

# Emprego de reveladores oxirredutores e de leitura automatizada na determinação da atividade de fármacos em bactérias de importância médica

## Advantage of the use of oxyreductive dye and automated reading in the determination of pharmaceutical activity in bacteria of medical importance

Ana Beatriz Miranda<sup>ID</sup>, Luiz Henrique Reinert<sup>ID</sup>, Jean Eduardo Meneguello<sup>ID</sup>, Andressa Lorena Ieque<sup>ID</sup>, Vera Lucia Dias Siqueira<sup>ID</sup>, Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>ID</sup>, Rosilene Fressatti Cardoso<sup>ID</sup>, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli<sup>ID\*</sup>

### RESUMO

As Infecções do Trato Urinário (ITU) são infecções bacterianas frequentes no Brasil, sendo os bacilos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* os mais incidentes. Diante do cenário pandêmico causado pelo vírus SARS-CoV-2, as infecções hospitalares ganharam destaque, já que foram consideradas agravantes da doença e aumentaram a mortalidade. Neste contexto, é indispensável o diagnóstico rápido e assertivo, a fim de se reduzirem custos, erros terapêuticos e desenvolvimento de cepas resistentes pelo uso inadequado de antimicrobianos. O perfil de sensibilidade a antibacterianos é determinado pela Concentração Inibitória Mínima (doravante, CIM), de modo que o resultado é obtido a partir da observação a “olho nu” de turvação das microplacas. Tal técnica tem sido aprimorada com o uso de reveladores oxirredutores que ajudam a facilitar a interpretação dos resultados por meio da alteração de cor. Desse modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho de três corantes incorporados na CIM para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, com o intuito de adotá-los na rotina laboratorial e proporcionar um melhor custo-benefício, bem como uma leitura mais apropriada. A visualização foi baseada na mudança de cor dos corantes e na análise das absorbâncias emitidas por espectrofotômetro, as quais foram utilizadas em cálculos específicos para elaboração de figuras. Os resultados mostraram que, no tempo mínimo de 40 minutos, foi possível determinar a CIM das bactérias acima descritas e a conclusão de que os reveladores e a leitura automatizada facilitam a interpretação do crescimento bacteriano.

**Palavras-chave:** CIM. *Escherichia coli*. Leitura automatizada. Reveladores. *Staphylococcus aureus*.

### ABSTRACT

Urinary Tract Infections (UTIs) are frequent bacterial infections in Brazil, with the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacilli being the most common. In the context of the pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, hospital infections have gained prominence, as they have been considered aggravating factors for the disease and have increased mortality rates. In this context, rapid and accurate diagnosis is essential in order to reduce costs, therapeutic errors, and development of resistant strains due to the inappropriate use of antimicrobials. The antibiotic sensitivity profile is determined by the Minimum Inhibitory Concentration (hereinafter, MIC), and the result is obtained from the observation of turbidity in the microplates with the naked eye. This technique has been improved with the use of redox indicators that can facilitate the interpretation of results through color changes. Thus, this study aimed to evaluate the performance of three dyes incorporated in the MIC for *E. coli* and *S. aureus* bacteria, in order to adopt them in routine laboratory work and to provide a better cost-benefit ratio as well as more appropriate reading. The visualization was based on the color change of the dyes and in the analysis of the absorbances emitted by a spectrophotometer, which were used in specific calculations for graph preparation. The results showed that it was possible to determine the MIC of the above-described bacteria in a minimum time of 40 minutes and to conclude that the indicators and automated reading facilitate the interpretation of bacterial growth.

**Keywords:** Automated reading. Dyes. *Escherichia coli*. MIC. *Staphylococcus aureus*.

Universidade Estadual de Maringá  
– UEM, Maringá, PR, Brasil.  
\*krcferracioli2@uem.br

Recebido: 08 de agosto de 2022.  
Aprovado: 15 de março de 2023.  
Publicado: 12 de junho de 2023.



## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta que cerca de 1,4 milhão de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) ocorrem a todo momento no mundo. Tratam-se de infecções oportunistas, uma vez que podem ser causadas por patógenos presentes na microbiota do paciente associado a quadros de imunossupressão, a procedimentos hospitalares invasivos, entre outros (Araújo, P. J. F. Freitas, Abreu, Freitas & Brandão, 2021). As Infecções do Trato Urinário (ITU) estão entre as infecções hospitalares mais comuns, sendo 90% dos casos provocados por bacilos gram-negativos, com evidência para *Escherichia coli* e cerca de 6% por cocos gram-positivos, destacando-se a *Staphylococcus aureus* (Furlan et al., 2021). Um estudo realizado em dois hospitais de Nova York, com pacientes acometidos pelo novo coronavírus, revelou que embora a taxa de coinfeção se mostrou relativamente baixa (1,57%), a associação do *S. aureus* com a Covid-19 elevou a mortalidade de 54,8% para 66,7% em um período de 30 dias (Cusumano et al., 2020).

Outro fator importante a ser considerado em relação a esses patógenos é a resistência bacteriana, ou seja, o surgimento de novas cepas de *E. coli* e *S. aureus* resistentes aos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado, como resultado do uso indiscriminado e inadequado dos mesmos ao longo dos anos, bem como a escassez de novos medicamentos. O cenário acerca da resistência bacteriana no Brasil tem se mostrado alarmante, pois há surgimento crescente, no contexto hospitalar, de novas cepas (Menezes, Porto & Pimenta, 2013). Além disso, infecções adquiridas em hospitais causadas por cepas multirresistentes, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), estão sendo documentadas de forma crescente em todo o mundo (Feldhaus et al., 2016). Cepas de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos (ERC), frequentemente identificadas em *E. coli*, representam grande relevância, visto que esse microrganismo pode causar graves infecções, especialmente em ambiente hospitalar (Gauthier et al., 2018).

Esses dados apontam que é indispensável diagnóstico assertivo para uma terapêutica eficaz, a fim de reduzir custos, erros terapêuticos que resultam em desfecho desfavorável da doença, a morbimortalidade e o desenvolvimento de multirresistência bacteriana (Santos, Porcy & Menezes, 2019). Para tanto, a determinação da CIM, também conhecida como exame de antibiograma, é fundamental para guiar a terapia antibacteriana. A avaliação da CIM, definida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento do microrganismo, pode ser obtida pela técnica de microdiluição em caldo com leitura a “olho nu”. Esse método envolve o uso de pequenos volumes de caldo em microplacas estéreis, em que os antimicrobianos a

serem testados são diluídos e colocados em contato com o patógeno (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015).

Atualmente, as pesquisas realizadas no laboratório de bacteriologia médica da Universidade Estadual de Maringá têm mostrado que o emprego de corantes reveladores pode ser útil especialmente na determinação do resultado da CIM em bactérias cujo crescimento bacteriano proporciona uma turvação de difícil visualização a “olho nu” do meio de cultura. Ainda assim, em certas situações, como mudanças na concentração do revelador, tempo de leitura e divergências na percepção das cores, pode ocorrer uma interpretação equivocada ou incerta. Para confirmar o que se visualiza a “olho nu” e aumentar o grau de confiabilidade dos resultados, é possível realizar uma leitura automatizada por meio de espectrofotometria, na qual o aparelho emite valores de absorvância que podem ser calculados e expressos em figuras para definir com exatidão a CIM do fármaco e a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano.

Assim, o presente estudo surgiu das dificuldades observadas no laboratório de análises clínicas quanto à visualização e à análise dos resultados da determinação da CIM pela técnica de microdiluição em caldo em bactérias gram-negativas e gram-positivas. Tendo em vista a importância da determinação correta da CIM para uma eficácia terapêutica, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o emprego de corantes reveladores, bem como leitura automatizada do ensaio de microdiluição em caldo, a fim de facilitar a visualização rápida e assertiva da CIM.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção e aquisição dos corantes

Foram selecionados três corantes oxirredutores, sendo eles: cloreto de trifetil tetrazólio (TTC), resazurina e azul de metileno. Esses reveladores foram escolhidos com base em estudos que já os utilizaram em ensaios de microdiluição em caldo para determinação da CIM. Tais substâncias foram adquiridas da empresa americana Sigma-Aldrich® e já estavam disponíveis no Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

### Bactérias estudadas

Foram utilizados, neste estudo, as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) como protótipo para a avaliação em bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente. Os isolados foram reativados em triptic soy broth (TSB – Difco Laboratories) por de duas a seis horas a 35±2 °C, seguido de plaqueamento em triptic soy agar (TSA – Difco Laboratories) por até 24h a 35±2 °C para avaliar pureza previamente ao ensaio de microdiluição em caldo.

### Ensaio de microdiluição em caldo modificado

O fármaco ciprofloxacino foi utilizado como padrão de escolha para avaliar a eficiência dos reveladores. Segundo o CLSI, a CIM para *S. aureus* ATCC 25213 deve estar entre 0,12 – 0,5 µg/mL e, para *E. coli* ATCC 25922, a CIM deve estar entre 0,004-0,016 µg/mL. A CIM desse fármaco foi determinada pelo método microdiluição em caldo usando *Muller Hinton Broth* com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA), segundo recomendação do CLSI (2015). Para o ajuste, foram usados 200µL de Ca<sup>2+</sup> e 100µL de Mg<sup>2+</sup>. Os isolados foram primeiramente reativados em TSB por seis horas a 35 °C. Depois disso, foi realizado o plaqueamento em TSA, por 24h a 35 °C.

Em seguida, foram diluídos seriadamente (razão dois) 100uL do fármaco ciprofloxacino em microplacas contendo o meio MHB para cada bactéria. Os inóculos foram preparados pela comparação com a escala 0,5 de McFarland e diluídos até a concentração final de aproximadamente 5,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Após 18h de incubação, a menor concentração do fármaco sem crescimento bacteriano visível foi considerada como CIM. A visualização foi feita antes e após o emprego dos corantes selecionados. Para cada corante utilizado como revelador, foram estabelecidas as melhores condições de visualização do resultado, com base em tempos distintos (20, 40, 60 e 120 minutos). É importante frisar que os experimentos foram realizados em duplicata para que houvesse resultados consistentes e sem grandes variações.

### Adição do corante, leitura e tabulação dos dados

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, em que as duas primeiras linhas (A e B) ficaram sem corante (leitura visual – controle). Foram adicionados 20 µL em cada poço, nas linhas C e D, do revelador TTC, preparado na concentração 0,4g em 40mL de água destilada. Já a resazurina foi preparada na concentração 0,002g em 10 mL e foram adicionados os mesmos 20 µL nos poços das linhas E e F. Por fim, o azul de metileno foi feito na mesma concentração que a resazurina e foram acrescentados 20 µL em cada poço das linhas G e H, completando a microplaca. O modelo de microplaca utilizado está representado na Figura 1.

Nos tempos de 20, 40, 60 e 120 minutos após a adição dos corantes, foram tiradas fotografias das placas para análise a “olho nu”, além de uma leitura no aparelho espectrofotômetro, o qual determinou valores de absorbância com base em comprimentos de onda específicos para cada revelador. Para o TTC, a leitura foi realizada com 480 nm; para a resazurina, com 570 e 600 nm e, para azul de metileno, com 600 nm. Depois disso, os dados obtidos foram transferidos para uma planilha do Excel®, assim, figuras foram produzidos a partir de cálculos específicos, explicados adiante.

### Análise e interpretação dos resultados

Diante dos resultados obtidos, foi elaborada uma planilha que padroniza e facilita o emprego da metodologia proposta, neste estudo, no laboratório de análises clínicas.

### Figura 1

Modelo das microplacas empregadas nos experimentos em *S. aureus* e *E. coli*, destacando os reveladores utilizados e as diferentes concentrações de ciprofloxacino manipuladas.

	<i>S. aureus</i>	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.02	Controles	
	<i>E. coli</i>	0.256	0.128	0.064	0.032	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005	10	C+ C-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+	C-
Sem corante	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
TTC	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Resazurina	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Azul de metileno	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Fonte: Os autores.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante dos experimentos realizados, foi possível verificar que a adição dos corantes reveladores permitiu melhor percepção da alteração de cor, de tonalidade, de turvação dos poços e de determinação mais adequada da CIM de *S. aureus* e *E. coli* para o fármaco ciprofloxacino. Para todos os corantes utilizados, o tempo mínimo de 40

minutos foi suficiente para identificar a CIM em *S. aureus* e para *E. coli*. Foram tiradas fotografias das microplacas contendo os dois experimentos (Figura 2).

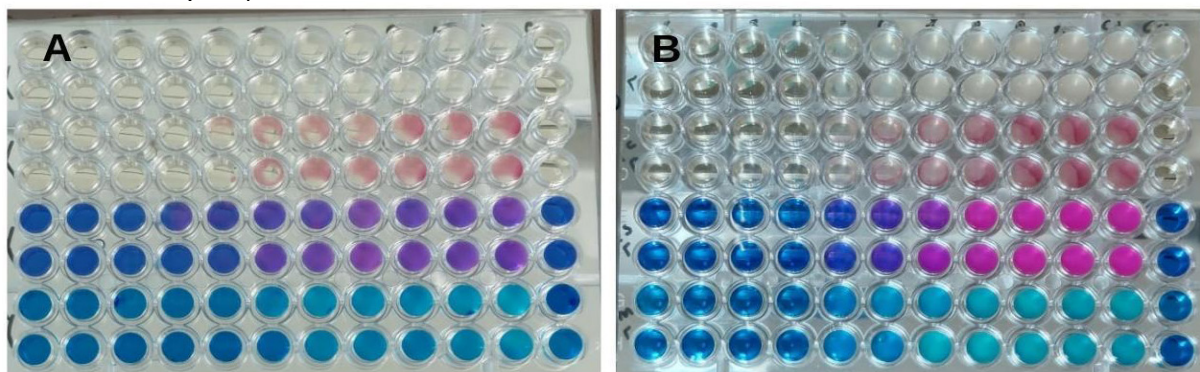
Em ambos experimentos, foram constatadas as reações visuais e colorimétricas características da presença dos reveladores devido aos seus mecanismos de ação (especificados na Tabela 1 e ilustrados na Figura

4). A MIC sem revelador foi determinada conforme às orientações do CLSI (2015) em que se baseia na turvação do poço correspondente ao crescimento bacteriano.

Os valores obtidos para ciprofloxacino, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, sem o emprego de corante validaram a metodologia.

### Figura 2

Fotografias das microplacas contendo os experimentos em *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) após 40 minutos de exposição ao revelador.



Fonte: Os autores.

### Tabela 1

Compostos reveladores oxirredutores utilizados relacionados a seus respectivos mecanismos e a suas alterações visuais.

Composto	Mecanismo e alteração visual
Cloreto de Tetrazólio (TTC)	Possui forma oxidada incolor e é reduzido em formazan (TPF) na presença de desidrogenases, passando a ter coloração vermelha.
Resazurina	Possui coloração púrpura quando entra em contato com metabolismo microbiano, é reduzida em resorufina e passa a revelar cor rósea, apresentando tonalidade violeta na transição do poço contendo a CIM (Roca et al., 2019).
Azul de metileno	Possui coloração azul, é reduzido em “leuco-metileno”, passando a ficar incolor devido a reações eletroquímicas relacionadas à respiração bacteriana (Duan, Fang & Wang, 2021).

Fonte: Os autores.

Posteriormente à interpretação visual, as duas microplacas contendo os experimentos de *S. aureus* e *E. coli* foram encaminhadas para o aparelho espectrofotômetro, o qual foi configurado com os comprimentos de onda definidos para cada corante. Desse modo, foram obtidos os valores de absorvância dos poços por meio do programa Softmax® Pro 7. A leitura automatizada foi realizada no mesmo momento que a análise visual e ambas foram estabelecidas em 40 minutos após a finalização do experimento. Com 20 minutos de exposição aos reveladores, a observação visual da CIM já pode ser definida, no entanto a correspondência com o método automatizado ficou melhor estabelecida no tempo de 40 minutos.

Os valores de absorvância emitidos pelo aparelho espectrofotômetro foram transferidos para um quadro de cálculos adaptado para o modelo das placas, contido em uma planilha criada em Excel®, de acordo com o corante, o comprimento de onda e poço, representados respectivamente nas Figuras 5 e 6. Com esses dados, foi possível realizar a análise quantitativa dos diferentes reveladores, determinada pela porcentagem de inibição

bacteriana de cada poço, por meio de diferentes fórmulas e ferramentas do próprio Excel®, de forma automática. A planilha elaborada otimizou o uso da metodologia em questão, uma vez que, com base nas médias dos controles positivos ou negativos, foram elaboradas figuras correspondentes que mostram a relação do antimicrobiano utilizado e a porcentagem de inibição bacteriana conforme os dados copiados para as Tabelas 2 e 3.

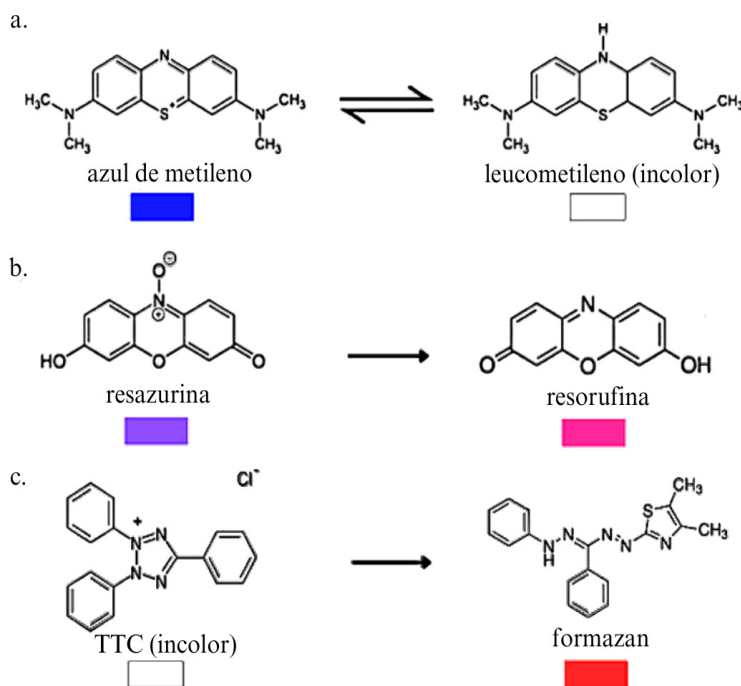
Para a obtenção das porcentagens de inibição bacteriana de ambas bactérias, dos poços sem corante e com o revelador TTC, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$(1) \quad \% \text{ de Inibição bacteriana} = 100 - (\text{Média da duplicata} \times 100) / \text{Média dos controles positivos.}$$

Por outro lado, o cálculo de porcentagem de inibição bacteriana dos poços contendo o revelador resazurina foi feito em um modelo diferente, em virtude do uso de dois comprimentos de onda nos experimentos, uma vez que esse composto se altera em diferentes tonalidades conforme à taxa de crescimento bacteriano.

**Figura 3**

Reações de oxirredução dos corantes utilizados e suas respectivas reações colorimétricas.



Fonte: Aiyker e Vijayakumar (2019), adaptado pelos autores.

**Tabela 2**

Tabela referente à leitura em espectrofotômetro após 40 minutos do experimento com *Staphylococcus aureus*, contendo o resultado dos valores de absorvância para cada poço e o valor da média dos controles negativos ou positivos das duplicatas, seguindo o modelo da microplaca de 96 poços.

Revelador	Duplicata	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+	C-	Média*
Sem revelador	A	0,003	0,002	0,002	0,000	0,234	0,442	0,476	0,347	0,473	0,458	0,461	0,000	0,461
	B	0,001	0,003	0,002	0,002	0,195	0,376	0,445	0,396	0,242	0,465	0,461	0,000	
TTC (480 nm)	C	0,011	0,003	0,002	0,003	0,336	1,129	0,449	1,029	1,138	1,163	0,982	0,043	0,982
	D	0,001	0,002	0,001	0,001	0,387	0,895	1,022	0,964	0,870	1,073	0,982	0,043	
Resazurina (570 nm)	E	1,619	1,645	1,780	1,798	2,309	2,325	2,538	2,273	2,317	2,542	2,481	1,752	2,481
	F	1,574	1,996	1,545	1,805	2,416	2,381	2,594	2,442	2,468	2,569	2,481	1,752	
Resazurina (600 nm)	G	2,176	2,209	2,361	2,378	1,207	1,005	0,939	0,653	0,788	0,871	1,127	2,340	1,127
	H	2,123	2,632	2,089	2,407	0,866	0,946	0,940	0,804	0,767	0,815	1,127	2,340	
AM (600 nm)	I	1,479	1,626	1,559	1,579	1,459	1,420	1,650	1,578	1,467	1,481	1,664	1,267	1,267**
	J	1,570	1,623	1,650	1,756	1,613	1,469	1,540	1,617	1,596	1,525	1,664	1,267	

Fonte: Os autores.

Notas. AM - azul de metileno, \*Média das duplicatas dos controles positivos (C+) ou negativos (C-). \*\*Valor da média referente à duplicata dos controles negativos, necessária unicamente para os cálculos relativos ao corante azul de metileno.

**Tabela 3**

Tabela referente à leitura em espectrofotômetro após 40 minutos do experimento com *Escherichia coli*, contendo o resultado dos valores de absorvância para cada poço e o valor da média dos controles negativos ou positivos das duplicatas, seguindo o modelo da microplaca de 96 poços.

Revelador	Duplicata	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+	C-	Média*
Sem revelador	A	0,091	0,089	0,089	0,058	0,339	0,489	0,852	1,003	1,075	1,061	1,092	0,896	1,117
	B	0,093	0,091	0,092	0,114	0,439	0,557	0,868	0,943	0,951	0,986	1,141	0,082	
TTC (480 nm)	C	0,084	0,090	0,089	0,092	0,228	0,475	0,668	1,192	1,447	1,591	1,465	0,087	1,518
	D	0,082	0,089	0,094	0,090	0,247	0,482	0,763	1,094	1,304	1,403	1,571	0,087	
Resazurina (570 nm)	E	1,765	1,345	1,308	1,290	1,806	2,042	2,140	2,301	2,138	2,266	2,028	1,230	2,003
	F	1,197	1,219	1,251	1,368	1,606	1,973	2,369	2,338	2,252	2,238	1,978	1,215	
Resazurina (600 nm)	G	2,220	1,817	1,773	1,753	1,326	1,217	0,847	0,664	0,717	0,781	0,765	1,681	0,764
	H	1,619	1,650	1,695	1,858	1,251	1,179	0,789	0,768	0,866	0,896	0,763	1,663	
AM (600 nm)	I	2,047	2,344	2,359	2,362	1,984	1,586	1,419	1,323	1,294	1,232	1,022	2,027	2,279**
	J	2,412	2,641	2,648	2,554	1,867	1,829	1,306	1,251	1,427	1,264	1,389	2,531	

Fonte: Os autores.

Notas. AM - azul de metileno. \*Média das duplicatas dos controles positivos (C+) ou negativos (C-). \*\*Valor da média referente à duplicata dos controles negativos, necessária unicamente para os cálculos relativos ao corante azul de metileno.

Para o cálculo de tal, foi realizada uma adaptação da fórmula de mensuração de citotoxicidade apresentada em um protocolo do fabricante do *AlamarBlue* (nome comercial da resazurina), da *Bio-Rad Laboratories*. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano com o corante resazurina é obtida a partir de 100% menos o resultado da fórmula abaixo.

$$(2) \quad \% \text{ de Inibição bacteriana} = 100 - [(117216 \times \text{Média da duplicata a } 570 \text{ nm}) - (80586 \times \text{Média da duplicata a } 600 \text{ nm})] / [(117216 \times \text{Média do controle positivo a } 570 \text{ nm}) - \text{Média do controle positivo a } 600 \text{ nm}] \times 100.$$

Devido ao corante azul de metileno possuir o mecanismo de descoramento conforme há crescimento bacteriano, o cálculo foi realizado com base na média dos controles negativos e a Fórmula 3 representa o cálculo realizado:

$$(3) \quad \% \text{ de Inibição bacteriana} = (\text{Média da duplicata} \times 100) / \text{Média dos controles negativos}.$$

O ensaio de microdiluição em caldo com leitura visual e com emprego dos reveladores (Figuras 4 e 6) baseou-se na mudança de cor perceptível segundo o respectivo corante utilizado. Já os resultados obtidos pela leitura automatizada foram apresentados em forma de porcentagem de inibição do crescimento bacteriano (Figuras 5 e 7). Embora a CIM, por definição pelo CLSI, seja interpretada como a concentração do fármaco em que se encontra uma inibição  $\geq 90\%$  do crescimento bacteriano, no ensaio de microdiluição em caldo preconizado pela

referência, o valor é determinado baseado na leitura visual.

É importante ressaltar que, no presente estudo, como critério de confiabilidade dos ensaios, as mesmas placas, após a leitura visual e a validação dos resultados obtidos, foram lidas pelo aparelho espectrofotômetro. Variações significativas entre os dois modos de leitura são inesperadas, na prática laboratorial, todavia, a variação de uma diluição no valor da MIC não é considerada significativa, sendo atribuída a erro técnico aceitável de diluição (Brennan-Krohn, 2017).

A CIM para as cepas ATCCs normalmente são estáveis e conhecidas dentro de um intervalo estabelecido pelo CLSI (*S. aureus* ATCC 25213: 0,12 – 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e *E. coli* ATCC 25922: 0,004-0,016  $\mu\text{g/mL}$ ). Considerando a maior sensibilidade na detecção do crescimento bacteriano pelo espectrofotômetro para se estabelecer o padrão de inibição  $\geq 90\%$ , uma variação na CIM foi observada comparando as duas metodologias para as cepas bacterianas estudadas. Verifica-se que, para ambas as cepas, a CIM na figura foi definida entre as concentrações de ciprofloxacino 0,5 - 1  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus* e 0,016 - 0,032  $\mu\text{g/mL}$  para *E. coli*. De acordo com Brennan-Krohn (2017), tendo em vista uma variação aceitável e que erros sistemáticos poderiam ser amenizados com a utilização de uma série de diluições mais finas, permitindo, com isso, maior precisão na determinação da MIC, neste estudo, mostra-se que, embora o emprego de reveladores facilite a visualização do crescimento bacteriano pela metodologia tradicional e seja um ganho interessante para o laboratório, a leitura automatizada torna-se mais precisa, principalmente se

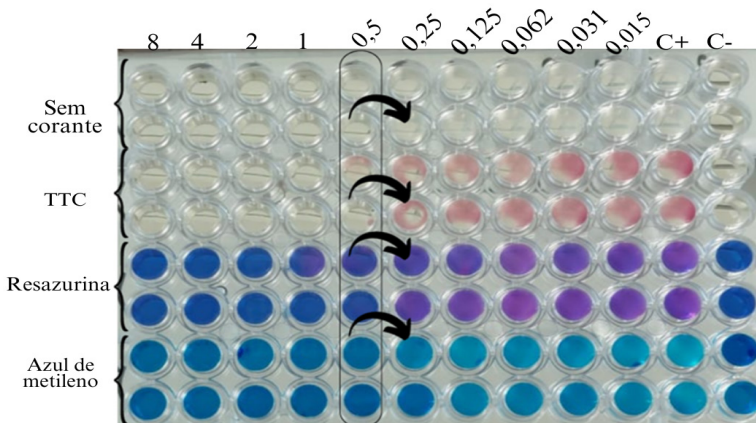
atrelada à diluição automatizada do fármaco em questão.

Com 40 minutos de exposição frente aos reveladores já é suficiente para verificar as alterações de cor e determinar a MIC visualmente. Experimentalmente, a visualização da mudança de cor para *E. coli* foi mais fácil do que para *S. aureus*. Uma exceção foi notada no azul de metileno para *S. aureus*, que, embora com bastante atenção uma mudança de cor foi notada no poço referente à CIM, pelo ensaio com leitura automatizada o

mesmo não houve correlação. O melhor revelador que se constatou, baseado na facilidade de leitura, foi o TTC, seguido pela resazurina. Ao considerar o custo benefício para os laboratórios que carecem de estrutura para leitura da CIM automatizada, o emprego da resazurina pode ser uma boa opção de uso na rotina laboratorial, principalmente para isolados bacterianos de difícil crescimento.

**Figura 4**

Fotografia da microplaca contendo o experimento em *S. aureus* no tempo de 40 minutos após adição dos reveladores.

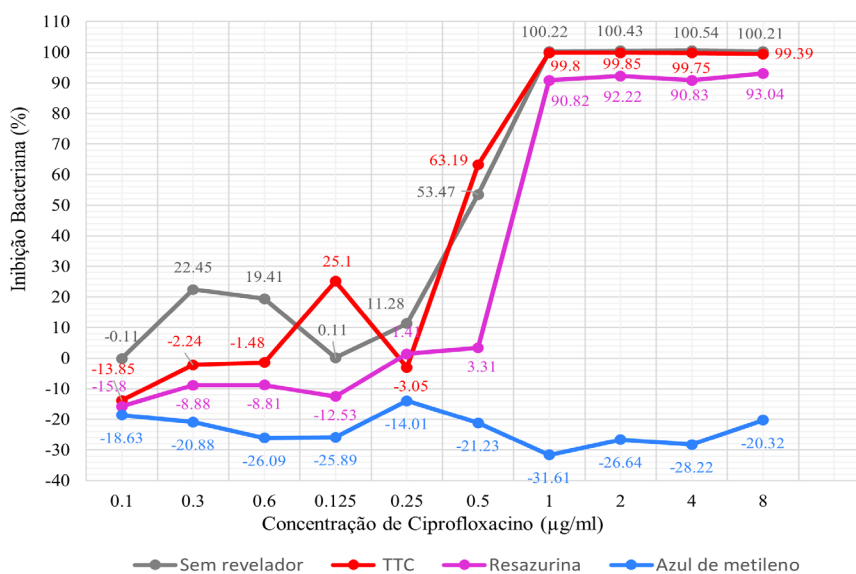


Fonte: Os autores.

Nota. As setas apontam a alteração de cor dos reveladores testados indicando a concentração inibitória mínima do fármaco na coluna marcada.

**Figura 5**

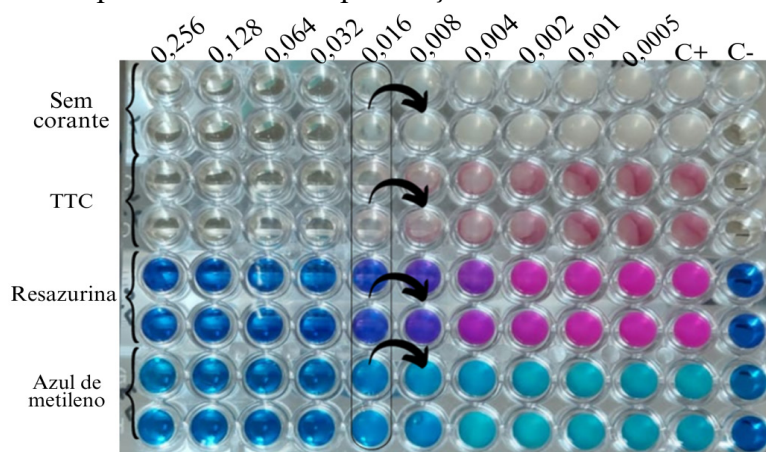
Figura elaborada a partir dos cálculos específicos para cada corante no tempo de 40 minutos para bactéria *S. aureus*.



Fonte: Os autores.

**Figura 6**

Fotografia da microplaca contendo o experimento em *E. coli* no tempo de 40 minutos após adição dos reveladores.

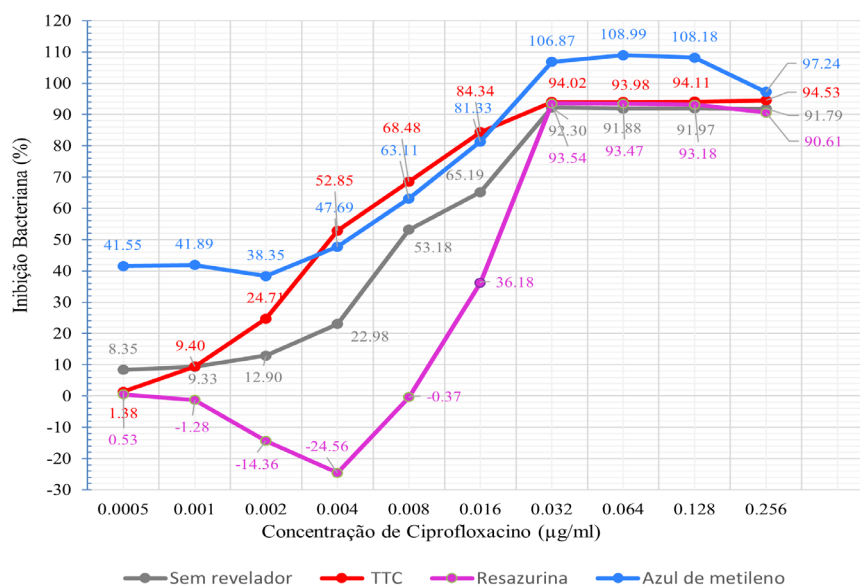


Fonte: Os autores.

*Nota.* As setas apontam a alteração de cor dos reveladores testados indicando a concentração inibitória mínima do fármaco na coluna marcada.

**Figura 7**

Figura elaborada a partir dos cálculos específicos para cada corante no tempo de 40 minutos para bactéria *E. coli*.



Fonte: Os autores.

**CONCLUSÃO**

É possível concluir que os reveladores auxiliam na interpretação da determinação da CIM, principalmente quando há dificuldade na visualização do crescimento bacteriano. Para *Escherichia coli*, assim como para *Staphylococcus aureus*, o menor tempo para percepção de crescimento foi de 40 minutos para todos os corantes. Desse modo, os reveladores permitem que os resultados sejam emitidos de maneira mais rápida e assertiva. Além disso,

a análise das microplacas por meio da espectrofotometria confirma a leitura realizada a “olho nu” e também mostra-se vantajosa por apresentar com exatidão nas figuras a concentração mínima do fármaco que inibe o crescimento das bactérias, fornecendo um resultado ainda mais preciso e com maior confiabilidade. O emprego dessa metodologia na rotina laboratorial permitirá explorar melhor a eficiência dos antimicrobianos no combate às infecções bacterianas.

**REFERÊNCIAS**

- Araújo, L. O., Freitas, P. J. F., Abreu, J. A. C., Freitas, N. L., & Brandão, F. (2021). Coinfecção com *Staphylococcus aureus* como agravante da Covid-19. *Revista Unimontes Científica*, 23(1), pp. 1-20. doi: 10.46551/ruc.v23n1a03
- Brennan-Krohn, T., Smith, K. P., & Kirby, J. E. (2017). The poisoned well: enhancing the predictive value of antimicrobial susceptibility testing in the era of multidrug resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), pp. 2304-2308. doi: 10.1128/JCM.00511-17



- Cusumano, J. A., Dupper, A. C., Malik, Y., Gavioli, E. M., Banga, J., Caban, A. B., ... Altman, D. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients infected with COVID-19: a case series. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(11), ofaa518. doi: 10.1093/ofid/ofaa518
- Duan, R., Fang, X., & Wang, D. (2021). A methylene blue assisted electrochemical sensor for determination of drug resistance of *Escherichia coli*. *Frontiers in Chemistry*, 9, 689735. doi: 10.3389/fchem.2021.689735
- Feldhaus, J. C., Botelho, T. K., Yamanaka, C. N., Oliveira, A. C. S., Silveira, J. G. C., & Cordova, C. M. M. C. (2016). Colonização por MRSA no projeto piloto do estudo SHIPBrasil. *RBAC*, 48(1), pp. 27-32.
- Furlan, A. P. F., Salomão, A. J. G., Nunes, B. V. T., Sousa, D. R., Martins, R. R., Silva, C. M., & Silva, A. C. M. S. (2021). Prevalência e perfil de resistência bacteriana nas infecções do trato urinário em hospitais da região norte e nordeste do Brasil: uma revisão. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(2), pp. 9244-9256.
- Gauthier, L., Dortet, L., Cotellon, G., Creton, E., Cuzon, G., Ponties, V., ... Naas, T. (2018). Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in France in 2012-2013. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(8), e00266-18. doi: 10.1128/AAC.00266-18
- Menezes, J. M. R., Porto, M. L. S., & Pimenta, C. L. R. (2016). Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 15(2), pp. 204-207. doi: 10.9771/cmbio.v15i2.15027
- Mosher, J. J., Levison, B. S., & Johnston, C. G. (2003). A simplified dehydrogenase enzyme assay in contaminated sediment using 2-(p-iodophenyl)-3(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride. *Journal of Microbiological Methods*, 53(3), pp. 411-415.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2015). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Tenth edition:(approved standard M7-A10).
- Roca, B. M., Poester, V. R., Mattei, A. S., Klafke, G. B., Ramis, I. B., & Xavier, M. O. (2019). Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade *in vitro* frente a *Sporothrix brasiliensis*. *VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde*, 31(2), pp. 32-37.
- Santos, M. J. A., Porcy, C., & Menezes, R. A. O. (2019). Etiologia e perfil de resistência bacteriana em uroculturas de pacientes atendidos em um hospital público de Macapá-Amapá, Brasil. Um estudo transversal. *Revista Diagnóstico e Tratamento*, 24(4), p. 135.