

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Determinação da suscetibilidade às polimixinas: avaliação da eluição de disco em caldo
e teste rápido polimixina NP como metodologias alternativas e de fácil aplicação
laboratorial

Roberta Barbizan Mascarello

Porto Alegre, novembro de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Determinação da suscetibilidade às polimixinas: avaliação da eluição de disco em caldo
e teste rápido polimixina NP como metodologias alternativas e de fácil aplicação
laboratorial

Roberta Barbizan Mascarello

Prof^a. Dra. Juliana Caierão

Orientadora

Porto Alegre, novembro de 2020

Esse Trabalho de Conclusão de Curso foi redigido sob a forma de artigo ao qual foi elaborado segundo as normas da revista *Clinical & Biomedical Research*, apresentadas em anexo.

RESUMO

As polimixinas, em diversos cenários clínicos, são a última escolha para o tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes. Assim, e considerando a emergência e disseminação crescente de isolados resistentes, a determinação da suscetibilidade a esses antimicrobianos reveste-se de particular importância. No entanto, a microdiluição em caldo, que é o método de referência de acordo com CLSI e EUCAST, é trabalhosa e requer até 20 horas de incubação. Os outros métodos rotineiramente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica, não são acurados o suficiente para esse fim. Dessa maneira, o objetivo dessa revisão bibliográfica foi avaliar a performance de dois métodos alternativos: eluição de disco em caldo e o teste rápido de polimixina NP. Os dois métodos apresentaram resultados satisfatórios com alta correlação com a microdiluição em caldo. A maioria dos erros ocorreu com os isolados apresentando MICs *borderline*. Apesar disso, podem ser uma boa alternativa para determinar a suscetibilidade às polimixinas. O surgimento de resistência às polimixinas tem se tornado um grande problema mundial, e a detecção correta, através de metodologias rápidas e/ou de fácil execução e com custo/benefício otimizado, é de grande importância para os laboratórios clínicos.

Palavras-chave: polimixinas; bacilos gram-negativos; resistência; eluição de disco em caldo de polimixina; teste rápido de polimixina NP

ABSTRACT

Polymyxins, in several clinical settings, are the last choice for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli. Thus, and considering the emergence and increasing spread of resistant isolates, determining susceptibility to these antimicrobials is of particular importance. However, broth microdilution, which is the reference method according to CLSI and EUCAST, is laborious and requires up to 20 hours of incubation. The other methods routinely used in clinical microbiology laboratories, are not accurate enough for this purpose. Thus, the objective of this literature review was to evaluate the performance of two alternative methods: broth disk elution and the rapid polymyxin NP test. Both methods showed satisfactory results with a high correlation with broth microdilution. Most errors occurred with the isolates with borderline MICs. Despite this, they can be a good alternative for determining susceptibility to polymyxins. The emergence of resistance to polymyxins has become a major worldwide problem, and the correct detection, through rapid and/or easy methodologies and with an optimized cost/benefit, is of great importance for clinical laboratories.

Keywords: polymyxins; gram-negative bacilli; resistance; polymyxin broth disk elution; rapid polymyxin NP test

SUMÁRIO

Introdução	6
Polimixinas.....	9
1. Estrutura	9
2. Espectro de atividade e mecanismo de ação	10
3. Mecanismos de resistência.....	10
Testes de Suscetibilidade	12
Testes Alternativos.....	14
1. Eluição de disco em caldo.....	14
2. Teste rápido de polimixina NP.....	19
Conclusão.....	25
Referências Bibliográficas	26
Anexo 1	35

Introdução

Há cerca de 80 anos, fármacos antimicrobianos seguros e eficazes vêm sendo utilizados na medicina humana para o tratamento de infecções bacterianas, reduzindo consideravelmente a morbidade e mortalidade associadas a essas doenças. Porém, tem sido observada, nos últimos anos, a rápida emergência e disseminação de microrganismos resistentes a esses fármacos (1,2).

A ocorrência de resistência é um fenômeno naturalmente esperado, pois muitos dos determinantes genéticos de resistência circulam nos mais diversos nichos ecológicos desde antes do desenvolvimento e uso clínico dos antimicrobianos, caracterizando as resistências intrínsecas de alguns microrganismos, protegendo essas bactérias em seus habitats naturais. Alguns desses genes evoluíram e têm evoluído, no entanto, para codificarem componentes associados a mecanismos de resistência contra os fármacos antimicrobianos utilizados na prática clínica desde meados da década de 1940, tornando a resistência bacteriana um dos principais desafios no contexto de saúde pública mundial atualmente (1,2).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos resistentes a antimicrobianos, os quais foram divididos em três categorias de acordo com a urgência de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de infecções causadas por eles. O grupo mais crítico inclui bactérias multirresistentes que assolam principalmente hospitais, lares de idosos, pacientes que necessitam de ventiladores mecânicos ou que têm cateteres venosos implantados. Nessa lista, estão incluídos: *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, e *Enterobacteriaceae* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e resistentes aos carbapenêmicos (3,4).

As infecções causadas por bacilos gram-negativos (BGN) multirresistentes são, frequentemente, difíceis de tratar, estão associadas a desfechos clínicos ruins, a altas taxas de morbidade e mortalidade, e se tornaram um grande desafio, especialmente nas instituições relacionadas aos cuidados com a saúde (5). Isso porque tais microrganismos associam suas características intrínsecas de resistência a uma grande habilidade de adquirir resistência através de mecanismos de trocas genéticas horizontais ou de alterações, especialmente mutações, em genes cromossômicos. Dessa forma, eles impõem grande restrição às opções de tratamento (6).

Devido à resistência frente a múltiplos antimicrobianos, e ao limitado número de novos antimicrobianos liberados para uso clínico nos últimos anos, observou-se o interesse clínico em uma classe de antimicrobianos que, há anos, tinha seu uso clínico extremamente limitado: as polimixinas, representadas pela polimixina B e pela colistina (polimixina E). Esses antimicrobianos

foram amplamente utilizados até a década de 1980, e seu uso foi restringido devido aos seus efeitos adversos graves, especialmente nefrotoxicidade e neurotoxicidade. No entanto, sua importância clínica foi retomada especialmente a partir dos anos 2000, como última escolha no tratamento de infecções causadas por *P.aeruginosa* e *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Mais recentemente, seu uso foi expandido para infecções causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, devido à escassez de opções terapêuticas e, também, à sua ação eficaz frente a essas bactérias (7,8).

Diferentemente do que ocorreu na medicina humana, as polimixinas não foram abandonadas e foram utilizadas ao longo das décadas, e em grandes quantidades, na criação de animais para consumo humano. O objetivo de seu uso está pautado na prevenção e tratamento de doenças infecciosas causadas por enterobactérias, e também como aditivo no alimento para a promoção de crescimento animal (9).

A frequência da resistência às polimixinas se manteve relativamente baixa entre animais ao longo dos anos. Porém, a identificação de um gene de resistência localizado em plasmídeos, transferível horizontalmente, o *mcr-1* (*mobile colistin resistance*), em 2015 (10), alertou para a disseminação dessa resistência, com relatos de enterobactérias carreando o gene *mcr-1* em várias partes do mundo, tais como Ásia, África, Europa e América do Norte (11). Devido à isso e à emergência da resistência às polimixinas, em 2016, o Ministério da Agricultura da China proibiu o uso da colistina como aditivo alimentar para promover o crescimento animal, norma que foi seguida por outros países (12,13). O Brasil é um dos maiores exportadores de carnes de aves do mundo, e após uma análise reportando que 60% das amostras de frango eram positivas para *Escherichia coli* carreando o *mcr-1*, o uso da colistina como aditivo alimentar foi banido, também em 2016 (14). Porém, o seu uso continua disponível para o tratamento de doenças em animais de criação, levando a uma pressão moderada de seleção sobre bactérias de origem animal (13).

A ocorrência de resistência às polimixinas tem frequência variada nas diferentes regiões do mundo. Enquanto em alguns países ela ainda é baixa, outros têm enfrentado um aumento crescente nas taxas de resistência, devido ao seu uso abrangente no tratamento de infecções causadas por isolados multirresistentes (15). Um estudo do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, de 2009, que avaliou a atividade da colistina e polimixina B frente aos BGN, relatou baixas taxas de resistência à polimixina B em *Acinetobacter* spp. (0,8%), *P.aeruginosa* (< 0,1%), *E.coli* (< 0,1%) e taxas um pouco maiores em *Klebsiella* spp. (1,4%), demonstrando uma tendência de aumento de resistência para a *Klebsiella* spp. em regiões da Ásia e América Latina, onde as polimixinas se tornaram mais prescritas (16). De fato, estudos mais recentes identificaram um aumento nos níveis

de resistência à colistina entre isolados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes aos antimicrobianos, particularmente entre isolados resistentes aos carbapenêmicos, culminando na ocorrência de surtos causados por esses microrganismos na América do Norte e Europa (9).

No cidade de São Paulo, Brasil, foi relatado um aumento na resistência à polimixina B de 0% em 2011, para 27,1% em 2015, em isolados de *K.pneumoniae* produtoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (17). Esse aumento está associado, pelo menos parcialmente, ao aumento do uso de polimixina B como terapia para as infecções causadas por BGN multirresistentes, e está se tornando um grande desafio para o tratamento clínico dessas infecções. Novas opções de tratamento, tais como a ceftazidima-avibactam e o ceftolozane-tazobactam, foram aprovados recentemente, em 2018, pela ANVISA (18,19). No entanto, esses antimicrobianos são mais custosos, têm atividade limitada frente a algumas carbapenemases e sua disponibilidade ainda é restrita, de forma que a polimixina B permanece sendo muito utilizada no Brasil.

Diante desse cenário, são necessários testes de suscetibilidade que possam guiar o tratamento e monitorar a ocorrência de resistência às polimixinas. Porém, as características físico-químicas das polimixinas e algumas peculiaridades bacterianas dificultam a realização dos testes, incluindo (i) sua natureza catiônica, que acarreta a adsorção do composto aos materiais plásticos usados para realizar os testes; (ii) sua má difusão em ágar devido ao seu grande tamanho molecular; (iii) a ocorrência de heterorresistência em algumas espécies, dificultando a interpretação de alguns testes de suscetibilidade. Tais características fazem com que sejam poucas as metodologias laboratoriais confiáveis para determinar a suscetibilidade às polimixinas (8,20).

O *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) não recomendam disco difusão e as fitas de gradiente de concentração de antibiótico para a determinação da suscetibilidade às polimixinas (21,22), já que apresentam performances abaixo do ideal para esse fim (23,24). Os sistemas automatizados também não são acurados o suficiente para a determinação da suscetibilidade às polimixinas, com relatos de isolados falsos suscetíveis e alta taxa de erros, apresentando uma confiabilidade moderada (9,25,26).

Assim, CLSI e EUCAST definem a microdiluição em caldo (*broth microdilution* - BMD) como método de referência. No entanto, essa é uma metodologia trabalhosa, podendo não ser ajustável à rotina de alguns laboratórios de microbiologia clínica. Além disso, a preparação manual das placas que inclui a diluição seriada do antimicrobiano pode levar a erros significativos (9,20).

Nesse contexto, em 2020 o CLSI endossou, após a publicação de evidências científicas, a utilização de eluição de disco em caldo e diluição em ágar para determinar a suscetibilidade à colistina, porém essas metodologias não foram endossadas para a polimixina B (22,27).

De fato, a maioria dos trabalhos avaliando métodos para determinar a suscetibilidade às polimixinas utiliza a colistina ao invés da polimixina B como substrato. Diversos autores propondo metodologias alternativas realizaram testes apenas com a colistina (27–32). Apesar de a colistina ser mais amplamente utilizada em muitos países, incluindo Europa e várias regiões dos Estados Unidos, outros possuem disponibilidade apenas da polimixina B, como é o caso do Brasil. Além disso, muitas instituições de saúde preferem sua utilização, pois ela possui um perfil levemente mais seguro em relação à nefrotoxicidade se comparado à colistina, o que reforça a necessidade de mais estudos envolvendo a polimixina B (27,33).

Diante do cenário atual, são necessários novos estudos para a avaliação de testes alternativos para a determinação da suscetibilidade especificamente à polimixina B, considerando que, apesar da similaridade, a colistina e a polimixina B são fármacos distintos e devem ser tratados como tal, inclusive no que se refere aos testes de suscetibilidade. Nesta revisão bibliográfica descritiva, são abordados dois testes alternativos de suscetibilidade à polimixina B: eluição de disco em caldo e o teste rápido de polimixina NP. Assim, o objetivo é revisar a performance desses testes em relação à microdiluição em caldo, bem como os aspectos relacionados à praticidade de realização, considerando a aplicabilidade para os laboratórios de microbiologia clínica.

Polimixinas

1. Estrutura

As polimixinas foram isoladas pela primeira vez em 1947, a partir da bactéria *Paenibacillus polymyxa* (34). Essa classe de antimicrobianos é composta por cinco polimixinas diferentes: A, B, C, D, e E, sendo que apenas a B e a E (colistina) têm aplicabilidade clínica (5). São peptídeos policatiônicos constituídos por um anel heptapeptídico, com uma cadeia lateral tripeptídica, resíduos de ácido diaminobutírico (Dab), os quais são policatiônicos em pH 7,4, e com uma cauda de ácido graxo N terminal. Devido às suas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, são anfipáticas, o que é essencial para sua atividade (35).

A polimixina B e a colistina possuem estrutura muito semelhante, diferindo apenas por um aminoácido na posição 6 do anel heptapeptídico, sendo uma fenilalanina e uma leucina, respectivamente (35). No entanto, apesar desta grande semelhança estrutural, colistina e polimixina B possuem perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos (PK/PD) distintos. A polimixina B possui

maiores variações de picos e vales de concentração sérica, enquanto que a colistina possui uma concentração mais “plana”, o que pode resultar em aumento da exposição do antimicrobiano às células renais, sugerindo para a polimixina B um perfil relativamente mais seguro de toxicidade renal. São recomendadas para a colistina, doses de manutenção mais elevadas, a fim de otimizar as concentrações séricas, o que pode contribuir diretamente para o risco de nefrotoxicidade (33).

Além disso, a colistina é administrada como um pró-fármaco inativo, o colistimetato de sódio (CMS), enquanto a polimixina B é administrada via intravenosa na sua forma ativa como sal sulfato. O uso do CMS tem sido associado a mais casos de nefrotoxicidade, devido aos compostos múltiplos que são formados na conversão em colistina (36).

2. Espectro de atividade e mecanismo de ação

As polimixinas não são ativas contra cocos gram-negativos, bactérias gram-positivas e bactérias anaeróbias. Porém, apresentam ampla atividade contra os bacilos gram-negativos, como membros da ordem *Enterobacterales* e bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose, tais como *A.baumannii*, *P.aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. No entanto, alguns gêneros, como *Burkholderia* spp. e algumas espécies de *Enterobacterales*, como é o caso de *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp. e *Serratia marcescens* apresentam resistência intrínseca (9).

Seu mecanismo de ação relaciona-se diretamente à sua estrutura. O resíduo de ácido diaminobutírico (Dab), presente na estrutura das polimixinas, torna a molécula carregada positivamente, ocorrendo a interação desse resíduo com os grupos fosfato dos lipídeos da membrana dos bacilos gram-negativos, especificamente o lipídeo A, que são carregados negativamente. Essa interação entre as polimixinas e o lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) desloca íons Mg^{2+} e Ca^{2+} , o que desestabiliza o LPS, causando a ruptura da membrana celular bacteriana e o vazamento do conteúdo citoplasmático, com a consequente morte celular (5,9). Além disso, devido a ligação das polimixinas ao lipídeo A do LPS, ocorre a neutralização da endotoxina liberada pela bactéria durante a lise celular (9).

As polimixinas possuem, ainda, mecanismos de ação secundários, tais como a capacidade de inibir as enzimas respiratórias vitais na membrana bacteriana, como as NADH-quinona oxidoreductase tipo II (NDH-2) (37).

3. Mecanismos de resistência

Modificações no LPS que impeçam a ligação das polimixinas, são a essência da resistência à esses fármacos. Diversos gêneros de bactérias, tais como *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*,

Enterobacter spp. e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, apresentam cepas que desenvolveram mecanismos de resistência adquirida que modificam a estrutura do LPS, de forma semelhante ao que é visto na resistência intrínseca de *Proteus* spp., *Providencia* spp., e *Serratia* spp., dentre outras (5,9).

A modificação do LPS ocorre devido a mutações nos sistemas de transdução de sinal de dois componentes que regulam os genes envolvidos na síntese do LPS. O principal mecanismo é a adição de resíduos de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PEtN), que são carregados positivamente, no lugar de um grupo fosfato (carregado negativamente) no lipídeo A (38).

Quando o microrganismo detecta situações de estresse, como condição de crescimento com baixo Mg^{2+} , Ca^{2+} , pH ácido, alta concentração de Fe^{3+} e presença de compostos catiônicos, como as polimixinas, as enzimas histidina quinases PhoQ e PmrB ativam, via fosforilação, o sistema regulador de dois componentes PhoP-PhoQ e PmrA-PmrB, respectivamente. Em seguida, ocorre a ativação dos *operons* *arnBCADTEF* e *pmrCAB*, levando à síntese e adição de L-Ara4N e PEtN ao lipídeo A (8,15).

Essa ligação de resíduos com carga positiva ao lipídeo A reduz sua carga negativa, diminuindo a afinidade pelas polimixinas carregadas positivamente, o que leva à resistência (38).

Outro mecanismo descrito inicialmente em isolados de *A.baumannii*, envolve a inativação de genes de biossíntese do LPS, seja por inserções ou deleções nesse *operon*, resultando na perda completa do lipídeo A, impedindo a ligação das polimixinas. Como forma de compensar a integridade da membrana externa, os isolados resistentes regulam positivamente a expressão de genes de biossíntese e alterações na produção de proteínas, responsáveis por uma membrana externa funcional e que contribui para a sobrevivência da bactéria na ausência de LPS (5,39).

Em relação à *K.pneumoniae*, a inativação do gene *mgrB*, que é um regulador negativo do sistema PhoP-PhoQ, demonstrou ser o principal, embora não o único, mecanismo de resistência às polimixinas. Em um estudo realizado na cidade de São Paulo, Brasil, dez isolados resistentes à polimixina B exibiram interrupção desse gene por sequências de inserção ou mutações *missense* (40). Ainda, a presença da cápsula polissacarídica aniônica em *K.pneumoniae* atua como uma barreira protetora. Essa cápsula é conectada ao LPS do microrganismo por uma interação iônica, estabilizada por cátions divalentes. Na presença das polimixinas que são compostos catiônicos, ocorre a perturbação dessas interações, causando a liberação dos polissacarídeos capsulares

aniônicos, que aprisionam os peptídeos antimicrobianos. Esse mecanismo colabora para a diminuição da quantidade de fármaco disponível, podendo levar à resistência às polimixinas (41).

Em 2015, na China, foi caracterizado, pela primeira vez, um gene de resistência às polimixinas localizado em plasmídeo, o *mcr-1*, em um isolado de *E.coli* recuperado de animais de criação para consumo humano. Esse gene codifica enzimas modificadoras do LPS, as fosfoetanolamina transferases, que adicionam PEtN ao lipídeo A. A partir deste primeiro relato, houve a identificação de variantes dos genes *mcr*, *mcr-1* a *mcr-10* (42–47). Desde então, o gene *mcr* e suas variantes foram identificados em isolados bacterianos recuperados de humanos, animais, alimentos e amostras ambientais, em diversas regiões do mundo (10,15,43,48).

No Brasil, o primeiro isolado clínico positivo para o *mcr-1* foi descrito em 2016 (49). Na região Sul do Brasil, já foram descritas amostras clínicas positivas para o *mcr-1*. Em 2017, houve a identificação do primeiro isolado recuperado de amostra humana, de *E.coli* produtor de KPC e também positivo para o gene *mcr-1*, na cidade de Porto Alegre, Brasil (50). Em seguida, houve a descrição de um isolado de *K.pneumoniae* produtor de KPC positivo para *mcr-1*, recuperado de *swab* retal (51). Em 2018, foram identificados isolados clínicos recebidos em um laboratório no estado do Paraná, de *E.coli* positivas para o *mcr-1*, destacando um número de 26 isolados carregando esse gene e que apresentaram MIC de 2 µg/mL (52). Outro estudo, relata a presença desse gene em bactérias recuperadas de hemocultura (53). Em 2020, foi descrito o primeiro isolado clínico no estado de Santa Catarina, carregando o gene *mcr-1.1* (54).

Apesar da rápida disseminação de plasmídeos carregando genes *mcr*, sua prevalência é, até o momento, mais relevante em isolados bacterianos recuperados de animais. Em amostras de origem humana, a resistência ainda está predominantemente associada a alterações cromossômicas, sendo que o percentual de isolados bacterianos carregando genes *mcr* é, até então, relativamente baixo (48,51,52,55).

Testes de Suscetibilidade

Conforme comentado anteriormente nesse texto, CLSI e EUCAST recomendam microdiluição em caldo (BMD) como método de referência para definir suscetibilidade às polimixinas (21,22). Até pouco tempo, esses comitês não apresentavam pontos de corte clínicos definidos para enterobactérias em relação à polimixina B. O CLSI recomendava a utilização dos pontos de corte de colistina para a polimixina B e o EUCAST possuía apenas pontos de corte epidemiológicos para polimixina B. Em 2020, baseado em evidências científicas (27), o CLSI

reforçou que colistina e polimixina B, apesar de semelhantes, devem ser tratadas como fármacos diferentes, por isso, devem possuir pontos de corte destinados a cada uma.

No documento do CLSI de 2020, foram publicados pontos de corte para colistina e polimixina B para *Enterobacterales*, *P.aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (Tabela 1). Para essas bactérias, não foi definida a categoria de “sensibilidade”, apenas categorias “intermediária” e “resistente”. Essa decisão foi baseada em dados clínicos e de PK/PD que sugerem que esses fármacos têm eficácia clínica limitada, independentemente da concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentration* – MIC) obtida, e por isso não devem ser avaliados como suscetíveis (22).

Tabela 1. Pontos de corte clínico de Colistina e Polimixina B pelo CLSI (22).

Patógeno	Antimicrobiano	Interpretação e Pontos de Corte de MIC (µg/mL)	
		Intermediário	Resistente
<i>Enterobacterales</i>	Colistina	≤ 2	≥ 4
	Polimixina B	≤ 2	≥ 4
<i>P.aeruginosa</i>	Colistina	≤ 2	≥ 4
	Polimixina B	≤ 2	≥ 4
<i>Acinetobacter</i> spp.	Colistina	≤ 2	≥ 4
	Polimixina B	≤ 2	≥ 4

Além da BMD, no documento de 2020, o CLSI descreve a possibilidade de utilização de dois testes alternativos: a eluição de disco em caldo (*broth disk elution* - BDE) e a diluição em ágar. No entanto, deve-se ressaltar que eles foram aprovados pelo comitê para utilização com colistina. As mesmas metodologias utilizando polimixina B não foram avaliadas e os testes descritos para a colistina não podem ser adaptados para a polimixina B. Portanto, apenas a BMD é recomendada para avaliar a suscetibilidade à polimixina B pelo CLSI, e também pelo EUCAST (22,27).

Dessa forma, é fundamental a avaliação de métodos para a determinação da suscetibilidade especificamente para a polimixina B. Como já descrito anteriormente, muitos países ainda utilizam a polimixina B como forma de tratamento para infecções causadas por BGN multirresistentes, como é o caso do Brasil. Ainda, a polimixina B apresenta menos efeitos tóxicos renais em comparação com a colistina, o que faz com que algumas instituições prefiram utilizá-la (27,33). Enquanto novos agentes antimicrobianos, tais como as novas combinações de beta-lactâmicos com inibidores de

beta-lactamases não estão disponíveis em todas as partes do mundo, ou essa disponibilidade é restrita, deve-se avaliar maneiras de facilitar a rotina laboratorial para a determinação da suscetibilidade à polimixina B.

Os resultados de estudos avaliando disco difusão e fitas com gradiente de concentração do antimicrobiano têm sido ruins (23,24) e o grande problema desses métodos baseados em difusão está na estrutura das polimixinas, que são moléculas de alto peso molecular e catiônicas, e por isso não se difundem bem no ágar utilizado para esses ensaios. Por esse motivo, a detecção de resistência se torna errônea, com relatos de isolados resistentes que foram considerados falsamente suscetíveis (9).

Fitas de gradiente de concentração do antibiótico, tais como o Etest[®], apresentam porcentagem de erros para polimixina B tão altas quanto 26,1% e para colistina de 15,7%. Os resultados subestimam a resistência aos antimicrobianos, sendo descritos níveis de suscetibilidade à polimixina B muito maiores para o Etest[®] (97%) em comparação com BMD (77%) (23,24). Ainda, quando testado apenas *K.pneumoniae* produtoras de KPC, a porcentagem de erros para o Etest[®] parece ser ainda maior (56). O disco difusão também apresenta resultados de falsa suscetibilidade, com erros maiores de até 11,5% para a polimixina B (23).

Um documento publicado em conjunto pelo CLSI e EUCAST recomenda o método de BMD padrão ISO-20776, que preconiza o uso de placas de poliestireno simples com sais de sulfato de polimixinas, sem o uso de aditivos como o polissorbato-80 (P-80) ou outros surfactantes (57). Mesmo tendo conhecimento de que o P-80 alivia a adsorção do antimicrobiano aos plásticos das placas, o seu uso não é recomendado, pois ele apresenta um efeito sinérgico com as polimixinas e possui leve atividade antibacteriana (8).

Apesar de ser considerado o método de referência, a BMD apresenta alguns problemas como o fato de ser trabalhosa e a preparação manual das soluções antimicrobianas poderem levar a erros significativos. Ainda, há relatos de resultados de MIC não interpretáveis devido à presença de *skipped wells*, ou seja, poços que não apresentam crescimento, enquanto em poços com concentrações mais altas de antimicrobianos, o crescimento é observado. Isso pode ser causado pelo fenômeno de heterorresistência, observado mais frequentemente em algumas espécies de bactérias, tais como *Enterobacter* spp. e *A.baumannii* e que se caracteriza pela presença de subpopulações bacterianas com níveis maiores de resistência ao antimicrobiano do que o resto da população em uma mesma cultura (58).

Estudos com testes alternativos vêm sendo realizados a fim de estabelecer, um método confiável, barato e de bom desempenho em laboratórios clínicos de microbiologia. A seguir, serão discutidas as metodologias de eluição de disco em caldo (BDE) e o teste rápido de polimixina NP.

Testes Alternativos

1. Eluição de disco em caldo

O método de BDE baseia-se na eluição do conteúdo de discos de antimicrobiano em caldo Mueller-Hinton, à temperatura ambiente, seguido da inoculação de uma concentração definida de suspensão bacteriana. O crescimento de isolados resistentes nessa solução é observado após a incubação por 16-20h a 35°C (29).

Essa metodologia foi originalmente descrita em meados da década de 1970 e 1980 para determinar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias à antimicrobianos como penicilina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e beta-lactâmicos como moxalactam e piperacilina (59–61). BDE vem sendo avaliado recentemente para determinar a suscetibilidade às polimixinas, a fim de comprovar sua eficácia e facilidade de execução para os laboratórios clínicos. Os primeiros estudos descritos foram sobre a eluição de disco de colistina (CBDE) (27–29), seguido de apenas um estudo que avaliou a execução da eluição do disco de polimixina B (PBDE) (62).

Simner *et al.* (2019) realizaram o primeiro estudo avaliando a performance de eluição de discos de colistina, comparando com o método de referência, BMD. Foram analisados três conjuntos de isolados clínicos, resultando num total de 172 bactérias, incluindo enterobactérias, *P.aeruginosa* e *A.baumannii*. O método de CBDE foi realizado com quatro tubos por isolado, contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (*cation-adjusted Mueller-Hinton broth - CA-MHB*), onde foram adicionados 0, 1, 2 e 4 discos de colistina de 10 µg, resultando em uma concentração final de 0 (controle de crescimento), 1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorresse a eluição do antibiótico dos discos no caldo. Os inóculos bacterianos foram preparados suspendendo colônias frescas em uma solução salina até atingir turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Dessa suspensão, uma alíquota de 50 µL foi adicionada a cada tubo, resultando em uma concentração final de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL de bactéria. A MIC foi determinada visualmente após 16-20h de incubação a 35°C, observando-se a turvação do meio nos diferentes tubos, indicando crescimento bacteriano (29).

Dalmolin *et al.* (2019) avaliaram o desempenho de três variações de eluição com volumes diminuídos dos reagentes, a microeluição em caldo de colistina (CBM), teste de placas de microeluição (MPT) e um teste de tubo de ensaio (CSTT). Os testes foram realizados como descrito por Simner *et al.* (2019), com algumas modificações: a eluição dos discos foi feita em temperatura ambiente por 60 minutos; para o MPT a solução CA-MHB com a colistina eluída foi fracionada a 200 µL em cada poço de placas de microtitulação; o CSTT foi realizado em tubo de ensaio com apenas uma concentração final de 2 µg/mL de colistina, equivalente ao ponto de corte para suscetibilidade (28).

Um estudo multicêntrico foi realizado por Humphries e colaboradores (2019) avaliando 627 testes de CBDE em isolados de enterobactérias, *P.aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Os testes foram realizados por três laboratórios, onde cada um avaliou um mesmo painel de isolados, a fim de determinar a concordância interlaboratorial, e ainda, avaliaram uma coleção de isolados clínicos próprios. Alguns isolados foram excluídos da análise devido a diversos fatores, como resultados discordantes de BMD e a presença de *skipped wells* observados mesmo após as repetições dos testes, de forma que não foi obtida a MIC de referência para comparação dos resultados. *A.baumannii* obteve a maioria dos resultados discordantes, refletindo em 17 isolados excluídos do estudo. O teste de CBDE foi executado como descrito por Simner *et al.* (2019) porém, as concentrações finais de colistina obtidas foram de 0 µg/mL, 0,4 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL (27).

Os três estudos realizaram a comparação dos resultados de CBDE e BMD, definindo a concordância categórica – CA (*categorical agreement* - porcentagem de isolados com a mesma categoria de resultado – resistente/suscetível – comparando com BMD), concordância essencial – EA (*essential agreement* - porcentagem de isolados com MICs dentro de ± 1 diluição da BMD), erros maiores – ME (*major errors* - resistente pelo novo método e suscetível por BMD) e erros muito maiores – VME (*very major errors* - suscetível pelo novo método e resistente por BMD). Se CA e EA fossem $\geq 90\%$ e ME e VME $\leq 3\%$, os resultados eram considerados aceitáveis (27–29). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos para o método de CBDE em comparação com o método de referência BMD.

Referência	Método	Total de isolados	Enterob ^a	NF ^b	CA(%)	EA(%)	ME(%)	VME(%)
Simner et al. (2019) (29)	CBDE	172	114	58	98	99	0	8
Dalmolin et al. (2019) (28)	CBM	85	68	-	91,18	95,59	16	4,65
			-	17	76,47	82,35	33,33	12,5
	MPT		68	-	85,29	98,53	20	11,63
			-	17	76,47	76,47	22,22	25
	CSTT		68	-	91,18	-	12	6,98
			-	17	82,35	-	0	37,5
Humphries et al. (2019) (27)	CBDE	627	348	279	97,9	94,4	0,9	3,2

^a– Número de isolados pertencentes à ordem *Enterobacterales*.

^b– Número de isolados não fermentadores da glicose (*P.aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.).

Para Simner *et al.* (2019), os resultados obtidos foram promissores. Foi observado um VME de 8% pois, dos 6 isolados de *E.coli* que carregavam *mcr-1* avaliados no estudo, 3 deles apresentaram resultados falso-negativos. A partir desse dado foi recomendado que resultados de MIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$ obtidas por CBDE, devem ser confirmados pelo método de BMD, verificando a presença de genes *mcr*. Ainda, alguns isolados apresentaram *skipped wells* por BMD, mas isso foi resolvido pela repetição do teste (29).

Dalmolin *et al.* (2019), descreveu que 34 isolados eram suscetíveis (MIC $\leq 2\mu\text{g/mL}$) e 51 eram resistentes (MIC $> 4\mu\text{g/mL}$) à colistina, pelo método de BMD. Para o teste de CBM, 3 isolados resistentes apresentaram MIC $\leq 2\mu\text{g/mL}$, e 7 isolados suscetíveis demonstraram resistência por esse método, de modo que a maioria dos resultados divergentes foram observados para BGN não fermentadores da glicose, resultando em um ME de 33,33% e VME de 12,5%. Para os métodos de MPT e CSTT, ocorreram 14 e 9 discordâncias categóricas, respectivamente, destacando um VME de 37,5% para não fermentadores da glicose pelo teste de CSTT (28).

As enterobactérias exibiram resultados satisfatórios, mesmo que alguns resultados discrepantes tenham ocorrido em isolados que apresentaram MIC de 2 a 4 µg/mL por BMD, que equivalem aos pontos de corte. Isso resulta em mudanças categóricas, apresentando os valores de ME e VME descritos na Tabela 2. Os BGN não fermentadores da glicose apresentaram resultados insatisfatórios, porém o número de isolados avaliados para esse grupo foi restrito (20%), o que pode ter sido uma limitação (28).

Para Humphries *et al.* (2019), a EA e CA foram de 94,4% e 97,9%, respectivamente. As discrepâncias categóricas ocorreram principalmente para *A.baumannii* e *E.coli* produtoras de *mcr-1*, que apresentam MICs próximas ao ponto de corte (27), como descrito também por Simner *et al.* (2019) (29). De fato, foram descritos para *Acinetobacter* spp. um VME de 5,6% e ME de 3,3% (27).

A partir dos resultados de Humphries *et al.* (2019) (27), o CLSI endossou o método de CBDE para determinar a suscetibilidade de colistina em enterobactérias e *P.aeruginosa*, não sendo recomendado para *Acinetobacter* spp. devido às altas taxas de erros e o grande número de isolados excluídos desse estudo.

Diante do exposto, o CBDE se mostrou um método prático, eficiente e confiável, apresentando valores de CA aceitáveis (acima de 90%), principalmente para enterobactérias. No entanto, nenhum teste de eluição especificamente para a polimixina B havia sido descrito, até Cielo *et al.* (2020) publicarem o primeiro estudo avaliando o método de eluição do disco de polimixina B (PBDE), como um teste de triagem para detectar enterobactérias resistentes à polimixina B (62). O método foi realizado de forma semelhante à CBDE descrito por Simner *et al.* (2019) (29), devendo-se atentar ao fato de que os discos de polimixina B comercialmente disponíveis possuem 300 U de antimicrobiano, que equivale a 30 µg do fármaco. Portanto, o volume de CA-MHB utilizado foi maior. Foi utilizada a única concentração de 2 µg/mL de polimixina B (um disco em 15 mL de CA-MHB), a qual equivale ao ponto de corte descrito pelo CLSI, permitindo, assim, uma diferenciação qualitativa entre isolados susceptíveis e resistentes (62).

Foram avaliados 196 isolados de enterobactérias. O PBDE apresentou excelentes resultados com uma CA de 99,5%, e apenas um isolado de *K.pneumoniae* com MIC \geq 4 µg/mL foi caracterizado como um falso-negativo. Isso refletiu em um VME de 1,11% e o ME foi de 0% (62).

De fato, os isolados que apresentam MICs próximas ao ponto de corte se mostram um desafio quando testes de suscetibilidade são avaliados, já que são esses isolados que estão frequentemente associados aos VME e ME encontrados. Isso porque a variação aceita de diluição \pm

1, implica, nesses casos, em mudanças categóricas para esses isolados, como podemos perceber nesse estudo (62), e também no estudo de Dalmolin *et al.* (2019) e Humphries *et al.* (2019) (27,28).

O estudo de Cielo *et al.* (2020) (62) não incluiu bactérias que carregavam o gene *mcr*, o que pode ter sido uma limitação, e avaliou apenas uma concentração de 2 µg/mL de polimixina B, de forma que, estudos envolvendo concentrações mais baixas e altas devem ser realizados a fim de verificar a possibilidade do método de definir de forma acurada a MIC.

É importante ressaltar que o material utilizado para realizar a BDE são tubos de vidro, exceto na variação utilizando microplacas proposta por Dalmolin *et al.* (2019), o que evita a adsorção das polimixinas aos plásticos usados em outras técnicas, como a BMD, eliminando, assim, um interferente na metodologia (28). Porém, para o teste de microplacas de Dalmolin *et al.* (2019) foi obtido um VME de 25% para BGN não fermentadores da glicose, enquanto que para o teste de tubos de ensaio (CSTT) o VME chegou a 37,5%. No entanto, no CSTT foi avaliada apenas a concentração de 2 µg/mL de colistina, o que pode ter influenciado. Para o teste de microeluição (CBM) obteve-se VME de 12,5% para BGN não fermentadores da glicose, um resultado melhor se comparado ao teste de microplacas (28).

Deve-se ressaltar que a BDE é uma metodologia barata e fácil de realizar, os materiais necessários são acessíveis e os resultados foram precisos, tanto para a colistina quanto para a polimixina B, e demonstrou um bom desempenho com valores de CA altos. Cabe comentar que o *Food and Drug Administration* (FDA) preconiza como aceitáveis valores de VME $\leq 1,5\%$ e, utilizando esses parâmetros, os testes teriam apresentado performance abaixo do esperado (63).

Algumas limitações foram relatadas e novos estudos são fundamentais para comprovar a confiabilidade desse método, principalmente para a polimixina B. São necessários novos trabalhos com um número maior de isolados de BGN não fermentadores de glicose, bactérias produtoras de *mcr* e concentrações distintas de antimicrobiano. Cabe ressaltar também que, apesar das vantagens, a BDE demanda tempo, exigindo a incubação *overnight*. Dessa forma, métodos mais rápidos poderiam ter maior aplicabilidade, como é o caso do teste rápido de polimixina NP.

2. Teste rápido de polimixina NP

Esse método foi desenvolvido para detectar a resistência à colistina ou polimixina B em *Enterobacteriales*. É um teste rápido que apresenta resultados em até 4 horas de incubação. Ele é capaz de identificar a metabolização de glicose pelas bactérias, caracterizando crescimento bacteriano em uma concentração definida de antimicrobiano. Na presença de bactérias

fermentadoras da glicose, a cor do meio muda de laranja para amarelo, pela ação do indicador de pH vermelho de fenol, evidenciando a formação de metabólitos ácidos (64).

O teste foi desenvolvido primeiramente por P. Nordmann e L. Poirel em 2016. São utilizados dois reagentes: o primeiro é uma solução estoque de polimixinas, que utiliza sulfato de colistina ou polimixina B em pó, diluídos em meio CA-MHB em tubos de vidro. O segundo reagente é a solução rápida de polimixina NP, obtida pela mistura de CA-MHB (2,5%), o indicador de pH vermelho de fenol (0,005%) e D (+) - glicose anidra a 10% (1%). A solução deve ser pré-aquecida a 37°C antes do uso para evitar atraso no crescimento bacteriano (64).

No estudo pioneiro, foram avaliados 200 isolados recuperados de amostras clínicas coletadas de diversas regiões do mundo, incluindo 135 enterobactérias resistentes e 65 suscetíveis às polimixinas. As MICs para todos os isolados foram obtidas pelo método referência, BMD (64).

O experimento foi realizado com a colistina. O inóculo bacteriano foi preparado com turvação correspondente aos tubos 3,0-3,5 da escala de McFarland. O teste foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. A suspensão bacteriana foi inoculada em 2 poços, um contendo colistina e o outro não. Os controles negativo e positivo foram realizados da mesma forma. A concentração final de colistina em cada poço foi de 3,75 µg/mL e a concentração de bactéria foi de 5×10^5 UFC/mL. A placa foi incubada à 35°C por 4 horas em ar ambiente, sem lacrar a placa, sem agitação, e as leituras foram realizadas após cada hora de incubação (64).

Isolados foram considerados resistentes (teste positivo) se conseguissem crescer na presença de colistina, tornando o meio amarelo, e suscetíveis (teste negativo) se não houvesse crescimento na presença de colistina, não alterando a cor do meio. Dos 65 isolados suscetíveis, apenas 3 apresentaram resultados falso-positivos, os quais possuíam MICs *borderline*. De 135 isolados resistentes, apenas um isolado de *E.coli* apresentou um resultado falso-negativo. Dessa forma, houve uma correlação muito satisfatória entre os resultados de BMD e o teste NP, evidenciando uma sensibilidade de 99,3% e especificidade de 95,4% (64).

Nesse mesmo estudo, Nordmann *et al.* (2016) executou o teste rápido de polimixina NP utilizando a polimixina B, porém avaliando apenas 20 isolados suscetíveis e 20 resistentes a esse antimicrobiano. Os resultados foram iguais aos obtidos com a colistina em termos de performance do método. O teste foi realizado também em outras condições, como diferentes meios de cultura, modos de incubação, mudanças no indicador de pH, e alcançou resultados menos satisfatórios (64).

A partir dessa primeira publicação, diversos outros autores avaliaram essa metodologia em diferentes populações bacterianas. A Tabela 3 apresenta os resultados desses estudos, de modo a comparar e avaliar o desempenho do teste em diversos contextos.

Tabela 3. Desempenho do teste rápido de polimixina NP, de acordo com diferentes estudos.

Referência	Especificações	Total de Isolados	BMD		Polimixina NP		Sens e Esp (%)
			S	R	Negativo	Positivo	
Nordmann et al. (2016) (64)	-	200	65	135	62	134	99,3 e 95,4
Jayol et al. (2016) (65)	Hemoculturas	73	16	56	16	55	98,2 e 100
Jayol et al. (2017) (25)	Inclui isolados <i>mcr</i> positivos	123	40	83	39	82	98,3 e 97,5
Simar et al. (2017) (66)	Polimixina B e apenas <i>Enterobacter</i> spp.	143	118	25	118	7	25 e 100
Poirel et al. (2017) (67)	Inclui isolados <i>mcr</i> positivos	105	35	70	35	70	100
Yainoy et al. (2018) (68)	Isolados com MIC próxima ao ponto de corte	339	104	235	100	235	100 e 95,9
Jayol et al. (2018) (69)	Versão industrial/ <i>homemade</i>	223	78	155	74/74	153/152	98,1/98,7 e 94,9
Malli et al. (2018) (26)	<i>K.pneumoniae</i>	131	33	98	27	97	99 e 82
Malli et al. (2019) (70)	Hemoculturas	132	115	13	115	17	100 e 96,7
Mitton et al. (2019) (24)	-	215	56	159	59	160	98,1 e 98,2
Shoaib et al. (2020) (31)	<i>Enterobacterales</i> resistentes aos carbapenêmicos	121	50	71	50	69	97,2 e 100
Conceição-Neto et al. (2020) (30)	Baixos níveis de resistência em <i>K.pneumoniae</i>	170	47	123	44	111	90 e 94

BMD – Microdiluição em caldo

S – Suscetível

R – Resistente
Sens. – Sensibilidade
Esp. – Especificidade

Em todos os estudos, os isolados foram considerados suscetíveis se $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$ e resistentes se $MIC > 2 \mu\text{g/mL}$, pelo método de BMD, seguindo a diretriz do EUCAST e CLSI (21,22). Todos os testes rápidos de polimixina NP foram realizados conforme descrito por Nordmann e Poirel (2016). Os resultados foram, de forma geral, satisfatórios.

Para bactérias que carregam o gene *mcr*, o teste NP conseguiu detectar a resistência em todos os isolados (24,25,67,69). O estudo de Jayol *et al.* (2017) avaliou 16 isolados carregando *mcr-1* e *mcr-2* e todos foram corretamente identificados. Também foram analisados isolados que não carregavam o gene *mcr*, e foi apresentado um VME de 1,2% devido a um isolado com baixo nível de resistência que foi considerado um falso-suscetível. Deve-se salientar que foram observados *skipped wells* para 88% dos isolados de *Enterobacter* spp. e *K.pneumoniae* avaliados (25).

Jayol *et al.* (2018) avaliaram o teste NP na versão *homemade* e na versão industrial, e os 38 isolados portadores de *mcr* presentes no estudo, foram detectados pelos dois testes. No entanto, foi obtido um ME de 5,1% e VME de 1,9%, devido a isolados que não carregavam o gene *mcr* e apresentaram MICs próximas ao ponto de corte (69). Da mesma forma, Mitton *et al.* (2019) detectaram os 18 isolados *mcr-1* positivos de *E.coli*, e apresentaram um VME de 1,9% também em razão de MICs próximas ao ponto de corte (24).

O teste rápido de polimixina NP também foi bastante eficiente para determinar a suscetibilidade às polimixinas em enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, porém, alguns isolados apresentaram resultados falso-negativos e falso-positivos, todos com MIC próxima ao ponto de corte (26,31).

Apesar de um excelente desempenho de forma geral, o teste rápido de polimixina NP pode ter performance bastante comprometida em algumas populações específicas de bactérias. Por exemplo, o estudo de Simar *et al.* (2017) foi realizado apenas com isolados de *Enterobacter* spp. e apresentou uma sensibilidade extremamente baixa de 25%, demonstrando muitos resultados falso-negativos (66). Esse resultado foi possivelmente devido à heterorresistência que essa bactéria pode apresentar, dificultando a realização dos ensaios. Outros estudos que avaliaram o *Enterobacter* spp. apresentaram resultados muito satisfatórios, com sensibilidade maior que 90% (24,25,31,64,67–70). No entanto, o número de isolados de *Enterobacter* spp. foi baixo nesses estudos, diferente de Simar *et al.* (2017) que incluiu 143 isolados desse gênero. *Skipped wells* foram observados para 22

isolados durante a realização da BMD (66). Ainda, esse foi o único estudo que avaliou o teste NP utilizando a polimixina B, o que pode ter influenciado nos resultados e em diferenças entre os estudos (66).

A principal causa de erros de interpretação (ME e VME) ocorre entre isolados que apresentam MICs *borderline*, e isso foi observado em diferentes estudos (24–26,30,31,64,68,69). Conceição-Neto *et al.* (2020) apresentaram um VME de 9,7% e ME de 6,4% em isolados de *K.pneumoniae* com baixos níveis de resistência e MICs próximas ao ponto de corte, com uma significativa redução da CA (de 91,2% na população geral para 38,5% em isolados apresentando MIC de 4 µg/mL), de modo que os resultados foram considerados inaceitáveis para a triagem de resistência (30). De fato, a detecção de resistência às polimixinas em isolados com MIC baixa é de extrema importância, pois a disseminação de resistência pelo gene *mcr* vem sendo associada com bactérias que apresentam níveis baixos de resistência (30,52).

Outra maneira de avaliar o teste rápido de polimixina NP foi descrito por Belda-Orlowski *et al.* (2019). O teste foi avaliado pelo protocolo original, para 120 isolados de *Enterobacterales* produtores de carbapenemases, observando a mudança de cor nos poços e comparou-se com a medição de absorvância com leitor de ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) em 430nm. Para a inspeção visual foi obtida uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 70%, e para a medição da mudança de cor por ELISA, a sensibilidade aumentou para 94% e a especificidade para 95%, de modo que esse método conseguiu avaliar corretamente a maioria dos isolados suscetíveis e resistentes à colistina (32). Como a interpretação da mudança de cor pode ser subjetiva, o método de ELISA diminui a chance de erros relacionados a essa interpretação.

Para os isolados de *Enterobacter* spp., foi obtida uma especificidade de apenas 30% pelo protocolo original, e esse parâmetro aumentou para 95% utilizando o ELISA. Dessa maneira, a leitura fotométrica do teste NP pode se tornar um grande aliado na detecção de isolados resistentes duvidosos, incluindo isolados de *Enterobacter* spp., que apresenta resultados divergentes em diferentes estudos (32).

Os trabalhos que realizaram o teste NP diretamente de hemoculturas, reduzindo ainda mais o tempo necessário para a obtenção dos resultados, apresentaram uma boa correlação com a BMD, de modo que resultados falso-negativos e falso-positivos foram observados em poucos isolados, e mostrou ser eficiente na identificação de isolados carreando o gene *mcr* nessas amostras. Os resultados foram obtidos em 4 horas após as hemoculturas terem sido identificadas como positivas, reiterando a característica de teste rápido, já que o modo convencional demoraria em torno de 2 dias

(24h para obter a cultura bacteriana e 16-20h para obter o teste de suscetibilidade) (65,70). Essa rápida identificação de suscetibilidade em amostras de hemoculturas é de extrema importância, pois consegue guiar o tratamento de pacientes com infecções sanguíneas de forma mais rápida e segura, visto que a mortalidade por sepse é muito alta no mundo todo (65).

Dessa forma, o teste rápido de polimixina NP tem se mostrado uma metodologia fácil e com ótimo custo-benefício, com alta sensibilidade e especificidade para a maioria dos estudos, independentemente do mecanismo de resistência às polimixinas. Apresentou uma ótima correlação com o método de referência BMD para *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos, bactérias que carregam o gene *mcr* e amostras obtidas diretamente de hemoculturas. Uma grande vantagem é que os resultados são obtidos em até 4 horas, ou seja, pelo menos 16 horas antes do que com a BMD. Esse método poderia ser útil como uma técnica de triagem de isolados resistentes às polimixinas.

A sensibilidade foi muito baixa quando analisado um grande grupo de isolados de *Enterobacter* spp., dessa maneira, testes em grande escala envolvendo essa espécie são necessários. Cabe ressaltar, também, que dentre todos os estudos avaliados, apenas um utilizou a polimixina B para a realização do teste, o que reforça a falta de trabalhos incluindo esse antimicrobiano.

O teste rápido de polimixina NP envolve a observação da mudança de cor do meio, o que pode ser subjetivo e requer alto treinamento por parte dos analistas para identificar microrganismos que possuem baixo nível de resistência e MICs próximas ao ponto de corte, que foi a maior causa de erros reportada nos estudos. Porém, o método com ELISA poderia ser uma boa alternativa para testar isolados que geram dúvidas e também isolados de *Enterobacter* spp.

Uma das limitações do teste rápido de polimixina NP é não ser aplicável a BGN não fermentadores da glicose, como *Acinetobacter* spp. e *P.aeruginosa*, pois possuem vias metabólicas diferentes de *Enterobacterales*. Porém, estudos estão sendo realizados com uma variação desse teste, o teste rápido ResaPolimixina *Acinetobacter/Pseudomonas* NP. Lescat *et al.* (2018) (71) desenvolveram esse método baseado na utilização da resazurina, um corante redox, que também apresenta resultados de viragem de cor em até 4 horas. Seu princípio baseia-se no fato de que as células metabolicamente ativas são capazes de reduzir a resazurina de cor azul, para a resorufina de cor rosa, em uma determinada concentração de colistina. Dessa maneira, a redução é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Todos os estudos, até agora, apresentaram excelentes resultados descrevendo sensibilidade e especificidade acima de 90%, comparando com a BMD. Além disso, também realizaram o teste com isolados de *Enterobacterales*, e também apresentaram

resultados muito satisfatórios (71–73). Dessa maneira, esse método pode reverter a limitação do teste rápido de polimixina NP.

Conclusão

A emergência e disseminação de microrganismos resistentes às polimixinas estão se tornando um problema de âmbito mundial, com um aumento significativo nas taxas de resistência nos últimos anos. Assim, a reavaliação da importância do uso desses antimicrobianos é essencial visto que as polimixinas são uma importante opção terapêutica nessas situações, reforçando a necessidade de testes de suscetibilidade acurados e práticos para a rotina laboratorial.

Apesar de a microdiluição em caldo ser considerada o método de referência, ela não é de fácil execução e rápida para esse fim. Ainda, a possível aderência das polimixinas às placas utilizadas pode levar a uma variabilidade de resultados, e o impacto da heterorresistência nos testes de suscetibilidade deve ser avaliado.

Os estudos avaliando a eluição de disco em caldo e o teste rápido de polimixina NP apresentaram boas correlações com a BMD, e podem auxiliar na definição de um novo método de triagem de resistência, especialmente o teste rápido de polimixina NP que permite a obtenção de resultados em até 4 horas.

Apesar de o CLSI ter aprovado a eluição de disco em caldo como um método de referência e ele ser de fácil execução e de ótimo custo-benefício, os testes foram realizados para a colistina, sendo necessárias mais avaliações do método utilizando a polimixina B. A principal limitação da eluição é a necessidade de incubação tão longa quanto a microdiluição em caldo.

Nesse sentido, o teste rápido de polimixina NP parece ser uma opção mais aplicável à rotina laboratorial. O mecanismo de resistência não parece afetar a performance do teste, à exceção dos isolados *mcr* positivos com MICs abaixo do ponto de corte. A utilização de equipamentos, como ELISA, para auxiliar na leitura das placas, parece garantir uma melhora considerável na leitura dos resultados e as variações da metodologia permitiram a utilização do teste também para BGN não fermentadores da glicose, ampliando a aplicação laboratorial do teste.

No entanto, a avaliação de um grande número de isolados com MICs próximas ao ponto de corte é fundamental, visto que foram a maior causa de erros para os dois métodos avaliados.

Enfim, a utilização desses métodos pode contribuir, em última instância, para uma otimização do uso dos antimicrobianos, evitando seu uso indevido e potencializando o tratamento dos pacientes possibilitando melhores desfechos clínicos.

Referências Bibliográficas

1. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang And Dale's Pharmacology. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
2. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2013;303(6–7):287–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
3. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. 2017 [cited 2020 Aug 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
4. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. 2017 [cited 2020 Aug 17]. Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
5. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2018;12:124–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>
6. 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(6):1206–15.
7. Dubashynskaya N V., Skorik YA. Polymyxin delivery systems: Recent advances and challenges. *Pharmaceuticals*. 2020;13(5).
8. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: Challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol*. 2018;57(4):1–20.
9. Poirel L, Jayol A, Nordmanna P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):557–96.
10. 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* [Internet]. 2016;16(2):161–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

11. Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017;17(4):390–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30527-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30527-8)
12. Walsh TR, Wu C. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(10):1102–3.
13. Shen Y, Zhang R, Schwarz S, Wu C, Shen J, Walsh TR, et al. Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environ Microbiol*. 2020;22(7):2469–84.
14. Resistance to last-ditch antibiotic has spread farther than anticipated [Internet]. 2017 [cited 2020 Sep 21]. Available from: <https://www.nature.com/news/resistance-to-last-ditch-antibiotic-has-spread-farther-than-anticipated-1.22140>
15. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017;49(5):526–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029>
16. 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 Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):2070–4.
17. Bartolleti F, Silva Seco B, Capuzzo dos Santos C, Bragança Felipe C, Borsato Lemo M, da Silva Alves T, et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* . *Emerg Infect Dis*. 2016;22(10):1849–51.
18. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RE N° 1.634, DE 21 DE JUNHO DE 2018. Brasil: Diário Oficial da União; 2018.
19. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RE N° 45, DE 4 DE JANEIRO DE 2018. Brasil: Diário Oficial da União; 2018.
20. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: Two steps back, three steps forward? *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2573–82.
21. EUCAST. Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Eur Comm Antimicrob Susceptibility Test* [Internet]. 2020; Available from:

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

22. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [Internet]. 30th ed. Vol. 40, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI supplement M100; 2020. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
23. van der Heijden IM, Levin AS, De Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, et al. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P.aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007;6:8.
24. Mitton B, Kingsburgh C, Kock MM, Mbelle NM, Strydom K. Evaluation of an In-House Colistin NP Test for Use in Resource-Limited Settings. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 Jul 31;57(10):1–7. Available from: <https://jcm.asm.org/content/57/10/e00501-19>
25. Jayol A, Nordmann P, Lehours P, Poirel L, Dubois V. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017 Feb;24(2):175–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.002>
26. Malli E, Florou Z, Tsilipounidaki K, Voulgaridi I, Stefos A, Xitsas S, et al. Evaluation of rapid polymyxin NP test to detect colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in a tertiary Greek hospital. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2018 Oct;153:35–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.08.010>
27. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, et al. Multicenter evaluation of colistin broth disk elution and colistin agar test: A report from the clinical and laboratory standards institute. *J Clin Microbiol*. 2019;57(11):1–10.
28. Dalmolin TV, Mazzetti A, Ávila H, Kranich J, Carneiro GIB, Arend LNVS, et al. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019;96(1):114910. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910>
29. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol*. 2019;57(2):1–7.

30. Conceição-Neto OC, da Costa BS, Pontes LS, Santos ICO, Silveira MC, Cordeiro-Moura JR, et al. Difficulty in detecting low levels of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates: evaluation of Rapid Polymyxin NP test, Colispot Test and SuperPolymyxin medium. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2020 Jul;36:100722. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100722>
31. Shoaib M, Hussain A, Satti L, Hussain W, Zaman G, Hanif F. Evaluation of rapid polymyxin Nordmann Poirel test for detection of polymyxin resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020 Jun 12; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-020-03942-4>
32. Belda-Orlowski A, Pfennigwerth N, Gatermann SG, Korte-Berwanger M. Evaluation and readout optimization of the rapid polymyxin NP test for the detection of colistin-resistant Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol* [Internet]. 2019 Aug 1;68(8):1189–93. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001030>
33. Aggarwal R, Dewan A. Comparison of nephrotoxicity of Colistin with Polymyxin B administered in currently recommended doses: A prospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2018;17(1):4–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0262-0>
34. Stansly PG, Schlosser ME. Studies on Polymyxin: Isolation and Identification of *Bacillus polymyxa* and Differentiation of Polymyxin from Certain Known Antibiotics. In: *STUDIES ON POLYMYXIN*. 1947. p. 549–56.
35. 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(6):711–24.
36. Vardakas KZ, Falagas ME. colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017;49(2):233–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.023>
37. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram- negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2014;67(2):147–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24169795/>
38. Gunn JS. Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin*

Res. 2001;7(1):57–62.

39. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, et al. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- β -1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):59–69.
40. Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA. *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Nov;60(11):6969–72. Available from: <https://aac.asm.org/content/60/11/6969>
41. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*. 2008;154(12):3877–86.
42. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Butaye P, Goossens H. Identification of a novel plasmid-mediated colistin- resistance gene , *mcr-2* , in *Escherichia coli* , Belgium , June. 2016;(June):6–11.
43. Kneis D, Berendonk TU, Heß S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. *Sci Total Environ* [Internet]. 2019;694:133454. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.260>
44. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018 Oct 1;73(10):2904–2904. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/73/10/2904/5056110>
45. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* article. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
46. Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, O L, Hendersona, et al. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *MBio*. 2019;10(3):1–6.
47. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin

- resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):508–16.
48. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;1–9.
 49. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Oct;60(10):6415–7. Available from: <https://aac.asm.org/content/60/10/6415>
 50. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, Lima-Morales D de, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *blaKPC-2* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2017 Aug 1;72(8):2404–6. Available from: <http://academic.oup.com/jac/article/72/8/2404/3827872/Cooccurrence-of-mcr1-and-blaKPC2-in-a-clinical>
 51. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018 Feb;90(2):132–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016>
 52. Pillonetto M, Mazzetti A, Becker GN, Siebra CA, Arend LNVS, Barth AL. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*–positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019 Feb;93(2):140–2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.009>
 53. Lorenzoni VV, Dalmolin TV, Franco LN, Barth AL, Hörner R. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2018 Jul;22(4):356–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867018303866>
 54. Zamparette CP, Schorner M, Campos E, Moura Q, Cerdeira L, Tartari DC, et al. IncX4 Plasmid-Mediated *mcr-1.1* in Polymyxin-Resistant *Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2020 Jan 31;00(00):mdr.2019.0203. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2019.0203>
 55. Zhang J, Chen L, Wang J, Butaye P, Huang K, Qiu H, et al. Molecular detection of colistin

- resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) in human vaginal swabs. *BMC Res Notes* [Internet]. 2018;11(1):3–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3255-3>
56. Zavascki AP, Magagnin CM, Wink PL, de Oliveira VP, Nunes AG, Krummer TG, et al. Performance of polymyxin B Etest in a setting of high prevalence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2020 Sep;22:40–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716520300357>
 57. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. [Http://WwwEucastOrg](http://WwwEucastOrg) [Internet]. 2016;(March, 22):2016. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
 58. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):191–207.
 59. Wilkins TD, Thiel T. Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1973;3(3):350–6.
 60. Jorgensen JH, Alexander GA, Johnson JE. Practical anaerobic broth-disk elution susceptibility test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;17(4):740–2.
 61. Jorgensen JH, Redding JS, Howell AW. Evaluation of broth disk elution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria with the newer beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1986;23(3):545–50. Available from: <https://jcm.asm.org/content/23/3/545>
 62. Cielo NC, Belmonte T, Raro OHF, da Silva RMC, Wink PL, Barth AL, et al. Polymyxin B broth disk elution: a feasible and accurate methodology to determine polymyxin B susceptibility in Enterobacterales. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020;98(2):115099. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115099>
 63. Brasso B, Scientist SS, Systems BDD. How to develop & obtain regulatory approval of commercial antimicrobial susceptibility tests in a timely manner. 2016;
 64. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2016 Jun;22(6):1038–43. Available from:

http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/6/15-1840_article.htm

65. Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmanna P. Rapid detection of polymyxin-resistant enterobacteriaceae from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2016;54(9):2273–7.
66. Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test for Polymyxin B Resistance Detection Using *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* Isolates. Ledebauer NA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Oct;55(10):3016–20. Available from: <https://jcm.asm.org/content/55/10/3016>
67. Poirel L, Larpin Y, Dobias J, Stephan R, Decousser J-W, Madec J-Y, et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1* / *mcr-2* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018 Jan;90(1):7–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.012>
68. Yainoy S, Hiranphan M, Phuadraksa T, Eiamphungporn W, Tiengrim S, Thamlikitkul V. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test for detection of colistin susceptibility in Enterobacteriaceae isolated from Thai patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018 Oct;92(2):102–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.009>
69. Jayol A, Kieffer N, Poirel L, Guérin F, Güneser D, Cattoir V, et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018 Oct;92(2):90–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.006>
70. Malli E, Papagiannitsis CC, Xitsas S, Tsilipounidaki K, Petinaki E. Implementation of the Rapid PolymyxinTM NP test directly to positive blood cultures bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019 Dec;95(4). Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889319306273>
71. Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Ledebauer NA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Dec 19;57(3):1–6. Available from: <https://jcm.asm.org/content/57/3/e01563-18>
72. Germ J, Poirel L, Kisek TC, Spik VC, Seme K, Premru MM, et al. Evaluation of resazurin-based rapid test to detect colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019 Nov 1;38(11):2159–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-019-03657-1>

73. Jia H, Fang R, Lin J, Tian X, Zhao Y, Chen L, et al. Evaluation of resazurin-based assay for rapid detection of polymyxin-resistant gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* [Internet]. 2020 Dec 8;20(1):7. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1692-3>

ANEXO 1

Instructions for authors

AND POLICY

Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms.

CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictcp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (*Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC*) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials.

All published articles are reviewed by peers in a double-blind fashion. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors.

The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

FORM AND PREPARATION OF ARTICLES

The following categories of contributions will be considered for publication

Editorial

Critical and thorough review, prepared at the invitation of the editors, and submitted by an author with renowned knowledge on the subject. Editorials can have up to 1,000 words. This section may include the Journal’s editorial of presentation, signed by the editor, besides special editorials that comprise requested collaborations about current themes or about articles published on the Journal.

Review Articles

Articles that aim to synthesize and critically evaluate the present knowledge on a particular theme. They should contain no more than 6,000 words. These articles should present an unstructured abstract, with no more than 200 words (except for

Instructions for authors

systematic reviews – see abstract structure in ‘Original Articles’) and a comprehensive list, but preferably with no more than 80 references.

Tables should be included in the same manuscript file (after references) and the figures should be submitted as additional documents in individual files.

Special Articles

Manuscripts exclusively requested by the editors, on a subject of scientific relevance, to authors with recognized expertise in the area, and that do not meet the criteria for Editorials.

Original Articles

Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics: Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words.

Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

Case Reports

Articles based on peculiar cases and brief comments on the importance of the case in relation to the existing knowledge in the field. They should contain up to 1,000 words, with a total of no more than two tables or figures and 15 references, once presenting a literature review is not the purpose of the reports.

Their structure should present the following topics: Introduction, explaining the relevance of the case; Presentation of the case (Case Report), and Discussion. Case reports should describe novel or unusual findings, or offer new insights into a given problem. The content should be limited to facts relevant to the case. The confidentiality regarding patient identification is critical, so authors should not report any precise dates, initials, or any other information irrelevant to the case, but that may possibly identify the patient.

Case reports should have an unstructured abstract with no more than 150 words. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and figures should be sent as additional documents in individual files.

Instructions for authors

Case Reports: Images in Medicine

Section devoted to the publication of informative images, which are unusual and/or of broad interest in clinical situations. It should contain no more than 500 words and a total of 5 references. Two to three images (at a resolution of at least 300 dpi).

Letters

Opinions and comments on an article published in the Journal, on subjects of scientific relevance, and/or preliminary clinical observations. The text should be concise, with no more than 500 words. Only one table and one figure are allowed, and a maximum of five references. They should not have an abstract.

Brief Communication

Brief Communications are original but preliminary or more specific research results that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. The structure is similar to original articles; however, the Abstracts (Portuguese, Spanish or English) should not exceed 150 words and the text should not exceed 1,200 words. A maximum of two Tables/Figures are accepted.

Supplements

In addition to regular issues, CBR publishes the supplement of the HCPA Science Week.

CONFLICTS OF INTEREST

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest and should be done at the time of submission of the manuscript.

It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

Instructions for authors

PRIVACY AND CONFIDENTIALITY

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification, authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 466/2012 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable.

PREPARATION OF THE ARTICLE

The registration on the system as author and subsequent access with login and password are mandatory to submit and verify the status of submissions.

Identification: must include: a) Title of the article, clear and concise. Do not use abbreviations. There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) Authors' full names; c) Institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) Indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; e) If it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

THE NAMES OF ALL THE AUTHORS OF THE MANUSCRIPT SHOULD BE INDICATED IN THE SYSTEM

Abstract and Keywords: The articles should have an abstract in English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and

Instructions for authors

Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author, based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>.

Manuscript: it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference¹.

Tables: they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript.

Figures and charts: Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the other they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both must precede the figure itself.

Abbreviations: abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name.

Name of medications: the generic name should be used.

In case of citing appliances/equipment: all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

Acknowledgements: should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

Instructions for authors

Conflicts of interest: If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: “The authors declare no conflicts of interest”

References: should be numbered consecutively, in the order in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called “Vancouver Style”, as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors’ names correctly spelt. The accuracy of references is the authors’ responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editors.

Examples of citing references:

Journal articles (from one to six authors)

Almeida OP. A autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

Journal articles (more than six authors)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

Articles without the author’s name

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

Books

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Chapters from a book

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Instructions for authors

Books in which editors (organizers) are authors

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Theses

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Papers presented at conferences

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Electronic Journal Articles

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Other types of reference should follow the document

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts

Submitted to Biomedical Journals: Sample References (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Technical requirements

Microsoft Word document (.doc or .rtf), singled space, font size 12, 2-cm margins in each side, title page, abstract and descriptors, text, acknowledgements, references, tables and legends, and the figures should be sent in jpg or tiff at a resolution of at least 300 dpi.

2018 Apr 6