLEJ-ROGACKA et al., 2018).

A BMD é o método de referência para a determinação das CIMs de antimicrobianos, incluindo polimixinas. Recomendado pelo CLSI e pelo EUCAST, este método utiliza caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (“cation-adjusted Mueller-Hinton” - CA-MHB), sais de polimixinas (sulfato de colistina ou sulfato de polimixina B) e placas simples de poliestireno sem aditivos (EUCAST, 2016). Entretanto, os desafios técnicos persistem, como a adsorção das polimixinas às placas plásticas, que podem levar a CIMs subestimadas do antibiótico. A adição de surfactantes, como o polissorbato 80, limita esta adsorção, mas não é recomendada devido a possíveis efeitos sinérgicos e atividade antibacteriana própria (EUCAST, 2016; EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2019; NANG et al., 2021; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). No entanto, uma das maiores desvantagem da técnica é o tempo necessário para a liberação dos resultados. De fato, após o crescimento “in vitro” do microrganismo, são necessárias 16-20h para a determinação da CIM.

Para superar essas limitações dos métodos tradicionais, novas metodologias têm sido propostas. Nordmann e colaboradores descreveram um teste fenotípico rápido, o RPNP. Ele detecta a resistência às polimixinas em até 4h, com base no

metabolismo da glicose pelos microrganismos na presença de uma concentração definida de antibiótico e um indicador de pH (solução NP). O RPNP é considerado tecnicamente muito simples e rápido. Os autores relataram uma sensibilidade de 99,3% e uma especificidade de 95,4% em um estudo com 200 Enterobacterales, das quais 5 apresentavam resistência intrínseca, 130 resistência adquirida, e 65 eram sensíveis às polimixinas (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016). A partir da primeira publicação, diversos outros pesquisadores avaliaram a performance do teste, encontrando sensibilidade igual ou superior a 90% e especificidade variando de 82% a 100% (BELDA-ORLOWSKI et al., 2019; COLLAR et al., 2021; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2020; DALMOLIN et al., 2019; GERM et al., 2021; SHOAIIB et al., 2020). Contudo, apesar das vantagens e do bom desempenho, RPNP não é endossado pelos comitês de padronização CLSI e EUCAST. Além disso, a metodologia requer o uso do antimicrobiano em pó, o que eleva os custos do teste e demanda a preparação de soluções, introduzindo uma etapa adicional suscetível a erros técnicos.

Com outra abordagem metodológica, Simner e colaboradores apresentaram o “Colistin Broth Disk Elution” (CBDE) para detecção de resistência à colistina (SIMNER et al., 2019). Apesar de ter sido relatada pela primeira vez há cerca de meio século atrás, a metodologia foi adaptada para o uso com colistina em 2019, sendo logo em seguida recomendada pelo CLSI para determinação laboratorial de resistência à colistina, após avaliação multicêntrica realizada por Humphries e colaboradores (HUMPHRIES et al., 2019).

O método consiste na eluição do conteúdo do disco de colistina em CA-MHB, atingindo diferentes concentrações nos tubos, conforme o número de discos adicionados. Após um período à temperatura ambiente para permitir a eluição, a bactéria é inoculada no caldo e incubada. O crescimento bacteriano, indicado pela turvação do meio, determina a resistência da bactéria àquela concentração específica do antimicrobiano (SIMNER et al., 2019). Além dos estudos iniciais, até o momento e salvo engano, poucos autores avaliaram a metodologia, principalmente se considerar o uso de polimixina B ao invés de colistina; entretanto, bons resultados foram demonstrados (CIELO et al., 2020; FÓLDES et al., 2022; SARIKAYA et al., 2022; SHINOHARA et al., 2022). A principal vantagem do CBDE é o uso de discos de antimicrobiano em detrimento ao pó, o que reduz significativamente os custos do

teste. No entanto, uma desvantagem notável é a necessidade de uma incubação tão prolongada quanto a BMD, de 16-20h.

Recentemente, em 2023, Collar e colaboradores apresentaram o método RCPEm, como uma maneira eficiente e econômica de detectar a resistência à polimixina B. Basicamente, a solução NP, que contém glicose e um indicador de pH (vermelho de fenol), é utilizada para eluir o disco de polimixina B. E em uma placa de microtitulação, a solução contendo o antibiótico eluído é misturada a um inóculo bacteriano padronizado. Isolados resistentes crescem na presença de polimixina B metabolizando a glicose e resultando em uma mudança de cor (de vermelho/laranja para amarelo). O RCPEm oferece resultados em até 4h após a geração de colônias em meio sólido, com uma sensibilidade de 97,8% e especificidade de 99,4% (COLLAR et al., 2023). Além das metodologias aqui descritas para detecção de resistência às polimixinas, várias outras tem sido propostas e avaliadas por diversos pesquisadores (ABDUL MOMIN et al., 2017; PASTERAN et al., 2020; SADEK et al., 2020; SORENSEN et al., 2020).

A rapidez na determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pode ter impacto significativo nos desfechos das infecções e nos índices de mortalidade dos pacientes, especialmente naqueles com infecções graves, como bacteremias (KADRI et al., 2021). Nesse contexto, metodologias que, embora rápidas, dependam do crescimento bacteriano em meio sólido, são inaceitavelmente lentas para esses casos específicos, pois acrescentam, pelo menos, cerca de 16-20h para a obtenção dos resultados. Diante das necessidades atuais, novas metodologias estão sendo avaliadas para a detecção rápida de resistência às polimixinas, utilizando o conteúdo dos frascos de hemoculturas positivas como inóculo, visando um ganho substancial de tempo. Algumas delas serão descritas a seguir.

Nesse sentido, Jayol e colaboradores avaliaram a performance do RPNP diretamente de 73 frascos de hemoculturas positivas com Enterobacterales, com o objetivo de eliminar a etapa de cultivo “in vitro” do microrganismo, reduzindo ainda mais o tempo necessário para obtenção dos resultados. À exceção de um isolado de *E. coli* com CIM de 8 µg/ml para colistina, que apresentou resultado negativo, houve completa concordância entre o teste RPNP e a BMD (JAYOL et al., 2016). Além da boa performance, o teste demonstrou ser de fácil execução, já que não requer

subcultivo ou centrifugação do conteúdo da hemocultura positiva, fornecendo resultados após 4h de incubação.

Em 2019, Fonseca e colaboradores avaliaram um método rápido de citometria de fluxo (FASTinov) para determinar a suscetibilidade à colistina diretamente de 204 frascos de hemocultura positivos (137 com Enterobacterales, 35 com *Pseudomonas* spp. e 32 com *A. baumannii*). A metodologia apresentou concordância categórica de 99,0%, levando até 2h para fornecer os resultados através do software BioFAST (FONSECA E SILVA et al., 2019). Diferentemente de RPNP, FASTinov necessita uma etapa de extração dos microrganismos previamente à realização da incubação e análise em citômetro.

Baseado na tecnologia de espectrometria de massa por MALDI-TOF (“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight”), Barth e colaboradores adaptaram ensaio de crescimento direto de microgotas no alvo (“Direct-on-target microdroplet growth assay” - DOT-MGA) para avaliação de 117 hemoculturas positivas para BGN-RC. O DOT-MGA adaptado mostrou-se uma técnica confiável para avaliar a suscetibilidade às polimixinas em laboratórios equipados com MALDI-TOF, com 100% de concordância categórica na população testada (BARTH et al., 2022).

Dentre as vantagens da detecção rápida da resistência aos antimicrobianos, ressaltam-se aquelas que promovem a proteção da saúde pública, tais como a redução do uso inadequado de antimicrobianos e o fornecimento de informações para a implementação de medidas de controle de infecção. Além disso, são relatados benefícios diretamente ligados aos desfechos dos pacientes com infecções graves, tais como a redução da mortalidade, do tempo de internação hospitalar, entre outros. Portanto, o desenvolvimento e a avaliação de novas metodologias, que preencham as lacunas deixadas pelas existentes, para a rápida caracterização da resistência “in vitro” aos antimicrobianos são essenciais para avançar tanto no combate à RAM, quanto na medicina clínica, visando o bem individual de cada paciente.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1

Artigo publicado no periódico “Diagnostic Microbiology & Infectious Disease”.
Esse documento responde ao objetivo (a).

O Item 4.1 é constituído por artigo científico publicado (doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116236), que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 42 – 49.

4.2 Artigo 2

Artigo publicado no periódico “European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases”. Esse documento responde ao objetivo (b).

O Item 4.2 é constituído por artigo científico publicado (doi: 10.1007/s10096-024-04846-3), que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 52 – 62.

5 DISCUSSÃO GERAL

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são um princípio fundamental para o tratamento de pacientes com doenças infecciosas, para o desenvolvimento de novas drogas, para a vigilância epidemiológica e para saúde pública. Os métodos fenotípicos utilizados rotineiramente em laboratórios de microbiologia clínica, no melhor dos cenários, demandam cerca de 36h para fornecer resultados após o processamento da amostra. Esse atraso pode prolongar o uso de terapia empírica não direcionada, que, quando excessivamente utilizada, contribui para o desenvolvimento e expansão da RAM. Por outro lado, este tempo demasiadamente longo para liberação de resultados pode aumentar o tempo de uso de terapias ineficazes, aumentando o risco de mortalidade em pacientes com infecções graves (CELIK et al., 2023; LAMY; SUNDQVIST; IDELEVICH, 2020; WENZLER et al., 2023).

Em suma, a utilização de testes rápidos para detecção de resistência bacteriana é capaz de diminuir o tempo para a administração de uma terapia antimicrobiana eficaz e ideal, melhorando concomitantemente os resultados dos pacientes, as estratégias de controle de infecção e o uso de antimicrobianos. Diante disso, o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico rápido é imprescindível.

São várias as metodologias descritas para determinação de sinergismo entre ATM/CZA. Entretanto, atualmente não existe uma de baixo custo, rápida e de fácil execução para esse fim. A maior parte das técnicas descritas são metodologicamente complexas e muitas vezes de difícil interpretação, tornando inconcebível sua implementação na rotina de laboratórios clínicos. Além disso, tais técnicas são inaceitavelmente demoradas, fazendo com que seus resultados tenham impacto clínico reduzido.

Frente a estas problemáticas, a mATM/CZA apresenta-se como uma alternativa viável, rápida e barata para avaliação do sinergismo entre ATM/CZA em Enterobacterales, assim como para a semi-quantificação de CIM para ATM e CZA.

mATM/CZA foi padronizada após o teste de diferentes inóculos e tempos de incubação, sendo que os melhores resultados foram alcançados utilizando-se inóculo de 0,5 de McFarland diluído em solução salina na proporção 1:10, e com tempo de incubação prévia à resazurina de 3h. Devido a questões inerentes à viragem do

revelador, não foi possível padronizar a metodologia para *P. aeruginosa*, pois foram observadas mudanças consistentes de coloração somente após 8h de incubação.

Ao avaliar a suscetibilidade à CZA, a mATM/CZA demonstrou sensibilidade de 95% na população estudada, decorrente da correta categorização de 38 das 40 Enterobacterales resistentes. Entre os isolados suscetíveis, 12 dos 15 apresentaram resultados negativos no teste, resultando em 80% de especificidade. Acredita-se que a baixa especificidade do teste esteja relacionada à concentração de CZA utilizada (6/4 µg/ml), que faz com que isolados com CIMs limítrofes, como a maioria dos que apresentaram resultados falso-positivo (8 µg/ml), sejam erroneamente categorizados.

Em relação ao ATM, todos os isolados foram corretamente categorizados como resistentes ou suscetíveis, gerando 100% de sensibilidade e especificidade. Para a combinação ATM/CZA, a mATM/CZA demonstrou 98,1% de especificidade devido a um isolado do complexo *K. pneumoniae* que apresentou resultado falso-positivo no teste; contudo, foi alcançada 100% de sensibilidade.

Entre as limitações do estudo, algumas características da população avaliada podem ser citadas, como a baixa variabilidade de espécies, dado que 88,4% dos isolados eram do complexo *K. pneumoniae*. No entanto, considerando os isolados produtores de carbapenemases, especialmente aqueles elegíveis para tratamento com a combinação ATM/CZA, a população estudada reflete a epidemiologia local. Outro ponto a ser destacado é a presença de apenas um isolado resistente à combinação, o que pode superestimar a sensibilidade do teste.

Cabe destacar que, além de avaliar a performance da metodologia na determinação da suscetibilidade dos isolados, foram realizados experimentos para determinar a estabilidade das soluções eluídas de antibiótico, visando garantir a qualidade dessas soluções durante um possível armazenamento. Determinou-se que o armazenamento, sob refrigeração ou congelamento, mantém as soluções estáveis por até 15 dias.

Apesar dessas limitações, a metodologia demonstra ser uma boa alternativa para determinar e semi-quantificar a suscetibilidade à ATM, CZA e ATM/CZA, apresentando vantagens significativas, como bom desempenho geral, acessibilidade

para incorporação à rotina de laboratórios clínicos e fornecimento de resultados rápidos.

É consenso que a metodologia padrão para determinar a suscetibilidade às polimixinas possui desvantagens significativas, podendo impactar a sobrevivência dos pacientes com infecções graves, como bacteremias, que podem rapidamente evoluir para sepse.

Assim como na determinação da suscetibilidade à ATM/CZA, metodologias alternativas para a rápida detecção de resistência às polimixinas foram propostas por diferentes autores. Destacam-se aquelas que podem ser adaptadas para a utilização do conteúdo de hemoculturas positivas, sem a necessidade de isolamento bacteriano em meio sólido, reduzindo assim o tempo de resposta dos testes de suscetibilidade.

Para a rápida determinação da suscetibilidade às polimixinas, driblando desvantagens como alto custo e complexidade metodológica, a metodologia RCPEm demonstrou ser uma boa alternativa, ao ser avaliada diretamente em 152 frascos de hemoculturas positivas para Enterobacterales. Após avaliação de sua performance, a metodologia apresentou apenas um resultado falso-positivo durante a análise do desempenho do teste (1/118), resultando em 99,1% de especificidade.

Ao caracterizar corretamente 32 dos 34 isolados resistentes à polimixina B, foi demonstrado 94,1% de sensibilidade. Os dois resultados falso-negativos foram observados em um isolado do complexo *K. pneumoniae* e outro do complexo *Enterobacter cloacae*, ambos com CIM de 64 µg/mL.

A diminuída sensibilidade da metodologia pode ser explicada, pelo menos parcialmente, pelo reduzido número de isolados resistentes avaliados. Entretanto, o estudo reflete a epidemiologia local, uma vez que as hemoculturas foram coletadas consecutivamente.

Mesmo com sensibilidade ligeiramente baixa, RCPEm demonstra ser uma metodologia acessível, rápida, de baixo custo e precisa para a detecção de resistência à polimixinas B diretamente de hemoculturas positivas para Enterobacterales. Estes resultados encorajam a avaliação do teste em outros cenários epidemiológicos para gerar resultados mais robustos que possam embasar sua utilização em laboratórios de microbiologia clínica.

6 CONCLUSÃO GERAL

A importância dos testes de suscetibilidade antimicrobiana é inquestionável para o tratamento de pacientes com doenças infecciosas. No entanto, o impacto clínico dos resultados desses testes tem sido posto à prova devido ao tempo requerido pelas técnicas tradicionais. Metodologias rápidas como mATM/CZA e RCPEm são essenciais e podem melhorar os desfechos clínicos dos pacientes com infecções graves, otimizar o uso de antimicrobianos e minimizar o desafio imposto pela RAM. A implementação dessas metodologias em laboratórios clínicos pode representar um avanço significativo no diagnóstico microbiológico e no manejo de infecções graves.

REFERÊNCIAS

- ABDUL MOMIN, M. H. F. et al. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 1554–1561, 1 nov. 2017.
- AGUILAR, G. R. et al. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 25, p. 100561, set. 2023.
- ALM, R. A.; JOHNSTONE, M. R.; LAHIRI, S. D. Characterization of *Escherichia coli* NDM isolates with decreased susceptibility to aztreonam/avibactam: role of a novel insertion in PBP3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1420–1428, 1 maio 2015.
- AMBLER, J. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 16 maio 1980.
- APPEL, T. M. et al. In Vitro Susceptibility to Ceftazidime/Avibactam and Comparators in Clinical Isolates of Enterobacterales from Five Latin American Countries. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 62, 5 fev. 2020.
- BAKTHAVATCHALAM, Y. D.; WALIA, K.; VEERARAGHAVAN, B. Susceptibility testing for aztreonam plus ceftazidime/avibactam combination: A general guidance for clinical microbiology laboratories in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 3–6, jan. 2022.
- BARTH, P. O. et al. Evaluation of a rapid susceptibility test of polymyxin B by MALDI-TOF. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1075650, 19 dez. 2022.
- BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849–1851, out. 2016.
- BELDA-ORLOWSKI, A. et al. Evaluation and readout optimization of the rapid polymyxin NP test for the detection of colistin-resistant Enterobacteriaceae. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 1189–1193, 1 ago. 2019.

BONOMO, R. A. et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 8, p. 1290–1297, 3 abr. 2018.

BOYD, S. E. et al. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. e00216-22, 16 ago. 2022.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 16 mar. 2020.

BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, out. 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. e00047-19, 18 mar. 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, mar. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, jun. 1995.

CARRARA, E. et al. Determinants of inappropriate empirical antibiotic treatment: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 4, p. 548–553, abr. 2018.

CELIK, C. et al. Recent Advances in Colorimetric Tests for the Detection of Infectious Diseases and Antimicrobial Resistance. **Diagnostics**, v. 13, n. 14, p. 2427, 20 jul. 2023.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, jan. 2020.

CIELO, N. C. et al. Polymyxin B broth disk elution: a feasible and accurate methodology to determine polymyxin B susceptibility in Enterobacterales. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 98, n. 2, p. 115099, out. 2020.

COLLAR, G. D. S. et al. Detection of polymyxins resistance among Enterobacterales: evaluation of available methods and proposal of a new rapid and feasible methodology. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 22, n. 1, p. 71, 10 ago. 2023.

COLLAR, G. DA S. et al. Polymyxin NP tests (from colonies and directly from blood cultures): accurate and rapid methodologies to detect polymyxin B susceptibility among Enterobacterales. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 99, n. 4, p. 115264, abr. 2021.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C. 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, jul. 2020.

DALMOLIN, T. V. et al. Detection of Enterobacterales resistant to polymyxins using Rapid Polymyxins NP test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 425–428, abr. 2019.

DI BELLA, S. et al. Resistance to ceftazidime/avibactam in infections and colonisations by KPC-producing Enterobacterales: a systematic review of observational clinical studies. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 268–281, jun. 2021.

DOERN, C. D. When Does 2 Plus 2 Equal 5? A Review of Antimicrobial Synergy Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124–4128, dez. 2014.

DOI, Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement_7, p. S565–S575, 13 nov. 2019.

EL-GAMAL, M. I. et al. Recent updates of carbapenem antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 131, p. 185–195, maio 2017.

ESTABROOK, M. et al. Epidemiology of Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible *Enterobacterales* Collected as Part of a Global Surveillance Study, 2018 to 2019. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. e01406-22, 17 maio 2023.

EUCAST, E. S. OF C. M. AND I. D. **Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin**

Breakpoints Working Group. , 2016. Disponível em: <<https://www.eucast.org/>>. Acesso em 12 jun. 2024.

EVANS, L. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1181–1247, nov. 2021.

EZADI, F.; ARDEBILI, A.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. e01390-18, abr. 2019.

FACCONE, D. et al. Emergence of Hyper-Epidemic Clones of Enterobacterales Clinical Isolates Co-Producing KPC and Metallo-Beta-Lactamases during the COVID-19 Pandemic. **Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 479, 18 mar. 2023.

FALCONE, M. et al. Time to appropriate antibiotic therapy is a predictor of outcome in patients with bloodstream infection caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 29, dez. 2020.

FALCONE, M. et al. Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo- β -lactamase-Producing Enterobacterales. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 11, p. 1871–1878, 1 jun. 2021.

FALCONE, M.; PATERSON, D. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2713–2722, out. 2016.

FÓLDES, A. et al. Comparison of Six Phenotypic Assays with Reference Methods for Assessing Colistin Resistance in Clinical Isolates of Carbapenemase-Producing Enterobacterales: Challenges and Opportunities. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 377, 11 mar. 2022.

FONSECA E SILVA, D. et al. Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 6, p. 820–823, dez. 2019.

GAUBA, A.; RAHMAN, K. M. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1590, 3 nov. 2023.

GERM, J. et al. Evaluation of two rapid phenotypical tests—Alifax rapid AST colistin test and Rapid Polymyxin NP test—for detection of colistin resistance in Enterobacterales. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 8, p. 1749–1753, ago. 2021.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, B. et al. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 726–734, jul. 2017.

HARRIS, H. et al. Multicenter Evaluation of an MIC-Based Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Broth Disk Elution Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, n. 5, p. e01647-22, 23 maio 2023.

HUMPHRIES, R. M. et al. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 11, nov. 2019.

HUSSEIN, N. H. et al. The predominance of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-type) gene among high-level carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Baghdad, Iraq. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 6, p. 4653–4658, jun. 2022.

JAYOL, A. et al. Rapid Detection of Polymyxin-Resistant Enterobacteriaceae from Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2273–2277, set. 2016.

JEAN, S.-S.; HARNOD, D.; HSUEH, P.-R. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 823684, 15 mar. 2022.

KADRI, S. S. et al. Inappropriate empirical antibiotic therapy for bloodstream infections based on discordant in-vitro susceptibilities: a retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and mortality risk in US hospitals. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 241–251, fev. 2021.

KHAN, A. et al. Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Combination Therapy on Extensively Drug-Resistant Gram-

Negative Organisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 11, p. e00846-21, 18 out. 2021.

KIFFER, C. R. V. et al. A 7-Year Brazilian National Perspective on Plasmid-Mediated Carbapenem Resistance in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Complex and the Impact of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic on Their Occurrence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, n. Supplement_1, p. S29–S37, 5 jul. 2023.

KUAI, J. et al. In vitro Synergistic Activity of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Aztreonam or Meropenem Against Clinical Enterobacterales Producing blaKPC or blaNDM. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 16, p. 3171–3182, maio 2023.

LAMY, B.; SUNDQVIST, M.; IDELEVICH, E. A. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 2, p. 142–150, fev. 2020.

LATIFI, F. et al. Worldwide Prevalence of Colistin Resistance among Enterobacteriaceae: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical Laboratory**, v. 69, n. 04/2023, 2023.

LI, W. et al. In vitro and in vivo activity of ceftazidime/avibactam and aztreonam alone or in combination against mcr-9, serine- and metallo- β -lactamases–co-producing carbapenem-resistant Enterobacter cloacae complex. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 3 maio 2024.

LI, Z. et al. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. ofz368, 1 out. 2019.

LI, Z.; VELKOV, T. Polymyxins: Mode of Action. Em: LI, J.; NATION, R. L.; KAYE, K. S. (Eds.). **Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 1145p. 37–54.

LIMA, K. D. O. et al. A simple disk pre-diffusion test to predict in vitro aztreonam/avibactam activity against NDM-producing Klebsiella pneumoniae complex. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 28, p. 49–52, mar. 2022.

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, fev. 2016.

LIU, Z. et al. A Simple Disk Stacking Plus Micro-Elution Method for Rapid Detection of the Synergistic Effect of Aztreonam and Ceftazidime/Avibactam Against Metallo- β -Lactamase Producing Enterobacterales. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 16, p. 1537–1543, mar. 2023.

LUO, Q. et al. Clinical relevance, mechanisms, and evolution of polymyxin B heteroresistance carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: A genomic, retrospective cohort study. **Clinical Microbiology and Infection**, p. S1198743X24000363, fev. 2024.

LUO, Y. et al. Appropriateness of Empirical Antibiotic Therapy in Hospitalized Patients with Bacterial Infection: A Retrospective Cohort Study. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 16, p. 4555–4568, jul. 2023.

LUTGRING, J. D.; LIMBAGO, B. M. The Problem of Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 529–534, mar. 2016.

MA, K. et al. Struggle To Survive: the Choir of Target Alteration, Hydrolyzing Enzyme, and Plasmid Expression as a Novel Aztreonam-Avibactam Resistance Mechanism. **mSystems**, v. 5, n. 6, p. e00821-20, 22 dez. 2020.

MAIRI, A. et al. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 587–604, abr. 2018.

MARSHALL, S. et al. Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome β -Lactam Resistance Conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02243-16, abr. 2017.

MASSARINE, N. C. M. et al. How Did COVID-19 Impact the Antimicrobial Consumption and Bacterial Resistance Profiles in Brazil? **Antibiotics**, v. 12, n. 9, p. 1374, 28 ago. 2023.

MAURI, C. et al. The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1012, 20 ago. 2021.

MESSACAR, K. et al. Implementation of Rapid Molecular Infectious Disease Diagnostics: the Role of Diagnostic and Antimicrobial Stewardship. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 715–723, mar. 2017.

MOREIRA, N. K.; CAIERÃO, J. Ceftazidime-avibactam: are we safe from class A carbapenemase producers' infections? **Folia Microbiologica**, 9 set. 2021.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

NANG, S. C. et al. Rescuing the Last-Line Polymyxins: Achievements and Challenges. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 2, p. 679–728, abr. 2021.

NARIMISA, N.; GOODARZI, F.; BAVARI, S. Prevalence of colistin resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 21, n. 1, p. 29, dez. 2022.

NICHOLS, W. W. et al. The primary pharmacology of ceftazidime/avibactam: resistance *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 3, p. 569–585, 2 mar. 2023.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038–1043, jun. 2016.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, out. 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement_7, p. S521–S528, 13 nov. 2019.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 26 nov. 2014.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations.** , 2014.

PAHO. **Epidemiological Alert: Emergence and increase of new combinations of carbapenemases in Enterobacterales in Latin America and the Caribbean - 22 October 2021.** , 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-emergence-and-increase-new-combinations-carbapenemases>>. Acesso em: 1 jun. 2024.

PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 91–104, jan. 2013.

PASTERAN, F. et al. Simple Phenotypic Tests To Improve Accuracy in Screening Chromosomal and Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. e01701-20, 17 dez. 2020.

PAUL, M. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 4, p. 521–547, abr. 2022.

PHILIPPON, A. et al. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 29–57, jan. 2016.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, abr. 2017.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597–1606, 1 jul. 2012.

POUDEL, A. N. et al. The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 18, n. 5, p. e0285170, 8 maio 2023.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, jul. 2007.

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

ROOD, I. G. H.; LI, Q. Review: Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 3, p. 245–250, nov. 2017.

RUIZ-RAMOS, J. et al. The Interventions and Challenges of Antimicrobial Stewardship in the Emergency Department. **Antibiotics**, v. 12, n. 10, p. 1522, 9 out. 2023.

SADEK, M. et al. Rapid Polymyxin/Pseudomonas NP test for rapid detection of polymyxin susceptibility/resistance in Pseudomonas aeruginosa. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1657–1662, set. 2020.

SADER, H. S. et al. Aztreonam/avibactam activity against a large collection of carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) collected in hospitals from Europe, Asia and Latin America (2019–21). **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 5, n. 2, p. dlad032, 2 mar. 2023.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, dez. 2016.

SARIKAYA, A. et al. Comparison of Colistin Broth Disc Elution, Rapid Resapolymyxin NP and Broth Microdilution Methods in Determining Colistin Sensitivity in Acinetobacter, Pseudomonas and Enterobacterales species. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 56, n. 3, p. 404–415, 30 jul. 2022.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**, v. 8, n. 1, p. 13, dez. 2020.

SEMPERE, A. et al. Ceftazidime-Avibactam plus Aztreonam for the Treatment of Infections by VIM-Type-Producing Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 10, p. e00751-22, 18 out. 2022.

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

SHIRLEY, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 78, n. 6, p. 675–692, abr. 2018.

SHOAIB, M. et al. Evaluation of rapid polymyxin Nordmann Poirel test for detection of polymyxin resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 11, p. 2195–2198, nov. 2020.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414–a000414, 1 maio 2010.

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

SIMNER, P. J. et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin *In Vitro* Activity against Gram-Negative Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, fev. 2019.

SIMON, M. S. et al. Cost-Effectiveness of Ceftazidime-Avibactam for Treatment of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Bacteremia and Pneumonia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. e00897-19, dez. 2019.

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

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, 9 dez. 2020.

SREE, R. A. et al. Ceftazidime-avibactam alone or in combination with Aztreonam versus Polymyxins in the management of carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* nosocomial Infections (CAPRI study): a retrospective cohort study from South India. **Infection**, v. 52, n. 2, p. 429–437, abr. 2024.

STONE, G. G.; PONCE-DE-LEON, A. In vitro activity of ceftazidime/avibactam and comparators against Gram-negative bacterial isolates collected from Latin American centres between 2015 and 2017. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 7, p. 1859–1873, 1 jul. 2020.

STONE, G. G.; SEIFERT, H.; NORD, C. E. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against Gram-negative isolates collected in 18 European countries, 2015–2017. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, p. 106045, set. 2020.

SULAYYIM, H. J. A. et al. Antibiotic Resistance during COVID-19: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, p. 11931, 21 set. 2022.

TAMMA, P. D. et al. Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1046–1055, abr. 2017.

TAMMA, P. D. et al. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR- *P. aeruginosa*). **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 7, p. e169–e183, 8 abr. 2021.

TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 11, p. e01140-18, nov. 2018.

TAN, X. et al. Therapeutic Options for Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacterales. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 125–142, jan. 2021.

THOMAS, G. R. et al. Increased Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 11, p. 1–8, nov. 2022.

TJANDRA, K. C. et al. Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 511, 12 abr. 2022.

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, jan. 2019.

TURLEJ-ROGACKA, A. et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 345–353, fev. 2018.

VÁZQUEZ-UCHA, J. C. et al. New Carbapenemase Inhibitors: Clearing the Way for the β -Lactams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9308, 6 dez. 2020.

WANG, J.-L. et al. High ceftazidime-avibactam resistance among carbapenem-resistant Enterobacter species: Data from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) programme, 2014–2021. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 63, n. 4, p. 107105, abr. 2024.

WENZLER, E. et al. Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 4, p. 352–354, ago. 2017.

WENZLER, E. et al. Antimicrobial susceptibility testing: An updated primer for clinicians in the era of antimicrobial resistance: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 43, n. 4, p. 264–278, abr. 2023.

WHO. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WHO. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 15 maio 2024.

WHO. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. Geneva: World Health Organization, 2022.

WHO. **WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024 Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance**. Geneva: World Health Organization, 2024.

WILHELM, C. M. et al. Evaluation of Aztreonam and Ceftazidime/Avibactam Synergism against *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. **Antibiotics**, v. 12, n. 6, p. 1063, 16 jun. 2023.

YONG, D. et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{NDM-1}, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, dez. 2009.

YUSOF, N. Y. et al. Prevalence of Mutated Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 12, p. 414, 2 dez. 2022.

ZENG, M. et al. Guidelines for the diagnosis, treatment, prevention and control of infections caused by carbapenem-resistant gram-negative bacilli. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 56, n. 4, p. 653–671, ago. 2023.

ZHEN, X. et al. Clinical and Economic Burden of Carbapenem-Resistant Infection or Colonization Caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*: A Multicenter Study in China. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 514, 13 ago. 2020.

ZHOU, C. et al. In vitro Synergistic Activity of Antimicrobial Combinations Against *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}-Producing Enterobacterales With *bla*_{IMP} or *mcr* Genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 533209, 21 out. 2020.

TRABALHOS E ATIVIDADES COMPLEMENTARES NA VIGÊNCIA DO MESTRADO

Detecção rápida de resistência à polimixina B em bacilos gram-negativos não-fermentadores da glicose

Projeto que deu origem a dois trabalhos de conclusão de curso, intitulados: “Adaptation of Rapid ResaPolymyxin Acinetobacter/Pseudomonas NP as feasible and rapid test to detect polymyxin B resistance” de Juliana Galvan; e “Evaluation and development of the Rapid ResaPolymyxin Elution technique: an alternative for evaluating polymyxin resistance in Pseudomonas and Acinetobacter” de Leonardo Venturini.

Detecção rápida e fenotípica de enzimas carbapenemases

Projeto em andamento que tem como objetivo a rápida identificação e categorização das enzimas carbapenemases em bacilos gram-negativos. A metodologia padronizada no projeto foi utilizada para a produção do trabalho de conclusão de residência de Luana Dornelles, intitulado “Production of carbapenemases among in vitro meropenem-susceptible Enterobacterales”.

Participação em outros estudos publicados

COLLAR, G. D. S.; MOREIRA, N. K.; WINK, P. L.; BARTH, A. L.; RARO, O. H. F.; DIAS, C.; DE LIMA MACHADO, A.; MOTT, M. P.; CAIERÃO, J. Detection of polymyxins resistance among Enterobacterales: evaluation of available methods and proposal of a new rapid and feasible methodology. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 22, p. 1:77, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00618-7>

MOREIRA, N. K.; WILHELM, C. M.; **COLLAR, G. D. S.**; ECHEVARRIA, A. D.; BECKER, J.; BARTH, A. L.; CAIERÃO, J. Detection of KPC directly from positive blood cultures by MALDI-TOF: From research to the clinical microbiology laboratory routine. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS*, v. 221, p. 106940, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106940>

Publicação de resumos em anais de eventos

COLLAR, G. S.; MOREIRA, N. K.; BECKER, J.; BARTH, A. L.; CAIERÃO, J. mATM/CZA: a new rapid and inexpensive methodology for evaluating the combination in vitro of ceftazidime-avibactam plus aztreonam among Enterobacterales. In: 1st European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Global, 2024, Barcelona.

COLLAR, G. S.; MOREIRA, N. K.; BECKER, J.; BARTH, A. L.; CAIERÃO, J. Development, proof of concept and standardization of a new semi-quantitative methodology for the in vitro evaluation of ceftazidime-avibactam and aztreonam synergism against carbapenem-resistant Enterobacterales. In: 32 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2023, Foz do Iguaçu.

COLLAR, G. S.; MOREIRA, N. K.; BECKER, J.; BARTH, A. L.; CAIERÃO, J. Evaluation of the Rapid Colorimetric Polymyxin B microelution for Enterobacterales directly from positive blood cultures. In: 32 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2023, Foz do Iguaçu.

MOREIRA, N. K.; **COLLAR, G. S.;** BECKER, J.; ECHEVARRIA, A. D.; WILHELM, C. M.; BARTH, A. L.; CAIERÃO, J. Validation of MALDI-TOF mass spectrometry for KPC detection directly from blood culture. In: 32 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2023, Foz do Iguaçu.

ANEXOS

Anexo A

Parecer do comitê de ética em pesquisa.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E ÀS POLIMIXINAS EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 67871323.2.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.957.651

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS__DO_PROJETO 2095497", de 11/03/2023.

Projeto de Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E ÀS POLIMIXINAS EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pesquisadora: GABRIELA DA SILVA COLLAR

Coordenador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública mundial. Infecções causadas por bactérias multirresistentes estão associadas a elevada morbimortalidade. Neste sentido, os bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (BGN-RC) revestem-se de particular importância. De fato, o tratamento de infecções causadas por BGN-RC é desafiador, com limitadas opções terapêuticas. Em cenários onde as novas combinações de beta-lactâmicos com inibidores de betalactamases não estão disponíveis ou não são amplamente utilizados por terem custo elevado, os tratamentos centrados nas polimixinas são a última linha terapêutica disponível, o que fez com que essa classe de antimicrobianos fosse largamente utilizada nos

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar

Bairro: Rio Branco

CEP: 90.410-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-6246

Fax: (51)3359-6246

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 5.957.651

últimos anos, apesar de sua reconhecida toxicidade, especialmente renal. Em decorrência disso, a resistência a essa classe de antimicrobianos tem aumentado significativamente em várias regiões geográficas e, por isso, a detecção acurada da suscetibilidade às polimixinas se tornou, recentemente, mais necessária e relevante no contexto dos laboratórios de microbiologia.

Metodologia de Análise de Dados: Para avaliar a performance dos testes propostos, serão avaliados parâmetros analíticos clássicos, quais sejam: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância categórica, além dos percentuais de erro menor, erro maior e erro muito maior

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo dessa proposta é avaliar a performance da microeluição NP e da variação do RP-NP para não fermentadores diretamente com frascos positivos de hemocultura, excluindo a necessidade de cultivo da bactéria em meio sólido e permitindo a detecção de resistência às polimixinas em até 4h após a positividade da hemocultura. Além disso, pretende-se avaliar a outra variação da metodologia NP para a detecção de resistência aos carbapenêmicos: NitroSpeed Carba NP.

Objetivo Primário: Avaliar a performance de metodologias alternativas para a determinação da suscetibilidade à polimixina B e aos carbapenêmicos em bacilos Gramnegativos resistentes aos carbapenêmicos recuperados de espécimes clínicos.

Objetivo Secundário: (a) Avaliar a performance do teste microeluição NP para a determinação da suscetibilidade à polimixina B a partir de frascos de hemocultura positivos com BGN-RC; (b) Avaliar a performance do teste Rapid ResaPolymyxin Acinetobacter/Pseudomonas NP, utilizando resazurina para a determinação da suscetibilidade à polimixina B a partir de frascos de hemocultura positivas para P. aeruginosa e A. baumannii; (c) Avaliar a performance da variação da metodologia NP, o teste NitroSpeed Carba NP para a determinação da suscetibilidade aos carbapenêmicos em bacilos Gram-negativos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pesquisadores entendem que há risco mínimo de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano. Isso porque não haverá a utilização de dado de qualquer natureza envolvendo o paciente. Os isolados bacterianos serão recebidos e imediatamente numerados com numeração interna do laboratório de pesquisa, desvinculando-os totalmente do espécime clínico do qual foram isolados e, mais ainda, do paciente do qual o espécime foi coletado. Cabe aqui ressaltar que este projeto tem por objetivo avaliar metodologias

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 5.957.651

para detecção de resistência. Ou seja, não há interesse algum dos pesquisadores nos dados de prontuário do paciente.

Benefícios: As infecções causadas por bacilos Gram-negativos extremamente resistentes aos antimicrobianos é uma realidade em muitas instituições de saúde. Nessas situações, os carbapenêmicos, combinações de beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases, assim como as polimixinas são as opções terapêuticas mais utilizadas. É nesse contexto que o presente estudo é proposto, acreditando-se que, a partir de seus resultados, será possível: a) Avaliar a possibilidade de utilização de duas metodologias, microeluição NP e Rapid ResaPolymin Acinetobacter/Pseudomonas NP, diretamente de frascos de hemocultura, excluindo a necessidade de cultivo em meio sólido, o que reduz, significativamente, o tempo necessário com a obtenção dos resultados; b) Avaliar a performance do teste NitroSpeed Carba NP, para determinação rápida de enzimas carbapenemases. Visto que em termos epidemiológicos, reconhecer precocemente pacientes infectados ou colonizados com isolados produtores de enzimas carbapenemases permite a implementação e efetiva de medidas de precaução de contato, evitando que essa bactéria se dissemine para outros pacientes, para visitantes ou para a equipe de assistência à saúde, assim como direciona corretamente a terapia adequada; c) Por fim, a maior contribuição derivada dos resultados desse estudo é a possibilidade de manejo terapêutico mais apropriado de pacientes com infecções causadas por bacilos Gram-negativos extremamente resistentes, incluindo a resistência às polimixinas, o que, tem o real potencial de diminuir as taxas de mortalidade atribuídas a essas infecções, melhorando os desfechos desses pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tamanho da Amostra no Brasil: 400

Metodologia Proposta: Serão utilizados nesse estudo bactérias isoladas que fazem parte da coleção de bactérias do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LABRESIS), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Afonso Luís Barth.

Escherichia coli ATCC 25922 será utilizada como controle negativo.

Também farão parte do estudo frascos de hemoculturas positivas para presença de bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos providas do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Apenas um frasco por paciente (aeróbio ou anaeróbio) será considerado e hemoculturas polimicrobianas serão resultados.

Serão utilizados no estudo 400 isolados bacterianos de resistentes aos carbapenêmicos. Esse n foi pensando considerando a epidemiologia do hospital coparticipante em termos de frequência de

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 5.957.651

isolamento de BGN resistentes aos carbapenêmicos e às polimixinas (aproximadamente 30%). Dessa forma, aproximadamente 120 isolados apresentariam resistência às polimixinas. Esse número aparentemente alto de isolados resistentes nos possibilita maior chance de uma ampla distribuição de CIM entre essas bactérias, aumentando a chance de obtermos isolados bacterianos com CIMs borderline, o que é o desejado quando são realizados estudos de avaliação de metodologias para detecção de resistência aos antimicrobianos.

As bactérias serão mantidas em “Skim Milk” com 10% de glicerol a -20C. Já, os frascos de hemocultura, ao serem finalizados os exames no setor de Microbiologia, ao invés de serem descartadas, serão encaminhados, a temperatura ambiente, ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do HCPA (LABRESIS), onde os testes serão realizados. O transporte dos frascos de hemocultura será realizado seguindo todos os protocolos de biossegurança, de acordo com a RDC 20/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em momento algum do estudo serão necessários dados dos pacientes dos quais as bactérias forem isoladas. Não haverá, portanto, acesso a prontuários médicos ou qualquer outra fonte de informação de dados de qualquer natureza.

A CIM será determinada para todos os isolados de acordo com o documento M100- S27 do CLSI, 2017 (48), utilizando-se caldo Mueller-Hinton cátion ajustado, sem a adição de polissorbato-80 (49). Uma suspensão bacteriana com turvação correspondente ao tubo 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/ml) será preparada a partir de colônias puras obtidas após crescimento por 18 a 24h. Essa suspensão será diluída em solução salina, de modo que a concentração final em cada poço da microplaca de titulação seja de 5 x 10⁵ UFC/ml. Serão utilizados sulfato de Polimixina B em concentrações que variam de 0,125 a 128 g/ml e meropenem em concentrações de 0,5 a 256 g/ml. As cepas E. coli ATCC 25922 e Providencia spp. (intrinsecamente resistente à polimixina B) servirão como controles negativo e positivo, respectivamente. A interpretação das CIM obtidas será baseada nos pontos de corte definidos pelo BrCAST (62). Sendo assim, serão consideradas resistentes às polimixinas cepas com CIM maior que 2 g/ml e resistentes ao meropenem cepas com CIM maior ou igual a 8 g/ml.

Este projeto tem como objetivo avaliar metodologias alternativas para a detecção de resistência às polimixinas e aos carbapenêmicos em bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos. Para tal, serão testadas bactérias isoladas a partir de exames rotineiramente realizados nos laboratórios de microbiologia dos hospitais envolvidos. Não haverá alteração alguma na rotina de realização destes exames. Tampouco serão utilizados quaisquer dados oriundos dos pacientes. Nos casos em que as hemoculturas dos pacientes forem utilizadas como veículo para o

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 5.957.651

crescimento bacteriano, não haverá acesso algum a dados que possam veicular o frasco (que seria descartado pelo laboratório) com o paciente. Não haverá utilização da hemocultura para absolutamente procedimento algum, exceto para a recuperação da bactéria responsável pela infecção. Com isto posto, reitera-se que não serão coletados quaisquer dados clínicos e/ou laboratoriais para a realização deste projeto. Ao aplicar as metodologias, serão gerados dados relacionados à capacidade das mesmas de detectar a resistência às polimixinas e aos carbapenêmicos. Ou seja, os resultados obtidos serão “positivo” ou “negativo” para a presença de resistência.

Esses dados serão tabulados em tabela excel, para o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, percentuais de erro menor, erro maior e erro muito maior. Ainda, será computado o tempo necessário para a obtenção dos resultados positivos (quando aplicável).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Propõe dispensa do TCLE? Sim

Justificativa: i) por ser um estudo observacional, analítico ou descritivo retrospectivo, que não empregará quaisquer informações de prontuários médicos, sistemas de informação institucionais e/ou demais fontes de dados e informações clínicas disponíveis na instituição; ii) porque todos os dados serão manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos participantes de pesquisa; iii) porque as hemoculturas dos pacientes serão recebidas com todos os dados de identificação rasurados, para impossibilitar o vínculo da mesma com o paciente (não há interesse algum em qualquer dado do paciente, reiterando que este é um projeto com objetivo exclusivo de avaliar performance de metodologias de detecção de resistência às polimixinas). Esse frasco será utilizado exclusivamente para a detecção da resistência às polimixinas. Considerando que não há interesse algum no espécime clínico, que está, aqui, servindo apenas como veículo das bactérias a serem utilizadas e que a hemocultura foi coletada do paciente para fins assistenciais, sobre os quais os pesquisadores não terão influência alguma, entende-se não ser necessária a aplicação do TCLE. Caso fosse uma coleta de sangue específica para esse fim, o TCLE seria perfeitamente aplicável e necessário; iv) porque os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual dos participantes, e v) porque se trata de um estudo não intervencionista e sem alterações/influências na rotina/tratamento do participante de pesquisa, e conseqüentemente sem adição de riscos ou

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 5.957.651

prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para inclusão ou revisão de registros de 400 amostras neste centro.

- Deverão ser apresentados relatórios semestrais e um relatório final.

- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para "Aprovado", configurando a aprovação final da Diretoria de Pesquisa.

- Textos e anúncios para divulgação do estudo e recrutamento de participantes deverão ser submetidos para apreciação do CEP, por meio de Notificação, previamente ao seu uso. A redação deverá atender às recomendações institucionais, que podem ser consultadas na Página da Pesquisa do HCPA.

- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2095497.pdf	11/03/2023 14:55:46		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Delegacao_de_Funcoes.pdf	11/03/2023 14:55:15	GABRIELA DA SILVA COLLAR	Aceito
Folha de Rosto	FR_Afonso_Luis_Barth.pdf	11/03/2023 14:48:06	GABRIELA DA SILVA COLLAR	Aceito

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar

Bairro: Rio Branco

CEP: 90.410-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-6246

Fax: (51)3359-6246

E-mail: cep@hcpa.edu.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA



Continuação do Parecer: 5.957.651

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo.pdf	01/03/2023 10:40:39	GABRIELA DA SILVA COLLAR	Aceito
---	----------------------	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 22 de Março de 2023

Assinado por:
Têmis Maria Félix
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br