

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLIFICADO DE CRESCIMENTO RELATIVO
POR MALDI-TOF MS PARA DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE
ENTEROBACTERALES À POLIMIXINA B**

EVERTON INAMINE

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLIFICADO DE CRESCIMENTO RELATIVO
POR MALDI-TOF MS PARA DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE
ENTEROBACTERALES À POLIMIXINA B**

EVERTON INAMINE

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

INAMINE, EVERTON
AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLIFICADO DE CRESCIMENTO
RELATIVO POR MALDI-TOF MS PARA DETERMINAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE DE ENTEROBACTERIALES À POLIMIXINA B /
EVERTON INAMINE. -- 2020.
56 f.
Orientador: AFONSO LUIS BARTH.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. MALDI-TOF. 2. POLIMIXINA B. 3. TESTE DE
SUSCETIBILIDADE. I. BARTH, AFONSO LUIS, orient. II.
Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

Profa. Dra. Maria Helena Rigatto

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Profa. Dra. Juliana Caierão

Agradecimento ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA), ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) e Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli da Santa Casa de Porto Alegre que disponibilizaram os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração desta dissertação.

*Para meus pais, Lourdes Inamine
e Mário Inamine (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família, que sempre me incentivaram a estudar, me apoiaram e priorizaram a minha educação.

Agradeço enormemente ao meu orientador prof. Dr. Afonso Luis Barth pela orientação, paciência e ensinamentos durante este trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS), que me ajudaram em algumas etapas dos experimentos.

Agradeço a todos colegas do Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli da Santa Casa de Porto Alegre pela compreensão e flexibilidade durante estes dois anos desta jornada.

Agradeço especialmente à minha colega Maiara Carneiro (LABRESIS e Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli), pelo auxílio em todo andamento do projeto.

Agradeço à minha esposa Daniela Wunder pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, acadêmica ou pessoalmente, durante este meu caminho.

RESUMO

Base teórica: A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um problema que vem crescendo e ameaçando a saúde pública em todo o mundo. Infecções por bactérias multirresistentes aos antimicrobianos resultam em aumento da duração do tratamento bem como nas taxas de morbi-mortalidade. A emergência de bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR), em particular *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, levou a um aumento do uso de polimixinas na prática clínica. A administração rápida de antimicrobianos efetivos e a implementação de práticas suplementares de controle de infecção são necessárias para otimizar o tratamento e limitar a disseminação desses organismos altamente resistentes. O único método de referência para a determinação da suscetibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo (BMD). No entanto, a BMD é uma técnica demorada e trabalhosa. É necessário desenvolver novas metodologias que forneçam uma avaliação mais rápida da suscetibilidade às polimixinas, o que permitiria tratamentos mais eficazes.

Objetivo: Propor um método simplificado de crescimento relativo por MALDI-TOF MS para determinação da suscetibilidade de *Enterobacterales* à polimixina B.

Métodos: Estudo transversal e retrospectivo com 60 isolados bacterianos de *Enterobacterales* resistentes ou suscetíveis a polimixina B obtidos nos anos de 2016 e 2017. A concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B foi determinada através do método de microdiluição em caldo. O método crescimento relativo foi adaptado da técnica MBT-ASTRA, a qual se baseia na avaliação quantitativa de proteínas de baixo peso molecular produzidas durante o crescimento bacteriano na presença e ausência do antibiótico (Polimixina B).

Resultados: O método adaptado de crescimento relativo obteve uma concordância categórica de 96,7% quando comparado ao método referência de microdiluição em caldo.

Conclusão: A técnica de crescimento relativo por MALDI-TOF MS foi capaz de discriminar entre isolados resistentes e suscetíveis à Polimixina B para bactérias da ordem *Enterobacterales*.

Palavras chaves: crescimento relativo, MALDI-TOF MS, MBT-ASTRA, Teste de suscetibilidade, Polimixina B.

ABSTRACT

Background: Antimicrobial resistance (AMR) is a growing problem which threatens public health around the world. Multidrug resistant bacteria infections result in an increase in the duration of treatment as well as morbidity and mortality rates. The emergence of multidrug resistant (MDR) gram-negative bacteria, in particular *Enterobacterales* resistant to carbapenems, has led to an increase use of polymyxins in clinical practice. Rapid administration of effective antimicrobials and implementation of supplemental infection control practices are necessary to improve patient outcomes and to limit the spread of these highly resistant organisms. The only reference method for the determination of susceptibility to polymyxins is broth microdilution (BMD). However, BMD is a time consuming and laborious technique. It is necessary to develop new methodologies that provide faster evaluation of polymyxins susceptibility which would allow more effective treatments.

Objective: To propose a simplified method of relative growth by MALDI-TOF MS for determination of *Enterobacterales* susceptibility to polymyxin B.

Methods: A cross-sectional and retrospective study was conducted with sixty bacterial isolates resistant or susceptible to polymyxin B *Enterobacterales* obtained during 2016 and 2017. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of polymyxin B was determined by the broth microdilution method. The relative growth method was adapted from the MBT-ASTRA technique which is based on the quantitative evaluation of low molecular weight proteins produced during bacterial growth in the presence and absence of the antibiotic (Polymyxin B).

Results: The adapted relative growth method obtained a categorical agreement of 96% when compared to the reference method.

Conclusions: The relative growth technique by MALDI-TOF MS was able to discriminate between resistant and sensitive Polymyxin B isolates for *Enterobacterales* bacteria.

Key words: relative growth, MALDI-TOF MS, MBT-ASTRA and polymyxin B susceptibility testing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da colistina e Polimixina B.....	16
Figura 2 -Diagrama da identificação bacteriana através da técnica de MALDI - TOF MS.....	22
Figura 3 - Picos da RNase B	24
Figura 4 - Técnica de MBT- ASTRA.....	25

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Minimum inhibitory concentration (MIC) and relative growth (RG) values of <i>Enterobacter</i> susceptible to polymyxin B by broth microdilution.....	49
Table 2 - Minimum inhibitory concentration (MIC) and relative growth (RG) values of <i>Enterobacter</i> resistant to polymyxin B by broth microdilution.....	50
Figure 1 - Mass Spectra (m/z) obtained in the MALDI-TOF of an isolate susceptible (<i>E.coli</i>) and an isolate resistant (<i>K.pneumoniae</i>) to Polymyxin B	51
Figure 2 -Scatter Plot of the Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$) versus the Relative Growth.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

RAM - Resistência aos antimicrobianos

MALDI-TOF MS - Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (*Matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight: Mass Spectrometry*)

CIM - Concentração inibitória mínima

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

MDR - *Multidrug-resistant*

CIM - Concentração inibitória mínima

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*

OMS - Organização Mundial da Saúde

WHO - *World Health Organization*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

BMD - *Broth Microdilution*

AUC – Área total sob a curva

LPS – Lipopolissacarídeo

RG - *Relative Growth*

MDR - Resistência a múltiplas drogas

DD – Disco difusão

MHA – Ágar Mueller-Hinton

CA - *Categorical Agreement*

EA - *Essential Agreement*

VME - Erros Muito Maiores (*Very Major Errors*)

CA - MHB - Mueller Hinton Cátion Ajustado

UFC - Unidades formadoras de colônias

MBT-STAR-BL - *MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- β -Lactamase*

MBT-RESIST Assay - *MALDI Biotyper Resistance Test with Stable Isotopes Assay*

HCCA - ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Polimixinas.....	16
2.2 Testes de suscetibilidade para Polimixinas.....	18
2.2.1 Disco difusão para Polimixina B	18
2.2.2 Fitas de gradiente de concentração para PolimixinaB....	18
2.2.3 Sistemas Automatizados.....	19
2.2.4 Método de diluição em Caldo.....	20
2.3 MALDI-TOF MS.....	21
2.4 Testes de suscetibilidade por MALDI-TOF MS.....	22
3. MARCO TEÓRICO.....	26
4. JUSTIFICATIVA.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo primário.....	28
5.2 Objetivo secundário.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	29
7. ARTIGO.....	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento na incidência de bactérias gram-negativas resistentes a vários antibióticos é um problema importante na área de assistência à saúde (1). Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2015, as doenças infecciosas representam mais de 30% de todas as mortes no mundo (2) e a antibioticoterapia imediata e correta é o fator principal para o sucesso terapêutico dos pacientes com infecções bacterianas (3). Portanto, abordagens rápidas e econômicas para detectar bactérias resistentes e introduzir ações apropriadas para terapia e controle de infecção tornaram-se muito importantes (4).

Com o objetivo de combater bactérias gram-negativas multirresistentes, antibióticos antigos, como as polimixinas, foram reintroduzidos na prática clínica. As polimixinas (Colistina e Polimixina B) que, embora apresentem toxicidade ao ser humano, se tornaram antibióticos de “último recurso” para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas resistentes a múltiplas drogas (MDR), em particular os resistentes aos carbapenêmicos (5).

Os testes de suscetibilidade à polimixina são um grande desafio, pois as infecções por bactérias Gram-negativas resistentes à colistina estão associadas a uma maior taxa de mortalidade dos pacientes (6). Os desafios em determinar a suscetibilidade à polimixina são numerosos, incluindo a baixa difusão de polimixinas em ágar, as propriedades catiônicas inerentes às polimixinas, a presença de heterorresistência à polimixina em várias espécies bacterianas e a ausência de um método de referência para comparações confiáveis de testes comerciais (7,8).

A melhoria e a padronização dos testes de suscetibilidade para polimixinas tornaram-se um problema importante devido ao aumento de bacilos gram-negativos multirresistentes. Recentemente, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) recomendaram a microdiluição em caldo (BMD) como método de referência para o teste de suscetibilidade à polimixina (9,10).

O surgimento de bactérias gram-negativas MDR e o aumento do uso de polimixina B e colistina levaram a comunidade científica a buscar métodos novos, mais rápidos e confiáveis, para avaliar a suscetibilidade de isolados bacterianos às polimixinas. Nos últimos anos, a técnica de espectrometria de massa com fonte

de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-vôo (MALDI-TOF MS) foi desenvolvida para ser um método de rotina em laboratórios de microbiologia para a identificação rápida e econômica de microorganismos. Estender o uso de MALDI-TOF MS no laboratório de microbiologia clínica para a área de testes de resistência é uma opção atraente (11).

Recentemente, foi proposta uma metodologia denominada MBT-ASTRA (MALDI Biotyper - Teste Rápido de Susceptibilidade aos Antibióticos), que utiliza uma análise semi-quantitativa para detectar resistência aos antibióticos em um sistema de diluição em caldo sem a necessidade de meios de cultura específicos (12). O MBT-ASTRA avalia as taxas de crescimento relativo de isolados bacterianos expostos ao antibiótico em comparação com aqueles sem antibióticos durante um curto período de incubação. Essas amostras são adicionadas a um padrão de referência para permitir a normalização entre os espectros e a área total sob a curva (AUC) de todos os picos; dentro de uma faixa de massa definida que é calculada para fornecer valor ao crescimento bacteriano. Nesse método, uma AUC significativamente reduzida gerada a partir de amostras de antibióticos, em comparação com aquelas sem antibióticos, indica suscetibilidade ao antibiótico (13). Como o ensaio MBT-ASTRA usa informações da taxa de crescimento para determinação da resistência, essa técnica independe do mecanismo de resistência e pode ser usado para avaliar a suscetibilidade de virtualmente qualquer antibiótico.

Esse estudo teve como principal objetivo avaliar uma versão adaptada da metodologia MBT-ASTRA para a determinação da suscetibilidade à polimixina B de isolados clínicos de *Enterobacterales*, já que não há nenhum estudo com MALDI-TOF e Polimixina B.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. POLIMIXINAS

A classe das polimixinas consiste de cinco polimixinas (A a E), mas somente duas formas estão disponíveis para uso clínico, a colistina (polimixina E) e a polimixina B, tendo esta última sido desenvolvida com o objetivo de ser menos tóxica (14). A polimixina B foi descoberta no ano de 1947 a partir de *Paenibacillus polymyxa* e a colistina (polimixina E) foi produzida pelo crescimento de *P. polymyxa* subsp. *colistinus* em 1949 (15-17).

As polimixinas são peptídeos cíclicos com cadeias laterais peptídicas cobertas com uma cauda alquil saturada hidrofóbica de ácido α,γ -diaminobutírico (Figura 1). Essas moléculas são policatiônicas (positivamente carregadas) e hidrofóbicas, capazes de deslocar os íons magnésio e cálcio dos grupos fosfatos, que são aniônicos (negativamente carregados). O deslocamento destes íons permite que as moléculas antimicrobianas interajam eletrostaticamente com o lipídio A (negativamente carregado) do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa. Essa perturbação leva a uma permeabilidade aumentada da membrana celular bacteriana com conseqüente extravazamento do conteúdo intracelular provocando a rápida morte celular (14, 18).

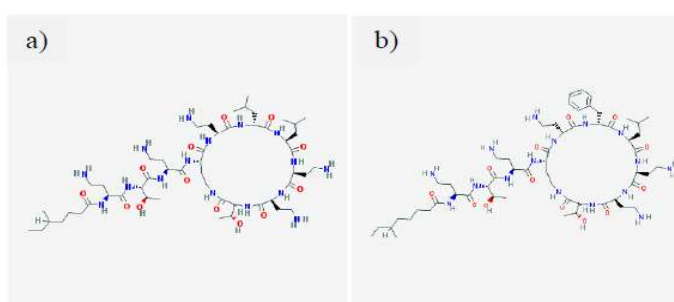


Figura 1. Estrutura química da colistina (a) e da polimixina B (b).
Fonte: PubChem. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Estes antibióticos foram utilizados por muito tempo para o tratamento de infecções severas causadas por bacilos Gram-negativos até aproximadamente meados da década 1980, quando foram retiradas da prática clínica devido aos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade e neurotoxicidade (19-21). A emergência de bacilos Gram-negativos multiresistentes, em particular resistentes aos

carbapenêmicos, levou ao ressurgimento das polimixinas como opção terapêutica no tratamento de último recurso em meados da década de 2000 (22,23). Atualmente, polimixinas E e B fazem parte de um grupo de antibióticos que pertencem às últimas opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR) como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (24-26). Assim, com o aumento da utilização das polimixinas a resistência a esse grupo de antibióticos começou a aumentar em diversas regiões do mundo.

Antes de 2015, os mecanismos de resistência às polimixinas eram associados apenas a mutações cromossômicas, entretanto em 2015, Liu e seus colaboradores descreveram, pela primeira vez, a resistência às polimixinas mediada por um gene com localização plasmidial (gene *mcr-1*) em isolados de origem humana e animal na China. Essa resistência plasmidial causou uma enorme preocupação mundial devido à possibilidade de transferência horizontal do gene e, portanto, elevada disseminação. Após sua primeira descrição, o gene *mcr-1* e suas variantes foram relatadas em outros países e a presença desse gene foi observada em grande variedade de espécies bacterianas de diferentes origens (27,28).

No Brasil como também na Malásia, Cingapura, Estado de Nova York nos EUA e algumas regiões da Índia, a Polimixina B é a mais utilizada entre as polimixinas (29, 30).

Dados brasileiros publicados em 2006 sobre resistência às polimixinas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* indicaram baixas taxas de resistência à Polimixina B de 0,5% e 1,8% respectivamente (31). Em posterior publicação no ano de 2011, o mesmo grupo identificou uma taxa de resistência de 3,0% para isolados *K. pneumoniae* na América Latina (32).

As taxas de resistência às polimixinas vêm aumentando em todo o mundo, incluindo o Brasil, e coincidem com a crescente utilização deste antibiótico. Dados mais recentes evidenciam esta problemática. Autores relatam dados referentes à cidade de São Paulo, a maior cidade da América Latina, um aumento de resistência à Polimixina B para *K. pneumoniae* produtoras de KPC de 0% em 2011 para 27,1% em 2015 (33, 34).

2.2. TESTES DE SUSCETIBILIDADE PARA POLIMIXINA B

Mesmo com a crescente utilização das polimixinas na prática clínica em ambientes hospitalares, o método apropriado para determinar a suscetibilidade às polimixinas em laboratórios clínicos de rotina é a microdiluição em caldo (BMD), embora seja um método trabalhoso e demorado (9,35). Vários estudos avaliam o desempenho de métodos para testes de suscetibilidade à polimixina obtendo resultados inconsistentes; portanto, existe um grande desafio para a comunidade científica: o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para determinar a suscetibilidade dos isolados bacterianos frente às polimixinas (10, 36,37).

2.2.1. DISCO DIFUSÃO PARA POLIMIXINA B

O teste de difusão disco (DD) é um método simples e barato para avaliar a suscetibilidade bacteriana a diversos antibióticos em um mesmo procedimento. É a principal metodologia utilizada na grande maioria dos laboratórios de microbiologia. No entanto, a fraca e lenta difusão das polimixinas através do ágar estão associadas a pequenas zonas de inibição do crescimento e significativa variação no teste de DD, impossibilitando avaliar as polimixinas através deste método de suscetibilidade (38,39). Além disso, estudos anteriores (38-41) indicaram uma correlação muito fraca entre os diâmetros de zona de inibição no teste de DD e MIC sendo que alguns destes obtiveram ainda taxas de falsa suscetibilidade de até 35% (38,42).

2.2.2. TIRAS DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO PARA POLIMIXINA B

O teste de gradiente de difusão, são produtos comerciais que permitem a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Estes testes utilizam uma tira plástica inerte e não porosa impregnada com as crescentes concentrações de antibiótico (0,064 a 1.024 µg/mL para Polimixina B). Aplica-se a tira na superfície de uma placa de Muller Hinton-Hinton (MHA) inoculada com uma suspensão bacteriana na concentração de 0,5 McFarland. Após incubação por 18 a 24 h a 35 ± 2 ° C, a

formação de uma elipse de inibição simétrica centrada ao longo da tira é formada. O valor da CIM é definido onde a borda da elipse cruza a tira do teste (43,44).

Estudos indicam altas taxas de erro muito maior (VME) do método por este método para a determinação da suscetibilidade à polimixina (8, 42, 45). Um estudo comparativo com 66 isolados de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos apresentou concordância categórica (CA) de apenas 75% e 48,7% para colistina e polimixina B, respectivamente (46).

2.2.3. SISTEMAS AUTOMATIZADOS

O sistema Vitek 2 (bioMérieux) utiliza cartões plásticos, contendo antibióticos em variadas concentrações dentro de poços. As concentrações de colistina são monitoradas por turbidimetria para determinar crescimento bacteriano durante um período de 4 a 10 h. Estudos comparando métodos de diluição e sistema Vitek 2 apresentaram baixa sensibilidade para detectar isolados Gram-negativos resistentes à colistina e também demonstraram não serem teste confiável para detectar subpopulações heterorresistentes (39).

O sistema automatizado Phoenix (BD Diagnostics) possui painéis que testam a colistina em concentrações que variam de 0,5 a 4 µg / mL, e a inoculação pode ser realizada manual ou de forma automática (44) e os resultados das CIM são gerados em 6 a 16 h.

Vourli et al. (47) avaliaram o desempenho de dois sistemas automatizados (Phoenix 100 e Vitek 2) para testes de suscetibilidade à colistina entre isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao carbapenêmicos. Foram observadas altas taxas de falsa suscetibilidade (VMEs) para os sistemas Phoenix 100 (41,4%) e Vitek 2 (37,9%). Os VMEs foram bem mais frequentes nos sistemas automatizados para aqueles isolados que apresentaram CIM de 2 µg/mL do que para isolados que apresentaram CIM de 1 µg/mL quando testados pelo método de microdiluição em caldo (BMD), indicando que avaliação da CIM por sistemas automatizados que apresentarem resultados dentro da faixa de suscetível devem ser avaliados por um método de BMD.

Conforme citado, Poirel(35), recentemente foi avaliada a precisão do sistema Phoenix através de 100 isolados de enterobactérias (60 resistentes a colistina e 40 suscetíveis a colistina) onde foi encontrada alta taxa (15%) de resultados falso-suscetíveis. Além disto, foi observada uma baixa sensibilidade para detectar a heterorresistência da colistina em isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobactercloacae*, mas uma boa sensibilidade para detectar a resistência à colistina mediada por plasmídeo.

O sistema MicroScan (BeckmanCoulterDiagnostics) utiliza painéis com concentrações de colistina de 2 e 4 µg/mL. Estes painéis são inoculados manualmente e incubados no equipamento por um período entre 16 a 20 h (37). Comparado com métodos de diluição, a concordância categórica do sistema MicroScan foi de 87% para isolados de *Acinetobacter* (46) e sua suscetibilidade foi de 88% para a detecção de resistência a polimixina B em isolados de *K. pneumoniae* (49).

2.2.4 MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO

O objetivo do método de diluição em caldo é determinar a CIM, que corresponde a menor concentração de polimixina que inibe o crescimento bacteriano, visível após uma incubação de 16 a 24 h a $35 \pm 2^\circ \text{C}$. Dois métodos de diluição em caldo estão padronizados: 1) método de macrodiluição em caldo, onde se utilizam tubos estéreis com um volume que pode variar de 1 até 10 mL em tubos de ensaio; 2) método de microdiluição em caldo (BMD), o qual utiliza volumes que podem variar de 0,05 a 0,1 mL em placas de microtitulação estéreis.

Atualmente, a microdiluição em caldo é o método de referência recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (50,51) para testes de suscetibilidade à polimixina. Conforme as recomendações do CLSI, a microdiluição deve ser realizada com caldo de Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB), realizando uma série de diluições de polimixinas em duplicata e uma suspensão bacteriana de concentração final de 5×10^5 UFC / mL em cada poço (52).

Infelizmente, a microdiluição é bastante trabalhosa e demorada, de preparação manual, que pode levar a erros significativos. Portanto, muitos laboratórios de microbiologia clínica não a utilizam em sua rotina.

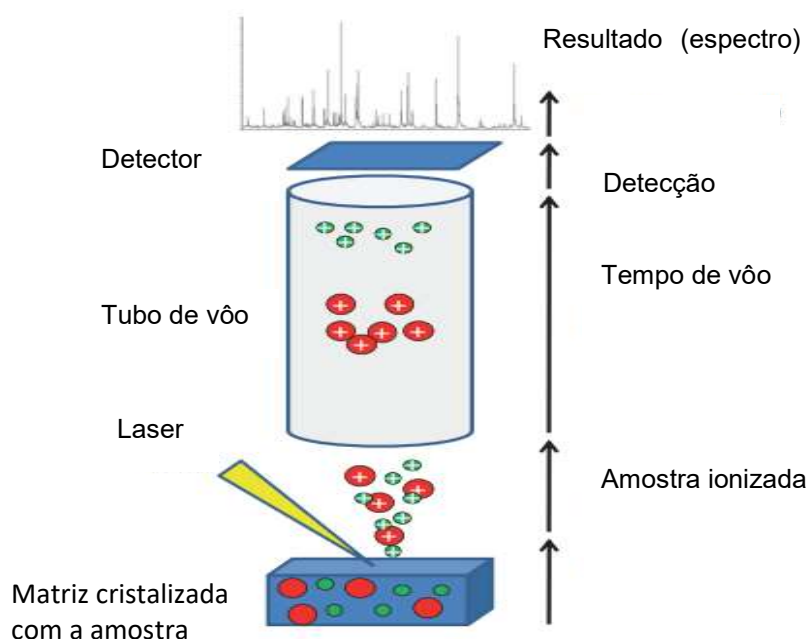
2.3. MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa com fonte a laser de ionização e dessorção assistida por matriz - tempo-de-voo (MALDI-TOF MS) trata-se de um método utilizado em laboratórios de microbiologia clínica para a identificação de microrganismos. Este método baseia-se na análise de proteínas, principalmente ribossômicas, de microrganismos na faixa de massa de 2.000 a 20.000 Daltons (53).

A técnica de MALDI-TOF MS consiste num sistema no qual material biológico do microrganismo (uma colônia bacteriana/levedura) é colocado sobre uma placa em que há a matriz polimérica capaz de fornecer prótons (ou H^+) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção das moléculas proteicas da matriz, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso (53, 54).

Os componentes (proteínas) do ionizados e dessorvidos são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo até que atinjam o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com sua relação massa/cargas (m/z), chegando ao detector em diferentes tempos. Conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time offlight*) é diferente. O detector gera um gráfico o qual é formado por vários picos referentes as proteínas de determinado microrganismo o qual é bastante específico para o gênero ou mesmo para a espécie do microrganismo específico (Figura 2). O gráfico gerado é comparado com uma base de dados pré-estabelecida sendo que permite a identificação do microrganismo indicando ainda um escore quantitativo da precisão dessa identificação.

Figura 2: Diagrama da identificação bacteriana através da técnica de MALDI-TOF



No sistema MALDI-TOF da empresa Bruker, os valores de escore iguais ou superiores a 2.3 indicam que as identificações são confiáveis a nível de espécie. Valores de 2.0 a 2.29 indicam que o gênero é confiável e a espécie é provável. Os valores de 1.7 a 1.99 indicam que a identificação só é confiável a nível de gênero. Quando o equipamento indica valores de escore inferiores a 1.7, o resultado da identificação "não confiável", evidenciando que a aquisição de espectros foi insuficiente ou que nenhum pico de proteína foi detectado e que análises adicionais são necessárias para esta amostra. (55).

2.4. TESTES DE SUSCETIBILIDADE POR MALDI-TOF MS

A tecnologia MALDI-TOF MS possibilitou avanços revolucionários no diagnóstico de agentes de doenças infecciosas. Além de permitir a identificação rápida e confiável de bactérias e fungos, esta tecnologia tem sido recentemente, e em condições experimentais, aplicada à detecção de alguns mecanismos de resistência antimicrobiana. Uma abordagem bem mais atual para o uso da tecnologia MALDI-TOF foi proposta para a avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. Assim, várias abordagens foram propostas e avaliadas para a

aplicação de MALDI-TOF MS ao teste de susceptibilidade (55) sendo que pelo menos quatro metodologias diferentes (4, 56) foram descritas:

(I) Técnica de identificação de um padrão de resistência específico: o princípio deste procedimento é identificar diferenças nas características dos espectros de massa de bactérias suscetíveis e resistentes através de picos específicos;

(II) MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- β -Lactamase (MBT-STAR-BL): o princípio desse procedimento se baseia na avaliação da capacidade de hidrólise de determinado antimicrobiano na presença da bactéria. Os testes de hidrólise estão sendo amplamente utilizados para avaliar a ação de β -lactamases sobre agentes β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos. O ensaio consiste em detectar alterações na molécula do antibiótico e seus subprodutos de hidrólise (58-60,62);

(III) MALDI Biotyper Resistance Test with Stable Isotopes Assay (MBT-RESIST Assay): o princípio desse método é a detecção de aminoácidos marcados com isótopos (não radioativos) estáveis, que foram incorporados em proteínas bacterianas recentemente sintetizadas sendo que a detecção desses aminoácidos oriundos da bactéria na presença do antibiótico indicaria que a mesma seria resistente ao antibiótico exposto (61,62);

(IV) MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA): esse método se baseia na análise do crescimento bacteriano na presença e na ausência de antibióticos usando um padrão interno como a RNase B (Figura 3). A inibição de crescimento na presença de um antibiótico (provável suscetibilidade) resulta em baixas intensidades de pico de biomassa bacteriana e crescimento normal na presença de antibiótico causaria pouca alteração nos picos de proteínas bacterianas e indicaria resistência (11,62) – Figura 4.

Figura 3. Picos específicos de RNase B (\cong 4970, 7454 e 14910m/ z)

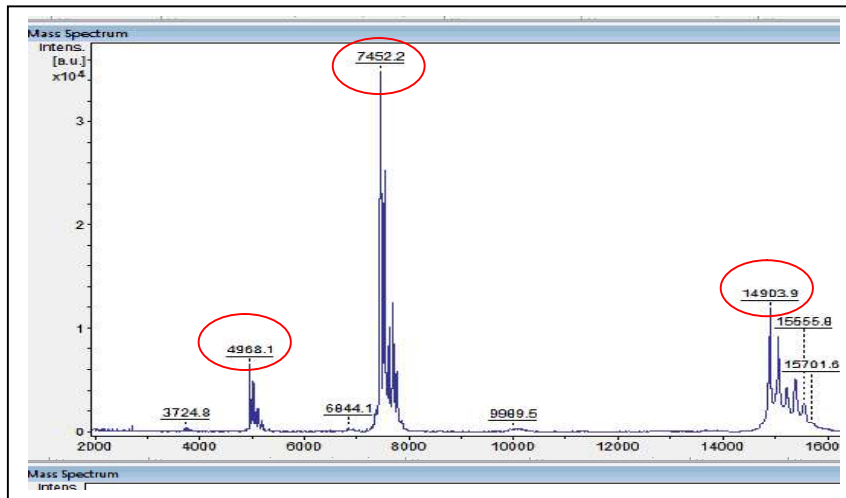
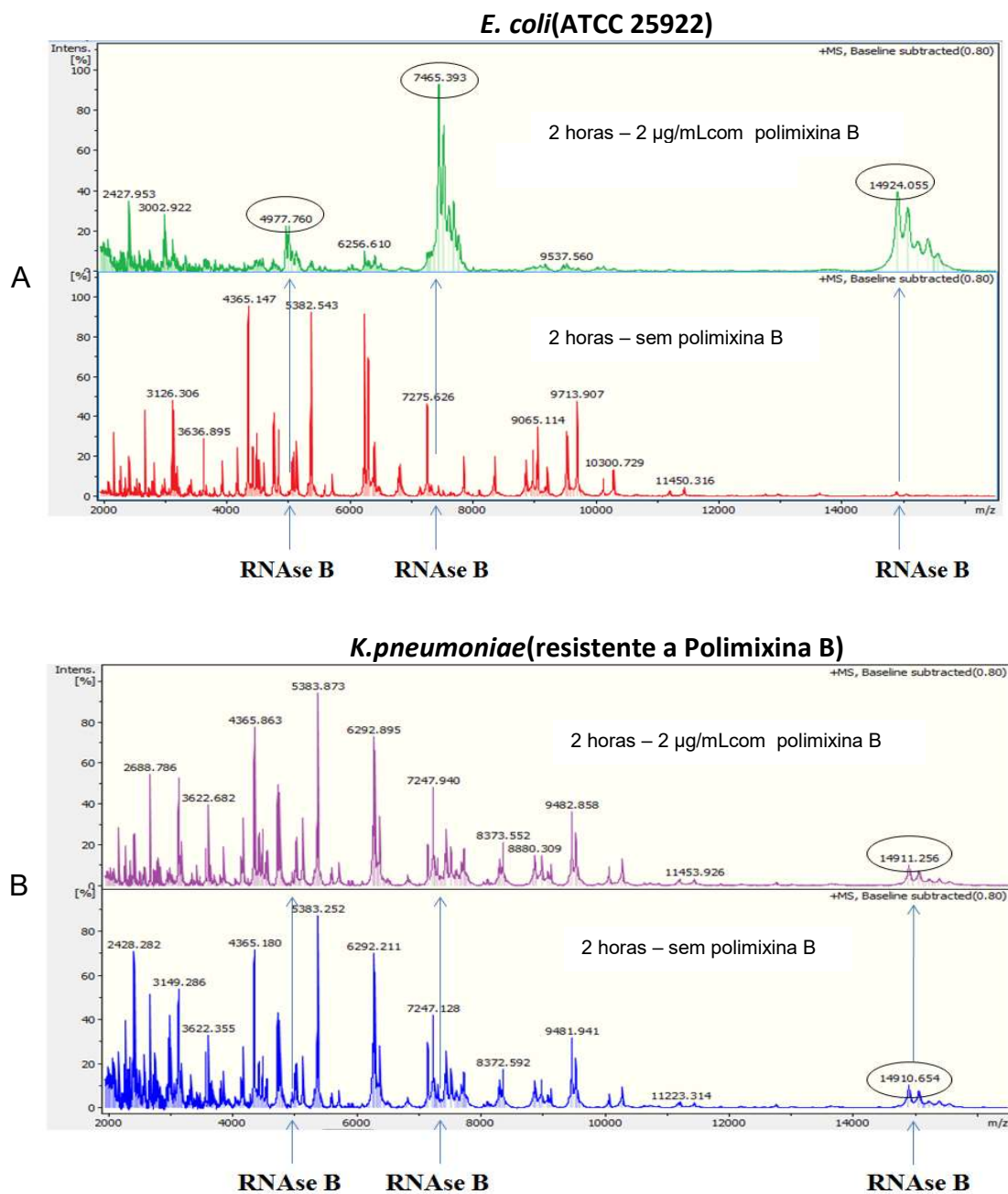


Figura 4: Técnica de MBT-ASTRA.



a. *E. coli* na presença de polimixina B após 2 horas de incubação (cor verde), os picos mais intensos são a RNase B, ou seja, quase não existem picos de *E. coli* após o crescimento ter sido inibido. No controle *E. coli* (sem polimixina B) após 2 horas, quase nenhum pico de RNase B pode ser visto, ou seja, existem muitas proteínas de *E. coli* que praticamente cobrem os picos de RNase B (vermelho).

b. *K. pneumoniae*, controle (ausência de polimixina B) e polimixina B, os picos de RNase B são baixos em intensidade em comparação aos outros picos que referem-se a proteínas ribossomais da *K. pneumoniae* (azul e roxo). Este resultado indica resistência, pois houve crescimento nas duas condições (ausência e presença de polimixina B).

3.MARCO TEÓRICO

O crescente aumento de bactérias gram-negativas resistentes a vários antibióticos é um problema crescente na assistência à saúde. A polimixina B reemergiu como uma das últimas opções terapêuticas, conseqüentemente, a necessidade de testes rápidos e confiáveis torna-se um grande desafio para os laboratórios clínicos.

4. JUSTIFICATIVA

A melhoria e a padronização dos testes de suscetibilidade para polimixinas tornaram-se um problema importante devido ao aumento da ocorrência de bacilos Gram-negativos multirresistentes. CLSI e o EUCAST recomendam a microdiluição em caldo (BMD) como método de referência para o teste de suscetibilidade à polimixina (9,10).

Esta necessidade de melhoria se deve a realidade que vivemos, onde a maioria das metodologias disponíveis nos laboratórios clínicos para testes de suscetibilidade para polimixinas, não fornecem resultados confiáveis.

Nos últimos anos, a técnica de MALDI-TOF MS estendeu seu uso na área de testes de suscetibilidade (11) com resultados promissores para alguns antibióticos (12). É importante que os laboratórios de microbiologia desenvolvam e validem a implementação de novas metodologias rápidas e confiáveis para avaliar a suscetibilidade de bacilos Gram negativos (em especial da ordem *Enterobacterales*). Até o momento, não há nenhuma publicação utilizando a técnica de MALDI-TOF para testes de suscetibilidade para polimixinas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a metodologia de espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) para determinação do perfil de suscetibilidade à Polimixina B em *Enterobacterales*.

5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar uma técnica adaptada de crescimento relativo de MBT- ASTRA para determinar a suscetibilidade bacteriana
- Comparar os resultados da técnica de microdiluição em caldo com os resultados de crescimento relativo para o antibiótico polimixina B.

6.REFERÊNCIAS

- 1.WHO (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. WHO, Geneva, Switzerland.
2. WHO (2015). The World Health Statistics 2015. Geneva:WHO.
3. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136: 1237–1248.
4. Spärbier K, Schubert S, Kostrzewa M.MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods* 2016; 104: 48-54.
5. Trimble M, Mlynarcik M, Kolár M, Hancock R. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring HarbPerspect Med* 2016; 10:3-6.
6. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *ClinMicrobiolInfect*2013; 19:23–30.
7. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J ClinMicrobiol* 2013; 51:4106 – 4111.
8. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative.J *ClinMicrobiol* 2013; 51(6): 1678-1684.
9. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J ClinMicrobiol* 2017; 55:2573–2582

10. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol* 2019; 57:01390- 18.
11. Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (12): 4155-62.
12. Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2016; 54(11): 2820-4.
13. Maxson T, Taylor-Howell CL, Minogue TD. Semi-quantitative MALDI-TOF for antimicrobial susceptibility testing in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2017; 12(8): e0183899.
14. Fair and Tor. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Med Chem* 2014;6: 25–64
15. Kwa A, Kasiakou SK, Tam VH, Falagas ME. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5:811– 821.
16. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future Microbiol* 2013; 8:711–724.
17. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1333–1341.
18. Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Ji Lee H, Nation RL. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ‘old’ polymyxins: what is new?. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74 (3) 213-223.

19. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care* 2006; 10:R27.
20. Ortwine JK, Kaye KS, Li J, Pogue JM. Colistin: understanding and applying recent pharmacokinetic advances. *Pharmacotherapy* 2015; 35: 11–16.
21. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1206–1215.
22. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:449–465.
23. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006;6:589–601.
24. Michalopoulos AS, Karatza DC. Multidrug-resistant Gram negative infections: the use of colistin. *Expert Rev Anti Infect* 2010; 8:1009–1017.
25. Pournajaf A, Rajabnia R, Razavi S, Solgi S, Ardebili A, Yaghoubi S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from pediatric burns patients in an Iranian hospital. *Trop J Pharm Res* 2018;17:135–141.
26. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2:ofv050.
27. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrobial Agents* 2016; 48(6): 583–591.
28. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human

beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016;16:161–68.

29. Nation RL, Velkov T, Li J (2014) Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical Use of Polymyxin B* 214 *Infect Dis* 59(1):88–94. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu213>.

30. J. Li et al. (eds.), *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1145, https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_14.

31. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *ClinMicrobiolInfect*. 2006;12(4):315–321.

32. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J AntimicrobChemother*. 2011;66(9):2070–2074.

33. Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*. 2016;47:31-37.

34. Bartolleti F, Seco BM, Capuzzo Dos Santos C, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. *EmergInfectDis*. 2016;22(10):1849–1851.

35. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol* 2017; 30:557–596.

36. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? *Pharmacotherapy* 2015; 35:22–27.
37. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin—evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.* *Clin Microbiol Infect* 2018;24:865–70.
38. An TY, Ng LSY. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:864–867.
39. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMG, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3726–3730.
40. Maalej S, Meziou M, Rhimi F, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against *Enterobacteriaceae*. *Lett Appl Microbiol* . 2011; 53:546–551.
41. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, et al. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. *Int J Infect Dis* 2010;14:e596.
42. Moskowitz SM, Garber E, Chen Y, Clock SA, Tabibi S, Miller AK, et al. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1416–1423.
43. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal* 2016; 6:71–79.

44. Perez LR. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan Walk-Away automated system. *APMIS* 2015; 123:951–954.
45. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:4625–4630.
46. Chew KL, La M-V, Lin RT, Teo JW. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr*-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2017; 55:2609–2616.
47. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:2528–2530.
48. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, et al. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1924–1926.
49. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2019. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v9.0_Breakpoint_Tables.pdf.
50. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; CLSI document M100 ED19: 2019. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

51. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. Document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
52. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK and ViridiJS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; 6:791.
53. Yates, J. R. III.. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom* 1998; 33: 1–19.
54. Kostrzewa M, Schubert S. 2016. MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
55. Florio W, Tavanti A, Ghelardi E and Lupetti A. MALDI-TOF MS Applications to the Detection of Antifungal Resistance: State of the Art and Future Perspectives. *Front Microbiol* 2018; 9:2577.
56. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl* 2013;7:767-78.
57. Hrabák J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49:3222-7.
58. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011;49:3321-4.

59. Sparbier K, Schubert S, Weller U, BoogenC, KostrzewaaM. Matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against b-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012;50:927-37
60. Sparbier K, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, KostrzewaM. MALDIbiotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol* 2013;51:3741-8.
61. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann. Transl. Med* 2018; 6:240.

7. ARTIGO

Susceptibility of *Enterobacterales* to Polymyxin B: Evaluation of a simplified method of relative growth by MALDI-TOF MS

Manuscrito enviado para publicação no *JournalofClinicalMicrobiology*.

JCM02035-19

Susceptibility of *Enterobacterales* to Polymyxin B: Evaluation of a simplified method of relative growth by MALDI-TOF MS

Everton Inamine^{a,b,c}, Maiara Carneiro^{b,c,d}, Afonso Luís Barth^{a,b,d}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brazil;

^bLaboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre RS, Brazil;

^cComplexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre RS, Brazil;

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brazil

*Address Correspondence to Afonso Luis Barth, albarth@hcpa.edu.br

Mailing Address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, Porto Alegre, Brazil, 2350 Ramiro Barcelos ST, 90035-903. Porto Alegre, Brazil. Phone/Fax: +55 (51) 33598607.

ABSTRACT

Polymyxin resistance is an emerging problem worldwide. The only reference method for the determination of susceptibility to polymyxins is broth microdilution (BMD). However, BMD is a time consuming and laborious technique. It is necessary to develop new methodologies that provide a faster evaluation of polymyxins susceptibility which would allow more effective treatments. The objective of this study was to evaluate Polymyxin B susceptibility of *Enterobacterales* using the relative growth methodology by MALDI-TOF. A total of 60 isolates (22 resistant and 38 susceptible to Polymyxin B) were evaluated. The categorical agreement of the relative growth (RG) by MALDI-TOF compared to BMD was 96.7% and only two (3.3%) major errors were observed. As the RG based technique is a low cost, simple and rapid procedure (around 4 h), it could be used in routine microbiology laboratories, which already use the MALDI-TOF system to identify bacteria, to evaluate the susceptibility of *Enterobacterales* to Polymyxin B.

KEYWORDS: Polymyxin B, relative growth, MALDI-TOF MS, MBT-ASTRA

INTRODUCTION

The increasing resistance of gram-negative bacteria to various antibiotics is a growing health care problem (1). According to the 2015 World Health Report, infectious diseases account for more than 30% of all deaths worldwide (2) and prompt and correct antibiotic therapy is an indispensable factor for the therapeutic success of patients with bacterial infections (3). Thus, fast and cost-effective approaches to detect resistant bacteria allowing introduction of appropriate actions for therapy and infection control have become important (4).

Unfortunately, there is a lack of new antibiotics to combat multiresistant bacteria, mainly carbapenem-resistant, Gram-negative bacilli. As a result, it led the medical field to reevaluate old drugs considered highly toxic for clinical use. Particularly, the cyclic cationic peptides Polymyxin B and Colistin, which are active only for Gram-negative bacteria, have been re-introduced in the clinical field as “last resort” antimicrobials to treat infections by *Enterobacterales* (5).

The emergence of multidrug resistant (MDR) gram-negative bacteria, in particular *Enterobacterales* resistant to carbapenems, has led to an increase in use of polymyxins in the clinical practice. Polymyxin susceptibility testing is a major challenge because human infections with colistin-resistant Gram-negative bacteria are associated with higher patient mortality (6).

As the standard antibiogram by disk diffusion is not reliable to evaluate the susceptibility to polymyxins and the reference method (BMD) is laborious and time consuming, it is necessary to evaluate other methods to assess the susceptibility to polymyxins. Challenges in testing polymyxin susceptibility include, among other aspects, the low diffusion of polymyxins in agar, the inherent cationic properties of polymyxins and the presence of polymyxin heteroresistance in various bacterial species (7,8, 9, 10).

In recent years, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) has been used as a routine method in microbiology laboratories for rapid and cost-effective identification of microorganisms. Therefore, to expand the use of MALDI-TOF MS in clinical microbiology laboratories to susceptibility testing is an attractive option (11). Recently, a methodology to evaluate antibiotic susceptibility termed MBT-ASTRA (MALDI Biotyper - Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay) was proposed. The MBT-

ASTRA uses a semi-quantitative approach to evaluate bacterial growth after a short incubation in the presence and absence of the antibiotic (12). The MBT-ASTRA requires the use of an internal control (usually a rNaseB protein) to allow the normalization between specific spectra of bacterial proteins in order to calculate the area under the curve (AUC) of the low molecular weight protein peaks. A significant reduction of the AUC of bacterial protein peaks in the presence of the antibiotic compared to bacterial protein peaks in the absence of the antibiotic indicates susceptibility (13). The methodology of MBT-ASTRA assay uses growth rate data to establish the susceptibility of the isolate regardless its resistance mechanism and, therefore, can be used to test all classes of antibiotics.

The aim of this study was to describe an adapted version of the MBT-ASTRA methodology for the determination of Polymyxin B susceptibility of *Enterobacterales*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates: A total of 60 isolates of *Enterobacterales* (3 *Escherichia coli*, 43 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 8 *Enterobacter* species, 4 *Serratia marcescens* and 1 *Morganella morganii*) were evaluated. Twenty-two isolates were resistant and 38 were susceptible to Polymyxin B by BMD. All isolates included in this study were obtained from a previous surveillance study of *Enterobacterales* among clinical isolates in southern Brazil from 2016 to 2017 (14).

Determination of Minimum Inhibitory Concentration: The BMD to determine the MICs of the isolates was performed according to the recommendation of CLSI and EUCAST (15, 16). A range of 0.25 to 64 µg/mL of Polymyxin B sulfate (Sigma-Aldrich Germany) was tested. Polystyrene microtiter plates with 96-well (Greiner Frickenhausen, Germany) and cation-adjusted Mueller-Hinton II broth (BD Difco, USA) were used for the BMD experiments. The microtiter plates were incubated overnight (around 18h) at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ and the MIC was established by visual inspection. We have used the same breakpoints of Colistin as recommended by EUCAST to interpret the results of Polymyxin B, i. e., *Enterobacterales* isolates with Polymyxin B MICs ≤ 2 µg/mL were categorized as susceptible and those with MICs > 2 µg/mL were categorized as resistant (15).

MALDI-TOF MS Relative Growth Assay: Volumes of 200 μ l and 180 μ l of bacterial suspension corresponding to 0.5 McFarland of the isolate were added to two Eppendorf tubes. The tube with 180 μ l was added of 20 μ l of Polymyxin B sulfate at 2 μ g/mL (Eurofarma, Brazil). The tubes were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in ambient air under agitation for 2h. After incubation, the tubes were centrifuged for 2 min at 12.00 rpm and the pellet was washed once with 100 μ l of sterile water and once with 100 μ l of 70% ethanol. Subsequently, bacteria were lysed according to the MALDI Biotyper standard protocol using - 10 μ l of 70% formic acid and 10 μ l of 100% acetonitrile containing RNase B (20×10^3 g/liter; Sigma-Aldrich, Germany) as an internal standard. RNase B was used as an internal standard to which the peaks related to the bacterial proteins of low molecular weight were compared in order to establish a semi quantitative measurement of the proteins content. This semi quantification correlates to the amount of growth of a microorganism in the presence and the absence of an antibiotic. For the present study, the isolates were incubated in BHI media in the presence and absence of Polymyxin B for 2 hours. Spectra were collected in a Microflex LT MALDI-TOF equipment (BrukerDaltonics) using the same configuration setup for microorganisms identification. For data interpretation, spectra were baseline subtracted and the peak picking was performed and normalized to the maximum peak resulting in relative intensity range between 0 and 100. Subsequently, the relative growth (RG) was calculated according to the area under the curve (AUC) by the ratio of the sum of the most three intense peaks from the microorganism profile in the mass range from 4-5kDa, 6-7.5kDa, and 11-15 kDa respectively, versus the sum of relative intensities of the peaks of the internal standard RNase B (4977 Da; 7465 Da and 14924 Da). For all isolates, a cut-off of 0.5 of the median of the RG was applied to achieve separation between susceptible and resistant strains (13) – Figure 1.

MALDI-TOF MS analysis. One microliter of the cell lysate was directly spotted onto a MALDI target plate. Each lysate was spotted in quadruplicate. Dried spots were overlaid with MALDI matrix (10 mg/mL of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [α -HCCA] in 50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid; BrukerDaltonik, Bremen, Germany). After drying the matrix, the target plate was inserted in the Microflex LT/SH mass

spectrometer (BrukerDaltonik GmbH) equipped with a 60-Hz nitrogen laser. The parameter settings were optimized for a mass range between 2.000 to 20.000 Da. An external calibration standard (bacterial test standard [BTS]; BrukerDaltonik GmbH) was used for instrument calibration.

RESULTS

Sixty isolates of *Enterobacterales* were evaluated. A total of 38 isolates were classified as susceptible to Polymyxin B by BMD with MICs varying from 0.125 µg/mL to 2.0 µg/mL. Thirty six susceptible isolates were also classified as susceptible to Polymyxin B by the RG method using the MALDI-TOF as they presented RG values varying from 0.01 to 0.45. The two isolates susceptible by BMD which were classified as resistant by MALDI-TOF presented RG of 0.59 and 0.67 (Table 1).

The 22 isolates resistant to Polymyxin B by BMD presented MIC varying from 4 µg/mL to >64 µg/mL. All the isolates resistant to Polymyxin B by BMD presented RG values higher than 0.5 (from 0.51 to 3.19) and, therefore, were characterized as resistant to Polymyxin B according to MALDI-TOF (Table 2). The categorical agreement of the RG based technique with the BMD was 96.7% and only two (3.3%) minor errors (false resistance) were observed.

We have compared the values of MIC by BMD and the RG by MALDI-TOF and we found that all resistant isolates by BMD with MIC values equal to or greater than 8 µg/mL presented a RG equal to or greater than 0.6; conversely, most susceptible isolates (84%) by BMD presented RG values less than 0.4. However, the correlation between RG and MIC was not satisfactory (Figure 2).

DISCUSSION

Polymyxin B resistant *Enterobacterales* species represent a growing health care problem. Early intervention and use of appropriate antibiotic therapy are crucial to prevent mortality of patients with infection due to Polymyxin B resistant *Enterobacterales*.

Polymyxins susceptibility test remains a serious problem in routine clinical microbiology laboratories, particularly considering the need for rapid and reliable techniques (9). The disk diffusion method, the far most commonly AST used methodology worldwide, has proven not to be a reliable method to test polymyxins (15).

There are a few reports which indicate that the gradient diffusion test (E-test) presented good correlation with the reference BMD technique (17,18), however, other studies showed a high percentage of errors of the gradient diffusion methods with very major errors (VME) of 12% and 26.1% for Colistin and Polymyxin B, respectively (19, 20).

For two automated systems, studies also describe high rates of VMEs for Colistin, where the Phoenix 100 and Vitek 2 systems had percentages of 41.4% and 37.9%, respectively (21).

Recently, publications in the area of resistance detection using MALDI-TOF MS have gained prominence as they may reduce considerably the time needed by the conventional methods which are based on bacterial growth (4,22). MALDI-TOF techniques for antimicrobial susceptibility are based on four different methodologies: 1) search for a "peak resistance pattern" in the MALDI-TOF mass spectrum of a given bacterial isolate; 2) evaluation of induced hydrolysis of β -lactam antibiotics exposed to the bacteria; 3) detection of stable isotope-tagged amino acids (non-radioactive) incorporated into newly synthesized bacterial proteins; 4) evaluation of the relative growth of bacteria exposed to antibiotics. In this study we have chosen the relative growth methodology by MALDI-TOF because this technique can be used for virtually all antibiotics regardless of the bacterial resistance mechanism involved (4).

We used the RG technique and were able to demonstrate that an incubation time of 2h is sufficient to detect resistance to Polymyxin B in all *Enterobacterales* isolates tested. Other studies have suggested that optimal results may require timeframes of 60 min to 4 h of incubation, depending on the bacteria species, on the antibiotic and its concentrations (4, 11-13). We did not test different incubation times as the 2h was the time which best fit in the whole technique procedure (total time around 4 h). In fact, as all resistant isolates by BMD presented RG above 0.5, we can consider that it is not necessary to increase the incubation time to detect resistance to Polymyxin B by MALDI-TOF.

Another advantage of the RG based methodology is that it does not require a specific culture medium as the BMD (11). In our experiments we used BHI broth which is cheaper than Cation-Adjusted Mueller–Hinton used in the BMD. It is possible that other culture broths can also be used for the RG based technique in MALDI-TOF.

It is known that the cationic nature of polymyxins may lead to adhesion of the molecule to plastic materials (23). In this study, we used polypropylene tubes and the results were considered satisfactory to differentiate between polymyxin resistant and susceptible isolates by MALDI-TOF. It seems, therefore, that the polypropylene does not interfere in this methodology. This may be due to the fact that the short incubation time (2 h) is not sufficient to promote significant adhesion of Polymyxin B to the tube. The constant agitation during the incubation of bacteria with the antibiotic may also play a role to avoid the adhesion of the bacteria to the plastic tube.

Considering the total of 60 isolates tested, the RG based MALDI-TOF technique presented a category agreement (CA) 96.7% and only 3.3% major errors (discrepancies); these results indicate that the method is in accordance with the US FDA requirements to approve a new commercial antimicrobial susceptibility testing system (24).

In conclusion, the RG based MALDI-TOF technique presented promising results to differentiate Polymyxin B resistant and susceptible isolates. As this is a rapid technique, it could be used in routine microbiology laboratories which already use the MALDI-TOF to identify bacteria as a low cost and simple procedure to test the susceptibility of *Enterobacter laes* to Polymyxin B.

REFERENCES

1. WHO (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. WHO, Geneva, Switzerland. <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
2. WHO (2015). The World Health Statistics 2015. Geneva:WHO. <https://reliefweb.int/report/world/world-health-statistics-2015>
3. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136:1237–1248. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0087>
4. Spärbier K, Schubert S, Kostrzewa M. MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods*. 2016; 104: 48±54. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.01.008> PMID: 26804565
5. Trimble M, Mlynarcik M, Kolár M, Hancock R. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: a025288 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>
6. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:E23–E30. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12070>.
7. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2013; 51:4106 – 4111. <https://doi.org/10.1128/JCM.02129-13>.
8. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013; 51(6):1678–1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>
9. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J Clin Microbiol* 2017; 55:2573–2582. <https://doi.org/10.1128/JCM.00888-17>
10. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol* 2019; 57:e01390- 18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-18>
11. Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Spärbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid

- resistance detection. J Clin Microbiol 2014; 52 (12): 4155±62. <https://doi.org/10.1128/JCM.01872-14> PMID: 25232164
12. Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. J Clin Microbiol 2016; 54(11): 2820±4. <https://doi.org/10.1128/JCM.01131-16> PMID: 27629893
13. Maxson T, Taylor-Howell CL, Minogue TD. Semi-quantitative MALDI-TOF for antimicrobial susceptibility testing in *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 2017;12(8): e0183899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183899>
14. Dalmolin, TV, Dias GÁ, de Castro LP, Ávila H, Magagnin CM, Zavascki AP, et al. Detection of *Enterobacterales* resistant to polymyxins using Rapid Polymyxins NP test. Braz J Microbiol 2019;50: 425. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00053-x>
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2019. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th informational supplement. CLSI document M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
17. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, et al. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital. J Clin Microbiol 2013;51:1924 –1926. <https://doi.org/10.1128/JCM.00427-13>
18. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, et al. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. Int J Infect Dis 2010;14:e596. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.09.001>
19. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol 2013; 51:4106 – 4111. <https://doi.org/10.1128/JCM.02129-13>
20. Chew KL, La M-V, Lin RT, Teo JW. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr*-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of

Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2017;55:2609–2616. <https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17>

21. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:2528–2530. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx186>

22. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann. Transl. Med* 2018;6:240. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.06.28>

23. Karvanen M, Malmberg C, Lagerback P, Friberg LE, Cars O. Colistin is extensively lost during standard in vitro experimental conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00857-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00857-17>.

24. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems (2009). Department of Health and Human Services

Food and Drug Administration. US. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/class-ii-special-controls-guidance-document-antimicrobial-susceptibility-test-ast-systems>.

Funding

This study was financed in part by the FIPE (Apoio Financeiro a Projetos de Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and by the Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana (INPRA) of FAPERGS and CNPq/Brazil.

Ethical approval

Not required.

Table 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) and relative growth (RG) values of *Enterobacter* less susceptible to polymyxin B by broth microdilution

n°	Isolate	MIC (µg/mL)	RG	n°	Isolate	MIC (µg/mL)	RG
1	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5	0.03	20	<i>K. pneumoniae</i>	1	0.37
2	<i>K. oytoca</i>	0.125	0.01	21	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.22
3	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.45	22	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.67
4	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.45	23	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.01
5	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.08	24	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.2
6	<i>E. coli</i>	0.25	0.39	25	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.05
7	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.01	26	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.22
8	<i>E. cloacaecomplex</i>	2	0.43	27	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.09
9	<i>E. cloacaecomplex</i>	0.125	0.07	28	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.39
10	<i>K. pneumoniae</i>	1	0.1	29	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.38
11	<i>E. cloacaecomplex</i>	0.5	0.37	30	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.21
12	<i>E. aerogenes</i>	0.125	0.04	31	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.05
13	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.22	32	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.04
14	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.59	33	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.02
15	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.39	34	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.01
16	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.43	35	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.01
17	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.07	36	<i>E. cloacaecomplex</i>	0.125	0.04
18	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.07	37	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.17
19	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.1	38	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.09

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) and relative growth (RG) values of *Enterobacteriales* resistant to polymyxin B by broth microdilution

n°	Isolate	MIC (µg/mL)	RG	n°	Isolate	MIC (µg/mL)	RG
39	<i>S. marcescens</i>	64	0.68	50	<i>K. pneumoniae</i>	64	0.72
40	<i>M. morgani</i>	>64	1.16	51	<i>K. pneumoniae</i>	32	1.14
41	<i>K. pneumoniae</i>	4	0.51	52	<i>E. cloacaecomplex</i>	4	0.75
42	<i>K. pneumoniae</i>	32	1.14	53	<i>K. pneumoniae</i>	4	0.51
43	<i>K. pneumoniae</i>	4	0.51	54	<i>E. coli</i>	4	0.67
44	<i>S. marcescens</i>	64	0.92	55	<i>E. aerogenes</i>	16	0.99
45	<i>K. pneumoniae</i>	16	1.14	56	<i>K. pneumoniae</i>	32	0.97
46	<i>K. pneumoniae</i>	32	0.62	57	<i>K. pneumoniae</i>	8	1.04
47	<i>S. marcescens</i>	64	0.92	58	<i>K. pneumoniae</i>	4	0.8
48	<i>E. aerogenes</i>	4	0.52	59	<i>K. pneumoniae</i>	64	1.32
49	<i>S. marcescens</i>	64	0.61	60	<i>K. pneumoniae</i>	64	3.19

Figure1: Mass Spectra (m/z) obtained in the MALDI-TOF of an isolate susceptible (*E.coli*) and an isolate resistant (*K.pneumoniae*) to Polymyxin B. a) Isolates incubated in BHI with 2 µg/mL of Polymyxin B for 2 h; b) Isolates incubated in BHI without Polymyxin B for 2h. Peaks marked with circles indicate the three possible ionization molecules of RNase B (internal control): 4977 Da; 7465 Da and 14924 Da. Note the high intensity of RNase B peaks in the spectra of *E. coli*(susceptible isolate) in the presence of Polymyxin B; conversely, almost no RNase B peaks can be seen in the spectra of *E.coli*in the absence of Polymyxin B. With *K. pneumoniae* (resistant isolate) the RNaseB peaks are almost no visible either in the presence or absence of Polymyxin B.

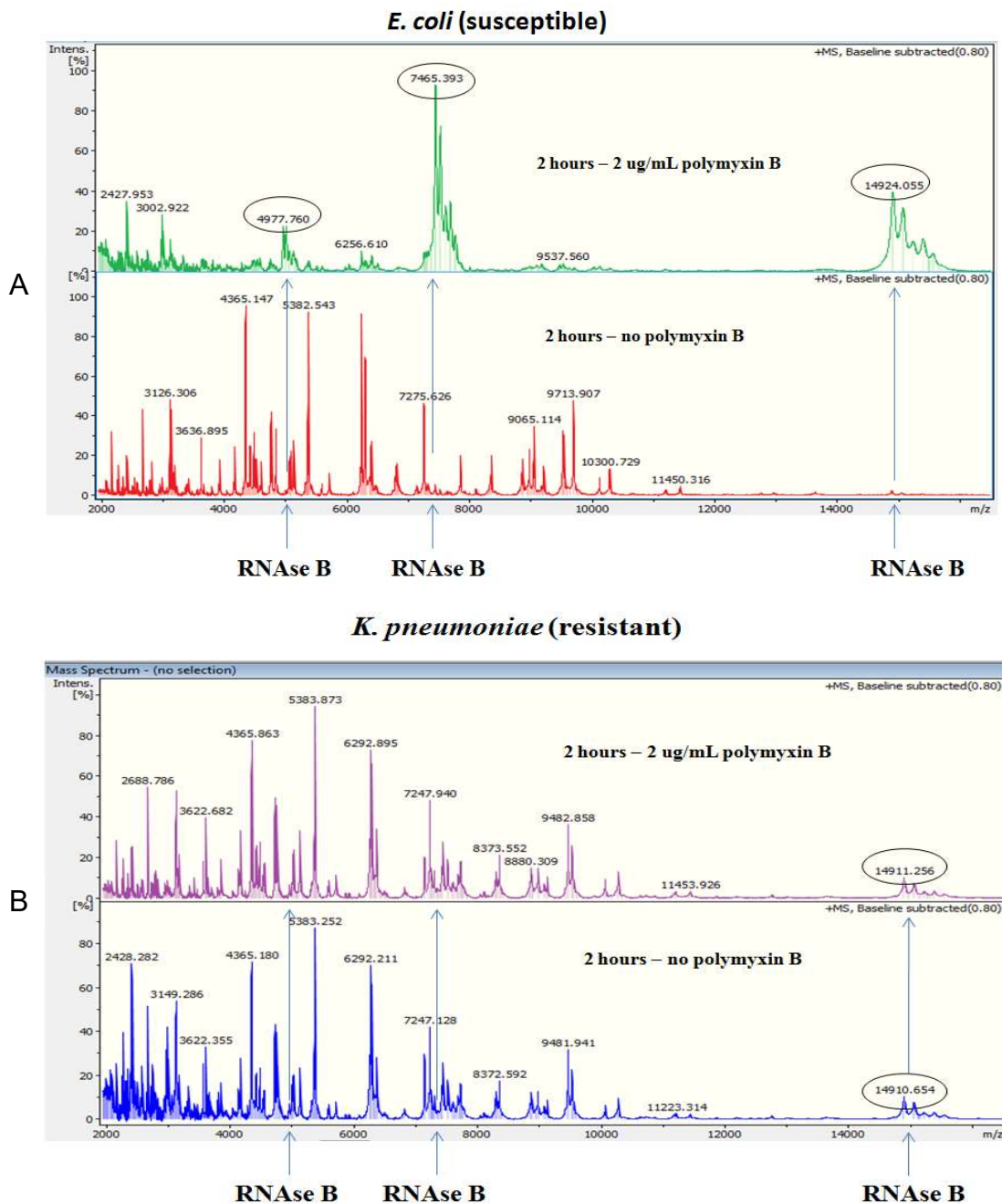
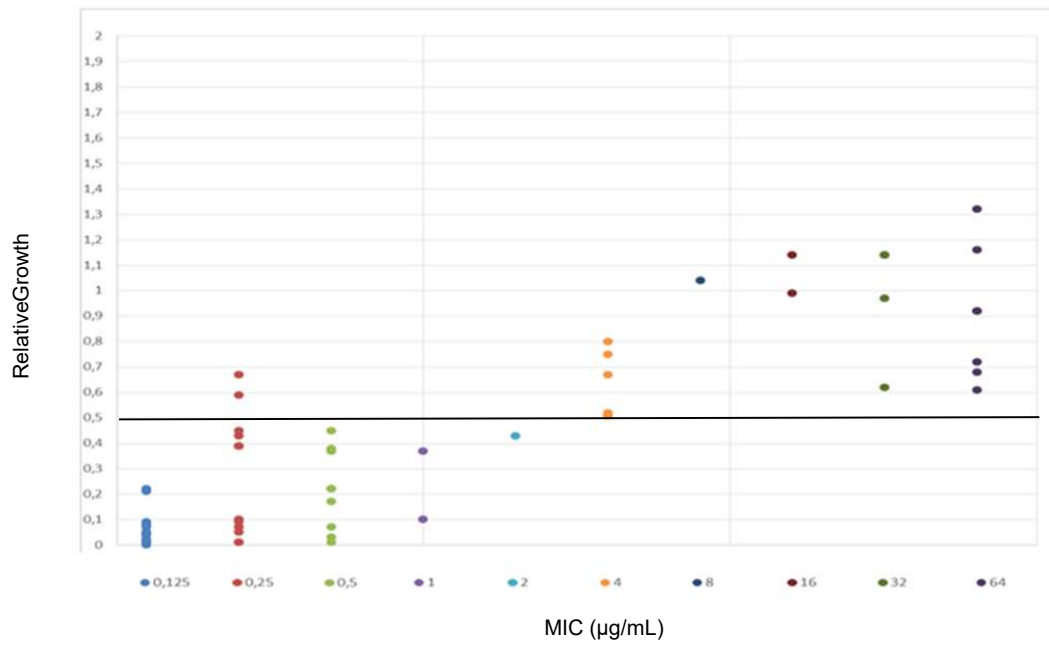


Figure 2: Scatter Plot of the Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$) versus the Relative Growth.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O número de bactérias multirresistentes está aumentando constantemente. Em particular, as espécies de *Enterobacterales* resistentes à polimixina B representam um crescente problema de assistência à saúde. São necessárias medidas eficazes de higiene e monitoramento para impedir a disseminação de cepas resistentes. A intervenção precoce e a antibioticoterapia apropriada têm um impacto direto na mortalidade dos pacientes.

O teste de suscetibilidade à polimixina continua sendo um problema sério na prática clínica, ainda mais se considerarmos a necessidade de testes rápidos e confiáveis (7,8).

A metodologia escolhida de crescimento relativo, não é apenas um método rápido, mas também não se restringe à análise de antibióticos específicos pois independe do mecanismo de resistência envolvido (4). Nesse estudo, utilizando a técnica de crescimento relativo por MALDI-TOF MS, demonstramos que com um tempo de incubação de 2h pode-se detectar a resistência à polimixina B em todos os isolados clínicos de *Enterobacterales* resistentes pela técnica de referência (BMD). A grande maioria (94,7%) dos isolados sensíveis pela BMD a Polimixina B foram também classificados como sensíveis pela técnica de MALDI-TOF.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A técnica proposta de crescimento relativo adaptada de MBT-ASTRA apresentou resultados promissores. Em relação aos procedimentos técnicos, o protocolo possui três etapas que requerem a remoção do sobrenadante. Resultados precisos para a técnica RG dependem muito dessas etapas. A perda de células bacterianas durante essas lavagens compromete decisivamente nos resultados. Seria importante avaliar o impacto dessas variações na concentração celular em novas experiências.

Será necessário ampliar o uso da técnica do crescimento relativo por MALDI-TOF tanto para outras espécies bacterianas visto que nesse estudo, dos 43 dos 60 isolados bacterianos testados eram *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, essa metodologia também deve ser avaliada para outros antibióticos para que o método possa ser efetivamente validado para uso em laboratórios de rotina de microbiologia que já tenham o equipamento de MALDI-TOF MS.

Para esse estudo, estabelecemos uma concentração de 2 µg/mL de polimixina B para diferenciar bactérias sensíveis de resistentes à Polimixina B. Em estudos futuros, sugerimos avaliar o desempenho dessa técnica com diferentes concentrações de antibióticos, para estabelecer a melhor concentração que possa, pelo menos, separar as populações resistentes e sensíveis em especial para antibióticos que tenham a classificação de “intermediário”.

A técnica de crescimento relativo avalia a massa bacteriana na presença e ausência de um determinado antibiótico. Outra sugestão de continuidade em projetos futuros com esta metodologia, seria a de avaliar combinações de antibióticos para verificar a possível ação sinérgica entre eles já que as técnicas atuais são trabalhosas e demoradas.

Os resultados obtidos são promissores e deverão ser incluídos em estudos clínicos que avaliem o impacto da utilização deste ensaio em decisões médicas, verificando seus desfechos como mortalidade e descalonamento.

STARD – Lista de verificação dos itens que devem ser incluídos no relatório de estudos transversais.

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
TITLE OR ABSTRACT			34
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	
ABSTRACT			35
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	35
INTRODUCTION			36
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	36, 37
	4	Study objectives and hypotheses	37
METHODS			37
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	37
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	NA
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	NA
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	NA
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	NA
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication	38, 39
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	37
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	NA
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	38
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	NA
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	NA
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	NA
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	41

	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	NA
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	NA
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	NA
	18	Intended sample size and how it was determined	37
RESULTS			39
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	NA
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	NA
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition	NA
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	NA
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	NA
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	45, 46
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	NA
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	NA
DISCUSSION			39
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	50
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	41
OTHER INFORMATION			
	28	Registration number and name of registry	CAAE:10250018.4.0000.5327
	29	Where the full study protocol can be accessed	PlataformaBrasil
	30	Sources of funding and other support; role of funders	45