

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Ana Daniela Coutinho Vieira

**DETECÇÃO LABORATORIAL DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS: DESAFIOS
E PERSPECTIVAS**

Porto Alegre

2020

Ana Daniela Coutinho Vieira

**DETECÇÃO LABORATORIAL DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINAS: DESAFIOS E
PERSPECTIVAS**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Prof^a Dr^a Juliana Caierão

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Ana Daniela Coutinho
DETECÇÃO LABORATORIAL DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINAS:
DESAFIOS E PERSPECTIVAS / Ana Daniela Coutinho Vieira.
-- 2020.
44 f.
Orientadora: Juliana Caierão.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Especialização em
Microbiologia Clínica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Polimixinas. 2. Resistência. 3. Detecção
laboratorial. 4. mcr. I. Caierão, Juliana, orient.
II. Título.

RESUMO

Um dos principais desafios atuais no âmbito de saúde pública é o manejo da resistência aos antimicrobianos. Recentemente, o aumento do uso de polimixinas (colistina e polimixinas B) na esfera hospitalar, e seu constante uso na agricultura, levou a uma maior ocorrência de cepas resistentes a este medicamento. Neste sentido, tornou-se cada vez mais necessária a busca por metodologias eficazes, acessíveis e alinhadas com as recomendações vigentes, para a detecção laboratorial de resistência às polimixinas. O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação dos principais métodos disponíveis atualmente quanto aos seus parâmetros de acurácia e avaliar as principais perspectivas em relação à implantação de tais técnicas na realidade laboratorial. Metodologia: foi efetuada uma revisão bibliográfica descritiva sobre o tema na base de dados *on-line* PubMed, com busca pelos termos: *mcr*, *polymyxin*, *colistin*, *resistance*, *detection*, *methodology* e *assay*, utilizando artigos publicados entre os anos de 2015 e 2020. Conclusões: atualmente ainda não há um método ideal que atenda a todos os requisitos necessários na rotina laboratorial. Nesse sentido, o conhecimento das vantagens e limitações de cada metodologia é essencial para a definição de quais testes podem ser realizados nos laboratórios de microbiologia clínica.

Palavras-chave: polimixinas, resistência, detecção laboratorial, *mcr*.

ABSTRACT

One of the main current challenges in public health is the management of antimicrobial resistance. Recently, the increasing use of polymyxins (colistin and polymyxins B) in hospitals, and their constant use in agriculture, have led to a greater occurrence of resistant strains. In this context, it has become increasingly needed to search for methodologies that are effective, accessible and line up with current recommendations for laboratory detection of resistance to polymyxins. The objective of this study was to evaluate the main available methods regarding their accuracy parameters and the main perspectives about implementation of such techniques in laboratory routine. Methodology: a descriptive bibliographic review was carried out using PubMed online database, searching for the terms: *mcr*, polymyxin, colistin, resistance, detection, methodology and assay, using articles published between 2015 and 2020. Conclusions: currently, there is no ideal method that meets all requirements in the laboratory routine. In fact, knowledge of the advantages and limitations of each methodology is essential for the definition of which tests can be performed in clinical microbiology laboratories.

Keywords: polymyxins, resistance, laboratory detection, *mcr*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Métodos fenotípicos	14
<i>Metodologias baseadas em cultura utilizando meios específicos</i>	<i>14</i>
<i>Métodos colorimétricos.....</i>	<i>17</i>
<i>Métodos de inibição enzimática</i>	<i>19</i>
<i>Métodos baseados em imunoenaios</i>	<i>21</i>
<i>Métodos com determinação de concentração inibitória mínima (CIM)</i>	<i>21</i>
<i>Métodos automatizados</i>	<i>24</i>
Métodos genotípicos e de biologia molecular	25
CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS	26
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH	38

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é, atualmente, uma das mais graves ameaças a saúde humana (Hinchliffe *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016). Diversas instituições de importância global, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos, reconhecem alguns microrganismos multirresistentes como prioritários, reiterando a necessidade de vigilância epidemiológica e incentivo à pesquisa de novos fármacos ativos contra essas bactérias (Liu *et al.*, 2016).

Essas preocupações foram estimuladas, sobretudo, a partir da emergência e disseminação de bactérias produtoras de enzimas carbapenemases, especialmente enterobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Li *et al.*, 2019). Com o aumento dos casos de resistência a betalactâmicos de amplo espectro, como os carbapenêmicos, as opções terapêuticas para tratamento de infecções por essas bactérias gram-negativas se tornaram consideravelmente escassas. Novas drogas vêm sendo desenvolvidas, como os β -lactâmicos em combinação com inibidores de β -lactamases, a exemplo de ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam, meropenem-vaborbactam, e não β -lactâmicos como murepavadina, plazomicina, eravaciclina e finafloxacina (Jean *et al.*, 2019). Entretanto, tais medicamentos não são acessíveis em todos os países, seja pelo seu alto custo ou pela falta de aprovação dos órgãos regulamentadores (Humphries *et al.*, 2019).

Sendo assim, houve a necessidade de utilização de antimicrobianos já conhecidos, porém de última linha, como as polimixinas (Caniaux *et al.*, 2017; Gharaibeh & Shatnawi, 2019; Liu *et al.*, 2016). Entretanto, essa reinserção das polimixinas no arsenal terapêutico levou, consequentemente, a um aumento no uso destes medicamentos na prática clínica nos últimos anos (Caniaux *et al.*, 2017; Lepelletier *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

As polimixinas, até então, eram antimicrobianos utilizados de forma bastante limitada em decorrência da sua toxicidade, particularmente a nível renal (Caniaux *et al.*, 2017; Lepelletier *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Esta classe de medicamentos é composta por peptídeos catiônicos e engloba 5 tipos de polimixinas (A - E); entretanto, apenas a polimixina B e a polimixina E (colistina) são utilizadas no tratamento de infecções clínicas, diferindo entre si apenas por um aminoácido na sua estrutura, mas mantendo sua atuação bastante equivalente (Gharaibeh & Shatnawi, 2019; Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016). As polimixinas são compostos naturalmente produzidos por bactérias gram-positivas da espécie *Paenibacillus polymyxa* e seu espectro de ação engloba as bactérias gram-negativas, pois seu alvo é o lipopolissacarídeo

(LPS) da membrana externa destes microrganismos (Gharaibeh & Shatnawi, 2019; Li *et al.*, 2019).

A membrana externa é uma estrutura presente exclusivamente nas bactérias gram-negativas, cuja função principal é o transporte semipermeável de substâncias nutritivas para dentro da célula bacteriana e a eliminação de compostos tóxicos para o meio externo. O componente mais notável desta membrana é o LPS, uma estrutura composta por três regiões principais: o lipídio A, que funciona como uma endotoxina, o polissacarídeo O, que age como antígeno, e um oligossacarídeo central estrutural (Moffat *et al.*, 2019).

A interação das polimixinas com o LPS se dá através do lipídio A. Na maioria das bactérias este componente é carregado negativamente, devido à presença de fosfatos livres. Essa carga é naturalmente estabilizada pela ligação com cátions de carga positiva, como Ca^{2+} e Mg^{2+} (Moffat *et al.*, 2019). Ao ligar-se ao LPS, as polimixinas geram um desequilíbrio no lipídio a partir do deslocamento dos íons de magnésio e cálcio, culminando na destruição da membrana externa bacteriana (Caniaux *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019).

Apesar de seu amplo espectro de ação, algumas bactérias são intrinsecamente resistentes a essa classe de antimicrobianos e outras adquiriram, com o passar dos anos, mecanismos que impedem ou reduzem a ação das polimixinas (Moffat *et al.*, 2019). A maioria dos mecanismos envolvidos nesta resistência se relacionam a alterações estruturais ou na carga do LPS (Liu *et al.*, 2016; Moffat *et al.*, 2019). Entre as principais modificações destacam-se a adição de moléculas de 4-amino-L-arabinose, fosfoetanolamina ou galactosamina no lipídio A ou no oligossacarídeo central (Lepelletier *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016; Moffat *et al.*, 2019). Com isso, há uma redução na capacidade de interação e, por consequência, de penetração do fármaco na célula (Lepelletier *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016). Ademais, a expressão aumentada de bombas de efluxo e a capacidade de retenção da molécula de polimixina no interior do LPS também podem conferir resistência a este medicamento (Lepelletier *et al.*, 2018).

Outros mecanismos que reduzem a sensibilidade às polimixinas também podem ser encontrados, apesar de serem menos frequentes (Li *et al.*, 2019). A presença de cápsula em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, a perda progressiva de LPS em linhagens de *A. baumannii* e a estabilidade da membrana externa associada a sistemas de efluxo de algumas *P. aeruginosa* se destacam neste sentido (Caniaux *et al.*, 2017).

Até pouco anos, a resistência adquirida às polimixinas estava associada apenas a mutações cromossômicas em isolados clínicos, ou seja, permitindo apenas a transmissão vertical, sem uma transmissão horizontal a bactérias de outras linhagens (Liu *et al.*, 2016; Osei Sekyere, 2019). Além disso, essas mutações eram, em geral, bastante instáveis e autolimitadas,

permitindo o uso terapêutico de polimixinas (Caniaux *et al.*, 2017; Lepelletier *et al.*, 2018). No entanto, em novembro de 2015, pesquisadores chineses reportaram pela primeira vez a presença de um mecanismo de resistência às polimixinas mediado por plasmídeo em isolados de *Escherichia coli* recuperadas de humanos, animais e alimentos (Liu *et al.*, 2016).

Esse mecanismo envolve a presença do gene *mcr* (*mobile colistin resistance*), que codifica a enzima fosfoetanolaminotransferase, uma metaloproteína de zinco, responsável por transferir fosfoetanolamina para o sacarídeo de glucosamina do lipídio A, reduzindo sua carga negativa e, por consequência, impedindo a ligação da polimixinas (Gharaibeh & Shatnawi, 2019; Hinchliffe *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Osei Sekyere, 2019). Acredita-se que este gene tenha origem em espécies de *Paenibacillus polymyxa*, a bactéria onde a produção de polimixina foi identificada pela primeira vez (Caniaux *et al.*, 2017; Gharaibeh & Shatnawi, 2019). Posteriormente, o gene foi detectado em diversos países ao redor do mundo e outras variações foram encontradas em diferentes isolados (*mcr-1* a *mcr-10*) (Wang & Feng, 2020). Sua localização plasmidial favorece a transferência horizontal do gene, ou seja, entre linhagens diferentes de bactérias, sendo as com maior prevalência *E. coli*, seguida por espécies de *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp e *Shigella* spp (Caniaux *et al.*, 2017; Lepelletier *et al.*, 2018).

Com o avanço das pesquisas, descobriu-se que o gene *mcr-1* foi inicialmente transportado por um plasmídeo que pertence ao grupo de incompatibilidade IncI2, responsável também pela transferência de outros mecanismos de resistência. Posteriormente, esse gene foi novamente encontrado em outros grupos de incompatibilidade: IncHI2, IncHI2A, IncX4 e IncP (Lepelletier *et al.*, 2018). Estes achados são significativos do ponto de vista da ocorrência de bactérias multirresistentes, visto que os isolados não sensíveis às polimixinas também podem apresentar genes relacionados à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases como OXA-48, KPC e NDM (Gharaibeh & Shatnawi, 2019; Hinchliffe *et al.*, 2017; Lepelletier *et al.*, 2018). Além disso, ser carregado por plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade garantem a ampla disseminação do gene *mcr-1*.

Ademais, outra questão que deve ser levada em consideração em relação a disseminação de genes de resistência às polimixinas é o uso indiscriminado deste medicamento no âmbito da agricultura (Gharaibeh & Shatnawi, 2019). Em muitos países, a colistina (polimixina E) é ou foi utilizada para controle de infecção e promoção de crescimento animal, fato que, em associação ao incremento do uso terapêutico das polimixinas na medicina humana, leva a uma pressão seletiva que favorece a ocorrência e a dispersão de resistência a este medicamento (Caniaux *et al.*, 2017; Gharaibeh & Shatnawi, 2019; Li *et al.*, 2019). Adicionalmente, além do surgimento de cepas resistentes às polimixinas, o aumento do seu uso também resultou em uma

crescente detecção de bactérias intrinsecamente resistentes a este fármaco, como *Proteus* spp, *Providencia* spp, *Morganella* spp e *Serratia* spp (Lepelletier *et al.*, 2018), já que esses microrganismos passaram a apresentar vantagens adaptativas em relação aos demais.

Com base nesse cenário, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de metodologias laboratoriais capazes de detectar rapidamente a presença de mecanismos de resistência às polimixinas (Li *et al.*, 2019; Osei Sekyere, 2019). Atualmente, as duas instituições de maior renome em relação à padronização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA), o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI), dos Estados Unidos, e o Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - EUCAST) indicam a utilização de um protocolo de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) através de microdiluição em caldo, visto que já é consenso que as técnicas de disco-difusão não apresentam um bom desempenho neste contexto (Caniaux *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Osei Sekyere, 2019).

Entretanto, a execução desta técnica é demorada e requer parâmetros bastante específicos quanto a metodologia e aos materiais utilizados, tornando sua aplicabilidade na rotina clínica bastante onerosa, gerando assim uma demanda por alternativas laboratoriais mais convenientes (Caniaux *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Osei Sekyere, 2019).

Neste sentido, diversas técnicas têm sido desenvolvidas por pesquisadores de todo o mundo para triagem desta resistência, especialmente em pacientes de alto risco (Caniaux *et al.*, 2017). Considera-se que pacientes previamente hospitalizados, com exposição recente a antimicrobianos, tratamento prévio com polimixinas, de zonas endêmicas ou com histórico de infecção ou colonização por bactérias resistentes a polimixinas possuem maiores riscos de contaminação por cepas resistentes (Caniaux *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019).

Consequentemente, cada vez mais buscam-se alternativas com melhor reprodutibilidade e, ao mesmo tempo, que sejam de rapidez e acessibilidade compatíveis com a realidade dos laboratórios e hospitais (Caniaux *et al.*, 2017; Osei Sekyere, 2019). Por isso, ensaios de microbiologia clássica, como meios de cultura específicos e ensaios comerciais baseados em microdiluição, técnicas moleculares e novos métodos estão em desenvolvimento para efeitos de detecção de resistência (Li *et al.*, 2019; Osei Sekyere, 2019). Algumas das opções disponíveis apresentam boa reprodutibilidade, porém possuem elevado custo e podem necessitar de técnicas complementares para validação, como alguns testes fenotípicos; enquanto alguns testes rápidos e de fácil execução, como as fitas de gradiente de concentração, parecem subestimar os níveis de resistência (Caniaux *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Os meios de cultura

seletivos e cromogênios parecem ser uma opção neste sentido, pois são de fácil acesso, podem ser combinados em uma busca simultânea a outros tipos de resistência de importância clínica, como a resistência a carbapenêmicos (Caniaux *et al.*, 2017).

Em uma outra vertente, metodologias modernas como a espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF MS) para detecção de proteínas específicas ou atividade enzimática e a detecção do gene *mcr* por métodos de PCR em tempo real compõem um leque de oportunidades para a detecção laboratorial de resistência às polimixinas, tanto a partir de culturas como diretamente em amostras clínicas. Entretanto, essas técnicas ainda precisam de otimização e demandam profissionais altamente especializados e equipamentos com elevado custo de aquisição e manutenção, não sendo viável em todas as esferas laboratoriais (Caniaux *et al.*, 2017).

Sendo assim, em decorrência da emergência de isolados bacterianos multirresistentes, da disseminação horizontal do gene *mcr*, e da crescente conjuntura em relação a limitação terapêutica, justifica-se a importância do esclarecimento acerca das possibilidades diagnósticas para a detecção de cepas resistentes às polimixinas através de métodos efetivos, rápidos e acessíveis. A partir disso, é possível auxiliar na tomada de decisões médicas mais assertivas, resultando em melhores evoluções clínicas dos pacientes e, eventualmente, em redução substancial das taxas de morbidade e mortalidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os principais desafios e perspectivas em relação a detecção laboratorial de resistência às polimixinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar as principais técnicas para identificação laboratorial de resistência às polimixinas atualmente disponíveis quanto a suas especificidades, sensibilidades e outros parâmetros de avaliação de acurácia;
- b) Investigar as principais limitações referentes à implantação de métodos de detecção de resistência às polimixinas em laboratórios de análises clínicas;
- c) Avaliar as perspectivas em voga para o desenvolvimento de metodologias efetivas para esse contexto.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Submissão à revista: Clinical and Biomedical Research (CBR).

DETECÇÃO LABORATORIAL DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS: DESAFIOS E PERSPECTIVAS

Ana Daniela Coutinho Vieira¹, Juliana Caierão².

¹ Curso de Especialização em Microbiologia Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Um dos principais desafios atuais no âmbito de saúde pública é o manejo da resistência aos antimicrobianos. Recentemente, o aumento do uso de polimixinas (colistina e polimixinas B) na esfera hospitalar, e seu constante uso na agricultura, levou a uma maior ocorrência de cepas resistentes a este medicamento. Neste sentido, tornou-se cada vez mais necessária a busca por metodologias eficazes, acessíveis e alinhadas com as recomendações vigentes, para a detecção laboratorial de resistência às polimixinas. O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação dos principais métodos disponíveis atualmente quanto aos seus parâmetros de acurácia e avaliar as principais perspectivas em relação a implantação de tais técnicas na realidade laboratorial. Foi efetuada uma revisão bibliográfica descritiva sobre o tema na base de dados *on-line* PubMed, com busca pelos termos: *mcr*, *polymyxin*, *colistin*, *resistance*, *detection*, *methodology* e *assay*, utilizando artigos publicados entre os anos de 2015 e 2020. Atualmente ainda não há um método ideal que atenda a todos os requisitos necessários na rotina laboratorial. Nesse sentido, o conhecimento das vantagens e limitações de cada metodologia é essencial para a definição de quais testes podem ser realizados nos laboratórios de microbiologia clínica.

Palavras-chave: polimixinas, resistência, detecção laboratorial, *mcr*.

INTRODUÇÃO

Com a emergência crescente de bactérias multirresistentes (*Multidrug Resistant* - MDR) nos últimos anos, sobretudo *Enterobacteriales* e bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose resistentes a carbapenêmicos, houve uma redução de opções terapêuticas antimicrobianas efetivas. Neste sentido, a polimixinas, um antigo fármaco, em desuso devido a sua toxicidade, voltou ao cenário clínico (Li *et al.*, 2019).

Especialmente em cenários onde as novas combinações de betalactâmicos com inibidores de β -lactamases não estão disponíveis, as polimixinas têm sido consideradas a última opção terapêutica em casos envolvendo bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos. Contudo, devido ao seu retorno e expansão de utilização na prática clínica, para além de seu constante uso veterinário até recentemente, a frequência de resistência adquirida às polimixinas tem aumentado. Até 2015 estas resistências estavam ligadas apenas a mutações cromossômicas, representando menor risco de transmissão, visto que neste caso não há propagação entre diferentes linhagens bacterianas, de forma horizontal. Entretanto, pesquisadores chineses reportaram a presença de um novo mecanismo de resistência as polimixinas mediado por plasmídeo, envolvendo a presença do gene *mcr* (*mobile colistin resistance*). Este gene codifica a enzima fosfoetanolaminotransferase, uma metaloproteína de zinco responsável por transferir fosfoetanolamina para o sacarídeo de glucosamina do lipídio A, reduzindo sua carga negativa e, por consequência, impedindo a ligação da polimixinas nas bactérias gram-negativas (Humphries *et al.*, 2019; Jean *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

A ocorrência de locais com alta prevalência de bactérias MDR e, conseqüentemente, maior pressão seletiva, em associação ao fato de este novo mecanismos de resistência ser facilmente transferível por plasmídeo, constitui um ambiente de ameaça à saúde pública. Nesse cenário, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de detectarem de forma rápida e eficaz a presença de mecanismos de resistência às polimixinas na prática laboratorial, possibilitando a implementação eficiente de medidas de controle de infecção e a adaptação do tratamento de pacientes acometidos com estes patógenos. Além disso, há a necessidade de desenvolvimento de métodos com boa reprodutibilidade, de fácil manuseio e adaptáveis as diferentes realidades laboratoriais (Bardet & Rolain, 2018; Fenwick *et al.*, 2020; Germ *et al.*, 2019c)

Até o momento, o método recomendado pelo EUCAST é a microdiluição em caldo (BMD), enquanto o CLSI passou a aceitar, além da BMD, a eluição de disco em caldo (*Colistin*

Broth Disk Elution - CBDE) e a diluição em ágar (*Colistin Agar Test* – CAT) para avaliação da sensibilidade em enterobactérias e em *Pseudomonas aeruginosa* frente à colistina (CLSI, 2020). Sabe-se que a BMD é uma técnica de difícil inclusão na rotina de laboratórios clínicos, por ser demorada e ter peculiaridades técnicas trabalhosas. Por isso, a busca por métodos eficientes, rápidos, fáceis de usar e de baixo custo ainda é um desafio no diagnóstico de isolados bacterianos resistentes às polimixinas (POL-R), especialmente em países em desenvolvimento (Bardet *et al.*, 2017; Osei Sekyere *et al.*, 2020).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização desta pesquisa qualitativa foi efetuada uma revisão bibliográfica descritiva sobre o tema na base de dados *on-line* PubMed, com busca pelos termos: *mcr*, *polymyxin*, *colistin*, *resistance*, *detection*, *methodology* e *assay*. Foram utilizados termos em língua inglesa para uma maior abrangência de resultados. Foram incluídos os resultados publicados entre os anos de 2015 e 2020 e foram excluídos os artigos que não abordaram metodologias diagnósticas e de identificação laboratorial.

Métodos fenotípicos

Apesar de atualmente o método mais recomendado para a identificação de resistência a polimixinas ser a BMD (EUCAST, 2016), a necessidade de detecção de cepas POL-R de forma mais rápida e acessível levou ao desenvolvimento de diversas metodologias baseadas em características fenotípicas deste grupo de microrganismos. Em geral, estes métodos visam a detecção de resistência independentemente do tipo de mecanismo envolvido. Contudo, algumas técnicas possibilitam a identificação presuntiva da presença de genes *mcr*, necessitando de confirmação posterior através de métodos moleculares (Bardet *et al.*, 2017).

Metodologias baseadas em cultura utilizando meios específicos

O uso de meios de cultura ainda constitui uma metodologia padrão na microbiologia para isolamento de patógenos de amostras clínicas e, portanto, é uma das alternativas para triagem inicial de cepas POL-R (Bardet *et al.*, 2019; Germ *et al.*, 2019c). Devido à ausência de meios específicos para essa função e que sejam capazes de atender às necessidades laboratoriais atuais, alguns meios de cultura, inicialmente *in house*, foram desenvolvidos para triagem destes

microrganismos de forma direta, ou com etapas de enriquecimento (Bardet & Rolain, 2018; Nordmann *et al.*, 2016a).

Em geral, estes meios foram elaborados com baixas concentrações de colistina, entre 2 ou 4 mg/L, diferentemente de meios prévios utilizados, principalmente para isolamento de bactérias gram-positivas e cepas intrinsecamente resistente e que continham altas concentrações de colistina, como o CNA (*colistin and nalidixic acid containing agar*), cuja concentração atingia 10 mg/L. Estes meios, altamente concentrados, ou com adição de outros antibióticos ou antifúngicos, eram usualmente incapazes de detectar POL-R em baixo nível ou limítrofe (Bardet *et al.*, 2017; Bardet & Rolain, 2018; Nordmann *et al.*, 2016a).

Visando preencher esta lacuna, Nordmann e colaboradores desenvolveram um meio de cultura com base de EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*), denominado SuperPolymyxin[®]. Assim, utilizaram um meio seletivo para bactérias gram-negativas e com capacidade de identificação presuntiva de fermentadores de lactose através da coloração das colônias, e de *Escherichia coli* pela formação de brilho verde metálico. A este meio foi adicionada colistina em concentração de 3,5 µg/ml, além de 10 µg/ml de daptomicina para evitar o crescimento de *Streptococcus* sp e *Staphylococcus* sp, e 5µg/ml de anfotericina B para ação antifúngica (Nordmann *et al.*, 2016a).

No mesmo sentido, outra opção de meio específico para detecção de POL-R criado foi o CHROMagar COL-APSE[®], contendo sulfato de colistina, polimixina B, oxazolidonona, daptomicina e anfotericina B. Como vantagem, este é um meio cromogênico, possibilitando a diferenciação presuntiva de cepas de *Enterobacterales* e de gram-negativas não-fermentadoras (Bardet & Rolain, 2018). Já o meio LBJMR[®] aparece como uma opção mais versátil, uma vez que pela adição de vancomicina na sua formulação, além de colistina, torna-se apto para o rastreio de bactérias POL-R e, juntamente, de enterococos resistentes à vancomicina (VRE), outra urgência no âmbito hospitalar (Bardet *et al.*, 2017).

Diversos estudos comparativos avaliaram a utilização destes meios e obtiveram uma variabilidade em relação a sensibilidade e especificidade. O meio SuperPolymyxin[®] foi inicialmente avaliado por seus desenvolvedores com uma sensibilidade e especificidade de 100% (Nordmann *et al.*, 2016a), e estudos comparativos posteriores demonstraram especificidades entre 90,3% e 100%, e sensibilidades entre 86,8% e 100% (Abdul Momin *et al.*, 2017; Germ *et al.*, 2019a; Girlich *et al.*, 2019b; Aurélie Jayol *et al.*, 2018c; Nordmann *et al.*, 2016a). Estas variações podem ser decorrentes da utilização ou não de diluições seriadas, de diferenças de inóculo entre as metodologias aplicadas, da variabilidade de tipos de amostras

entre os estudos e dos mecanismos de resistência envolvidos (Germ *et al.*, 2019c, 2019a; Girlich *et al.*, 2019b; van Hout *et al.*, 2020; A. Jayol *et al.*, 2018; Osei Sekyere *et al.*, 2020; Przybysz *et al.*, 2018; Sadek *et al.*, 2020a).

Além disso, alguns estudos avaliaram modificações na técnica de utilização do meio, visando tornar o processo menos oneroso e mais acessível economicamente. Germ e colaboradores testaram a utilização da mesma diluição feita para o antibiograma na inoculação do meio SuperPolymyxin[®] em um método de *screening* com semeadura de 12 amostras em uma mesma placa (Germ *et al.*, 2019c), apresentando bons resultados de sensibilidade para *E. coli* (100%) e para *K. pneumoniae* (90%), porém menos eficaz para *Enterobacter* sp (77,3%) e com altos índices de falsos positivos para bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose. De fato, a detecção de cepas POL-R de *Enterobacter* sp tem sido um desafio que pode, pelo menos parcialmente, ser explicado pela ocorrência de heteroresistência nestes microrganismos (Germ *et al.*, 2019c; Aurélie Jayol *et al.*, 2018c). Outro fator crítico na variabilidade entre os resultados parece ser o efeito do inóculo da semeadura, visto que a adição de etapas de diluição prévia ou de enriquecimento melhoram a sensibilidade do método (Germ *et al.*, 2019c, 2019a; Girlich *et al.*, 2019b; Aurélie Jayol *et al.*, 2018c; Sadek *et al.*, 2020a).

A aplicabilidade destes meios na triagem laboratorial também deve levar em consideração a necessidade de um de cultivo *overnight*, e de utilização de um número elevado de placas para a triagem, o que pode gerar acréscimo de custos e carga de trabalho. Além disso, estes meios são incapazes de diferenciar o tipo de resistência (intrínseca ou adquirida, cromossomal ou plasmidial) e, em caso de triagem positiva, há a necessidade de confirmação por métodos adicionais (Abdul Momin *et al.*, 2017; Bardet *et al.*, 2019; Germ *et al.*, 2019c).

Apesar disso, estes meios são de fácil preparo e interpretação e não necessitam de equipamentos robustos, facilitando sua adaptação à rotina laboratorial. Podem ser utilizados tanto para isolamento primário de microrganismos ou para recuperação a partir de outros meios e são úteis tanto para o isolamento de *Enterobacterales* quanto de bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose (Abdul Momin *et al.*, 2017; Bardet *et al.*, 2017; Nordmann *et al.*, 2016a; Osei Sekyere *et al.*, 2020).

Ainda, em 2020, o CLSI passou a aceitar o método de diluição em ágar (CAT) para a determinação de concentração inibitória mínima (CIM) para colistina em isolados de *Enterobacterales* e de *P. aeruginosa*. Nesta metodologia utilizam-se placas de ágar Mueller-Hinton suplementados com concentrações de colistina de 0 µg/mL (controle de crescimento), 1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL, possibilitando a testagem de até 10 amostras por placa (CLSI, 2020). Esta recomendação foi estabelecida a partir de um estudo realizado nos Estados Unidos,

que demonstrou uma concordância categórica de 98,3% com o método de referência (BMD) (Humphries *et al.*, 2019).

Métodos colorimétricos

Com o objetivo de agilizar a detecção laboratorial de resistência às polimixinas, um método de triagem colorimétrico foi desenvolvido: o Rapid Polymyxin NP[®]. Esta metodologia, com alta sensibilidade (99,3%) e especificidade (95,4%) visa a detecção de POL-R em *Enterobacterales*. Esta metodologia é de baixo custo, simples aplicação e baseia-se na mudança de coloração do meio em virtude da mudança de pH originada pela metabolização de carboidratos durante o crescimento bacteriano de cepas resistentes na presença de polimixinas na concentração de 3,75µg/mL, independentemente do mecanismo de resistência (Nordmann *et al.*, 2016b).

Entre as vantagens deste método destaca-se o tempo de execução reduzido, necessitando de apenas 2 horas para a obtenção do resultado, sendo que os microrganismos com concentrações inibitórias mínimas mais elevadas e as cepas de *Klebsiella sp* e *E. coli* tendem a apresentar resultados ainda mais rápidos (Nordmann *et al.*, 2016b). Além disso, possui a capacidade de ser utilizado tanto em isolados de cultivo primário quanto diretamente em amostras de sangue (Jayol *et al.*, 2016; Malli *et al.*, 2019a).

Apesar de não substituir os métodos de determinação de concentração inibitória mínima, este teste pode ser bastante útil na detecção rápida de cepas POL-R, possibilitando a aplicação de medidas de controle de disseminação hospitalar (Nordmann *et al.*, 2016b). Como limitações, devido ao seu embasamento em mudança de pH, recomenda-se que o teste não seja realizado a partir de colônias originadas de meios de cultura acidificantes, como Drigalski, Mac Conkey e Bromocresol Purple (Bardet & Rolain, 2018). Também nota-se que cepas com CIMs limítrofes e resistência em baixo nível apresentam resultados mais difíceis de serem interpretados (Nordmann *et al.*, 2016b; Yainoy *et al.*, 2018).

Ainda neste sentido, pelo fato de ser uma técnica baseada na mudança de cor, de laranja para amarelo, pode apresentar uma variabilidade entre observadores devido a interpretação subjetiva (Hinchliffe *et al.*, 2017; Nordmann *et al.*, 2016b). Buscando reduzir essa variação, uma metodologia com a utilização de leitor de ELISA e de curva ROC para uma leitura mais confiável dos resultados foi proposta, demonstrando aprimoramento das leituras e

possibilitando a criação de valores limiares para diferentes espécies de enterobactérias (Belda-Orlowski *et al.*, 2019).

A aplicabilidade do Rapid Polymyxin NP[®] também foi testada em diversos estudos posteriores que confirmaram sua ótima sensibilidade (91 a 100%) incluindo frente à cepas portadoras de gene *mcr* (Malli *et al.*, 2018; Poirel *et al.*, 2018; Yainoy *et al.*, 2018). Porém sua especificidade foi variável entre os estudos (70 a 100%), com destaque para um ensaio realizado com 120 cepas de enterobactérias (especificidade de 70%) (Belda-Orlowski *et al.*, 2019), e outro realizado com 131 cepas de *K. pneumoniae* em que o Rapid Polymyxin NP[®] apresentou a menor especificidade em comparação a metodologias automatizadas e ao E-Test[®] (82%) (Malli *et al.*, 2018).

Uma das explicações para esta variabilidade pode ser a diferença entre os resultados obtidos por diferentes espécies, visto que a especificidade para *E. coli* costuma ser bastante alta, diferentemente dos resultados para *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Esta teoria é reforçada pela metodologia de padronização de leitura por ELISA com valores distintos para cada espécie, que melhorou consideravelmente os resultados de especificidade (Belda-Orlowski *et al.*, 2019). Além disso, um estudo com 143 isolados de *Enterobacter* spp reforçou a fragilidade do método na detecção de POL-R neste gênero, provavelmente devido a sua frequente heteroresistência à polimixinas, apresentando uma sensibilidade de 25% apesar da especificidade de 100% (Simar *et al.*, 2017a).

Ainda, o método necessita de adaptações e maiores estudos em relação a sua utilização em outros microrganismos (não-enterobactérias) que possuem diferentes rotas metabólicas, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (Nordmann *et al.*, 2016b). Neste sentido, algumas metodologias e kit comerciais foram desenvolvidos com base na metabolização de carboidratos (Sadek *et al.*, 2020b) mas utilizando diferentes indicadores colorimétricos como púrpura de bromocresol, ou embasadas na viabilidade celular com a utilização de resazurina (Lescat *et al.*, 2019b). Porém, estes métodos são um pouco mais demorados que o teste para avaliação de enterobactérias, levando em média de 3 a 4 horas para execução (Lescat *et al.*, 2019b; Sadek *et al.*, 2020b).

Alguns estudos avaliaram estas metodologias e encontraram boa sensibilidade (93,3 a 100%) e especificidade (86,8 a 100%) (Germ *et al.*, 2019b; Jia *et al.*, 2020; Lescat *et al.*, 2019a; Malli *et al.*, 2019b; Sadek *et al.*, 2020b). Entretanto, um estudo recente avaliou dois kits comerciais baseados na metodologia colorimétrica para enterobactérias e para *A. baumannii* e encontrou VME (*very major errors*) em taxas elevadas de 58,8% e 21,1%, respectivamente. Neste estudo a sensibilidade do kit para avaliação em *A. baumannii* foi de 41,2% e a

especificidade de 86,1%, e foram justificadas pelo maior número de amostras POL-R e por motivos já declarados em outros estudos, como variabilidade de inóculo, dificuldade de interpretação da cor e em amostras com CIMs limítrofes (Kon *et al.*, 2020).

Em 2019, outro método colorimétrico para detecção de POL-R em *Enterobacterales* foi desenvolvido por Rodriguez e colaboradores e foi denominado ASAT (Andrade Screening Antimicrobial Test). Esta metodologia também se baseia na acidificação do meio a partir da utilização dos carboidratos pelas bactérias, diferindo do método proposto por Nordmann e colaboradores pela utilização de solução de Andrade como indicador de pH, ao invés de vermelho de fenol. A sensibilidade e especificidade apresentadas assemelharam-se ao método Rapid Polymyxin NP[®], com 90,7% e 100%, respectivamente (Nordmann *et al.*, 2016b; Rodriguez *et al.*, 2019).

Métodos de inibição enzimática

Com a descoberta de que a enzima fosfoetanolamina transferase é uma metaloproteína dependente de zinco (Nordmann *et al.*, 2016b), a utilização de quelantes como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) ou DPA (ácido dipicolínico) tornou-se uma nova tendência na triagem de cepas POL-R portadoras de *mcr*, uma vez que a privação de zinco através destes quelantes poderia inibir a atividade enzimática da fosfoetanolamina transferase e reduzir a CIM de polimixinas em isolados resistentes (Bardet & Rolain, 2018; Belda-Orlowski *et al.*, 2019).

Neste sentido, alguns testes de *screening* baseados na inibição da enzima fosfoetanolamina transferase foram desenvolvidos, majoritariamente baseados na adaptação de técnicas previamente estabelecidas. Um estudo de Esposito e colaboradores avaliou quatro destas técnicas em isolados de *E. coli* portadores do gene *mcr-1*: disco combinado, adaptação do Rapid Polymyxin NP[®], determinação do potencial zeta e microdiluição em caldo. A técnica de disco combinado utilizou discos de colistina 10ug com e sem a adição de EDTA (100 mM), onde um aumento de 3 mm ou mais no halo de inibição foi considerado como positivo para *mcr-1*. A metodologia do Rapid Polymyxin NP[®] foi adaptada com a adição de poços com EDTA, que em isolados positivos para *mcr-1* apresentam ausência de proliferação bacteriana e de alteração de cor. Já a metodologia de alteração do potencial zeta baseia-se na redução da carga elétrica gerada pela adição de fosfoetanolamina na membrana celular bacteriana mediada por *mcr*, causando alterações na R_{ZP} ($R_{ZP} = ZP_{+EDTA}/ZP_{-EDTA}$) (Esposito *et al.*, 2017). A quarta metodologia avaliada baseia-se na técnica clássica de microdiluição em caldo com

determinação de CIM e também foi avaliada em outros estudos com a adição de EDTA ou DPA (Büdel *et al.*, 2019; Wink *et al.*, 2020).

A adaptação do Rapid Polymyxin NP[®] apresentou ótima sensibilidade e especificidade (96,7 e 100%) em um tempo de 2 horas e 30 minutos e pode ser facilmente adaptado à metodologia já desenvolvida. A determinação do potencial zeta, por sua vez, apesar de apresentar ótimos resultados (sensibilidade = 95,1% e especificidade = 100%) utiliza metodologias pouco utilizadas em laboratórios clínicos de rotina. Já a técnica de discos combinados é bastante aplicável e de fácil interpretação, porém pode apresentar resultados falhos em cepas com CIMs ≤ 2 ug/mL (sensibilidade = 96,7% e especificidade = 89,6%) (Esposito *et al.*, 2017).

Porém, nenhum destes métodos fornece informações quanto a concentrações inibitórias. Por isso, os métodos baseados em microdiluição em caldo aparecem como metodologias promissoras, principalmente pelo fato de serem baseadas nas recomendações oficiais dos comitês EUCAST e CLSI, e por fornecerem juntamente os valores de CIM. Entretanto, os estudos realizados apresentaram alguns resultados discrepantes. A sensibilidade do método entre os diferentes estudos variou de 84,1 a 96,7% e a especificidade de 54,2 a 100% (Büdel *et al.*, 2019; Esposito *et al.*, 2017; Wink *et al.*, 2020). Tais variações podem ser em decorrência de variações metodológicas quanto a utilização de EDTA ou DPA, a concentração dos quelantes utilizados, a composição dos meios de cultura e o ponto de corte determinado por cada estudo, que variou de 2 a 4 log. Mesmo necessitando de maiores estudos para avaliação da sua acurácia, a adaptação a técnica de BMD parece ser uma alternativa interessante para *screenings* epidemiológicos.

De forma semelhante, uma adaptação à técnica de “Colistin Agar-Spot” (CAST) foi elaborada (eCAST). Assim, como as demais técnicas dependentes de cultivo *overnight*, esta metodologia apresenta um *turnaround time* (TAT) mais elevado, em comparação a testes rápidos como o Rapid Polymyxin NP[®], mas apresenta-se como uma alternativa acurada (sensibilidade e especificidade = 100%), barata e com a possibilidade de testagem de até 36 amostras em uma placa de 36 mm (Escalante *et al.*, 2020). De forma semelhante, a adaptação à técnica de eluição em caldo (EDTA-CBDE) apresenta boa correlação (sensibilidade = 100% e especificidade = 94,3%) (Fenwick *et al.*, 2020).

Cabe salientar que nenhuma destas técnicas pode ser utilizada como determinante para a presença de genes *mcr*, visto que há a necessidade de confirmação posterior por métodos moleculares. Houve, também, um predomínio de avaliações em isolados de *mcr-1* a 5, com poucos resultados em outras variantes. Mas considerando que atualmente a prevalência entre

as espécies portadoras deste gene envolve a variação *mcr-1*, esta não parece ser uma primordialidade. Ainda, duas variáveis são importantes neste contexto: os quelantes utilizados não atuam exclusivamente na fosfoetalamina transferase, portanto outros fatores podem causar positividade dos testes; e a negatividade do teste não prediz necessariamente a ausência do gene *mcr*, visto que a expressão gênica pode não estar ativa no momento (Escalante *et al.*, 2020; Esposito *et al.*, 2017).

Métodos baseados em imunoenaios

Ensaio baseado na detecção de antígenos específicos de polimixinas e de proteínas relacionadas ao gene *mcr* vem sendo desenvolvidos, especialmente voltados para a indústria de produção de alimentos de origem animal. Tais métodos, desenvolvidos através de metodologias de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e imunocromatografia de fluxo lateral (LFA) tem seu uso justificado pela necessidade de melhoria no monitoramento e controle quanto à utilização de colistina na agricultura (He *et al.*, 2018; J. Wang *et al.*, 2019).

Além disso, estas metodologias podem servir de base para a adaptação de futuros métodos analíticos voltados para a detecção de resistência à polimixinas em amostras biológicas humanas. Atualmente, há disponível no mercado um método de LFA desenvolvido por Volland e colaboradores (NG Test[®]), com ótimo TAT (15 minutos) e excelente sensibilidade e especificidade (100 e 98%) (Volland *et al.*, 2019). O NG Test[®] foi desenvolvido para a detecção de resistência mediada pelo gene *mcr-1* e teve seu desempenho afirmado por um estudo em isolados de enterobactérias, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, apresentando 100% de sensibilidade e 99% de especificidade (Fenwick *et al.*, 2020).

Métodos com determinação de concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM, em várias situações clínicas, é essencial na tomada de decisões quanto à terapia antimicrobiana utilizada para bactérias multirresistentes (Nhung *et al.*, 2015). Em relação às polimixinas, o CLSI e o EUCAST determinaram que o método de referência para a determinação de CIM em *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp é a microdiluição em caldo seguindo os padrões da ISO 20776-1. Algumas especificidades deste método são a necessidade de utilização de caldo Mueller-Hinton cátion ajustado e de bandejas de poliestireno puro não tratadas e sem qualquer tipo de aditivo, além da utilização,

exclusivamente, de sais sulfatados de polimixinas (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2016).

Entretanto, a aplicabilidade desta técnica na rotina laboratorial torna-se um tanto quanto limitada, especialmente em laboratórios com alto fluxo de rotina, pois é uma metodologia laboriosa (Koyuncu Özyurt *et al.*, 2019; Simner, 2019). Além disso, a exclusão do uso de polissorbato-80 como agente de dispersão, devido as suas possíveis características bactericidas, pode ser uma complicação do método, uma vez que há a possibilidade de aderência das moléculas de polimixinas à superfícies plásticas de poliestireno (Singhal *et al.*, 2018). Por isso, diversas alternativas vêm sendo estudadas e aplicadas como possíveis opções para viabilizar uma detecção de CIMs de polimixinas mais alinhada com as realidades laboratoriais (Koyuncu Özyurt *et al.*, 2019; Simner, 2019).

As tiras de gradiente E-Test[®] são amplamente utilizadas em laboratórios de microbiologia para a determinação de CIM frente a diversas drogas e microrganismos. Entretanto, em relação às polimixinas, esta metodologia demonstra altos índices de VME (8 a 53,6%), ou seja, de falsa suscetibilidade (Chew *et al.*, 2017; Lutgring *et al.*, 2019; Simar *et al.*, 2017b; Zavascki *et al.*, 2020). Esta baixa correlação entre o E-Test[®] e o método de referência por estar relacionada a má difusão das moléculas de polimixinas em ágar sólido, assim como ocorre com os discos de difusão, cuja utilização na avaliação de sensibilidade às polimixinas não é recomendada (Chew *et al.*, 2017; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2016).

Já as técnicas de eluição de disco em caldo (CBDE), passaram a serem recomendadas pelo CLSI em 2020, juntamente com o CAT, para a determinação de CIM de colistina em enterobactérias e em *P. aeruginosa* (CLSI, 2020). O CBDE consiste em um método consideravelmente simples, e utiliza materiais de fácil aquisição. Além disso, atua independentemente do tipo de rota metabólica e, portanto, em teoria pode ser aplicado tanto a enterobactérias como a bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose. Entretanto, o estudo multicêntrico utilizado como base para o posicionamento do CLSI demonstrou taxas de erro elevadas para as cepas de *Acinetobacter* spp., com VME de 5,6% e ME (*major error*) de 3,3% e, assim sendo, não há recomendação de aplicação desta técnica para isolados deste microrganismo (Humphries *et al.*, 2019). Além disso, outro estudo verificou que esta técnica apresentou VME em cepas produtoras de *mcr-1*, com CIMs entre 2 e 4 µg/mL, o que sugere que as cepas testadas e que apresentarem CIMs ≥ 2 µg/mL sejam avaliadas quanto a presença de genes *mcr* (Simner, 2019).

Apesar destes achados, o CBDE ainda é uma metodologia promissora e com bons índices de CA (CA – *categorical agreement*: 90,7 a 100%) (Humphries *et al.*, 2019; Koyuncu Özyurt *et al.*, 2019; Simner, 2019). Por este motivo, modificações para torná-la ainda mais adaptável têm sido testadas. Dalmolin e colaboradores adaptaram esta técnica a volumes menores de reagentes, com 1 mL (*Colistin Broth Microelution* - CBM) ou 200 µL (*Microelution Plates* - MPT), e obtiveram resultados promissores com o CBM para enterobactérias (CA: 91,18%, EA – *essential agreement*: 95,59%, sensibilidade: 95,35, especificidade: 84%). Entretanto, a ocorrência de ME (16%) e VME (4,65%), especialmente em decorrência de cepas com CIMs próximos dos pontos de corte (2-4 µg/mL) faz com que estas metodologias sejam mais aplicáveis a nível de *screening* (Dalmolin *et al.*, 2020b). Outro estudo demonstrou que a técnica também é eficaz ao utilizar polimixina B, ao invés de colistina, com resultados de CA de 99,5% e VME de apenas 1,11% (Cielo *et al.*, 2020)

Visando preencher essa lacuna do mercado, alguns fabricantes desenvolveram metodologias comerciais para a detecção de CIM em polimixinas de baixa complexidade e sem a obrigatoriedade de utilização de equipamentos. Estes kits utilizam microplacas com poços contendo diluições prontas de polimixinas, o que torna o seu uso mais prático e fácil de incluir na rotina. ComASP® (Liofilchem), UMIC® (Biocentric), Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics) e Policimbac® (Probac do Brasil) são algumas das versões comerciais disponíveis. Uma das vantagens dos kits ComASP® e Sensititre® é que a avaliação pode ser feita tanto por inspeção visual como por adaptação de leitura em equipamento, já o kit da Policimbac® utiliza um revelador químico para o auxílio à leitura do crescimento bacteriano (Chew *et al.*, 2017; Dalmolin *et al.*, 2020a; Aurélie Jayol *et al.*, 2018b; Osei Sekyere *et al.*, 2020).

Estes kits apresentam-se como uma boa alternativa, especialmente pela sua aplicabilidade, porém maiores estudos são necessários para que dados mais robustos estejam disponíveis para a sua avaliação. Nos estudos já realizados, houveram bons níveis de CA para Policimbac® (100%) apesar do baixo nível de EA (16,4%), provavelmente em decorrência de o kit comercial apresentar CIMs maiores que no método de referência, porém sem interferir na classificação do resultado (Dalmolin *et al.*, 2020a)(Aurélie Jayol *et al.*, 2018b; Osei Sekyere *et al.*, 2020)(Osei Sekyere *et al.*, 2020) O UMIC®, por sua vez, apresentou bons resultados de CA (91,9%), mas elevadas taxas de VME (11,3%) (Aurélie Jayol *et al.*, 2018b). Assim, os resultados mais promissores foram obtidos pelo Sensititre®, com CA de 97,8%, VME de 3%, além de uma ótima sensibilidade para a detecção em cepas portadoras do gene *mcr-1* (95,2% e 100% para polimixina B e colistina, respectivamente) (Chew *et al.*, 2017; Aurélie Jayol *et al.*, 2018b).

Em outra vertente, metodologias automatizadas também têm sido avaliadas quanto a capacidade de utilização em testes de sensibilidade e de detecção de resistência à polimixinas. Destacadamente os equipamentos Vitek 2[®] (bioMérieux), BD Phoenix[®] (Becton Dickinson) e MicroScan[®] (Beckman Coulter) são os mais utilizados e pesquisados. Estas automações realizam a determinação de CIM de polimixinas, em conjunto com a determinação da concentração de outras drogas, a partir de colônias de crescimento recente. Entre as vantagens do método estão a facilidade operacional e a possibilidade de realizar identificação bacteriana e testes de suscetibilidade no mesmo equipamento. Já suas limitações incluem o curto alcance da faixa de concentração da droga quando comparada a outras metodologias e o custo de aquisição dos equipamentos e insumos (Aurélie Jayol *et al.*, 2018b; Osei Sekyere *et al.*, 2020).

Quanto ao desempenho, diversos estudos foram realizados até o momento e encontraram boa sensibilidade para o Vitek 2[®] (95,2% a 98%) e para o BD Phoenix[®] (95%) (Chew *et al.*, 2017; Malli *et al.*, 2018), enquanto o MicroScan[®] obteve uma certa divergência nos resultados (85,71 a 100%) (Chew *et al.*, 2017; Osei Sekyere *et al.*, 2020). Vale destacar que as três automações apresentaram bom desempenho na detecção de isolados portadores do gene *mcr-1* (Chew *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2019).

Métodos automatizados

Outra grande aposta na utilização de automação para a detecção de resistência microbiana é a utilização da espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser (*Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometer* - MALDI-TOF MS). Esta técnica consiste na produção de espectros de massa a partir de células bacterianas e sua comparação com espectros de referência, em um tempo altamente reduzido em comparação com outras técnicas, possibilitando a análise de 96 poços em aproximadamente 90 minutos (Giordano & Barnini, 2018). Na microbiologia esta metodologia vem sendo aplicada para a identificação microbiana e apresenta potencial para utilização em testes de avaliação de resistência a antimicrobianos. Para este fim, são utilizados bancos de dados e padrões de espectros com diferenças significativas entre cepas suscetíveis e resistentes a droga (Dortet *et al.*, 2018a; Giordano & Barnini, 2018).

Uma série de estudos baseados nas diferenças ocasionadas pelas modificações no lipídio A possibilitaram a validação do método utilizando MALDI-TOF em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, com a vantagem de sinalização de cepas possivelmente produtoras de genes *mcr* (Dortet *et al.*, 2020, 2018b, 2018a; Furniss *et al.*, 2020, 2019). Anteriormente, outro estudo

havia testado a utilização de MALDI-TOF para a identificação de cepas POL-R e obteve índices de classificação correta de 91% das cepas resistentes e 73% das sensíveis. Porém, é importante destacar que neste estudo o método de comparação para a determinação de CIMs utilizado foi o Sensititre® e não a BMD, considerada padrão-ouro (Giordano & Barnini, 2018).

Em geral, as metodologias baseadas em MALDI-TOF possuem um bom potencial, ótimo TAT a partir de amostras de cultivo prévio, baixo custo de manutenção de insumos, porém os altos custos de implantação fazem com que esta técnica não seja viável em todos os tipos de laboratórios (Dortet *et al.*, 2018a; Giordano & Barnini, 2018).

Outros métodos vêm sendo estudados com o mesmo objetivo, dentre eles utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) (H. Wang *et al.*, 2019), citometria de fluxo (Fonseca e Silva *et al.*, 2019), microscopia de força atômica (Ierardi *et al.*, 2017), eletroquímica (Li *et al.*, 2018), espectroscopia Raman (Lin *et al.*, 2019) e análise de alta resolução por fusão (HMC) (Tahmasebi *et al.*, 2020), mas ainda requerem estudos mais robustos.

Métodos genotípicos e de biologia molecular

Assim como os pesquisadores que focaram nas alterações de membrana externa em cepas de bactérias POL-R (Furniss *et al.*, 2020) para o desenvolvimento de técnicas analíticas, outros cientistas utilizaram uma linha de pensamento semelhante, ainda em 2015, para testarem a metodologia de eletroforese capilar para o reconhecimento de células bacterianas com alteração de superfície (Sautrey *et al.*, 2015). Entretanto esta metodologia não entrou definitivamente na rotina de procedimentos utilizados para a avaliação de POL-R.

Por outro lado, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativo em tempo real (qPCR) e PCR multiplex estão entre os mais pesquisados na busca por metodologias efetivas para a detecção de resistência às polimixinas. O qPCR baseia-se, principalmente, na detecção de genes *mcr* e suas principais vantagens são a capacidade de ser utilizado tanto a partir de culturas prévias como em amostras biológicas e culturas de vigilância, e de detectar os genes mesmo em quantidades pequenas de material genético, o que a torna uma metodologia sensível e altamente específica (frequentemente de 100%), além de apresentar um curto TAT (<2h) (Bontron *et al.*, 2016; Chabou *et al.*, 2016; Donà *et al.*, 2017; Nabti *et al.*, 2020; Nijhuis *et al.*, 2016; Tolosi *et al.*, 2020).

Para tornar os métodos de PCR ainda mais acessíveis e úteis na prática laboratorial, as os ensaios de PCR multiplex, ou seja, que avaliam mais de uma região do material genético ao

mesmo tempo conferem a vantagem de possibilitar, em um mesmo protocolo, a pesquisa de variações do gene *mcr* ou até mesmo de outros genes de resistência de importância clínica, com altos índices de sensibilidade e especificidade (>92%) (Girlich *et al.*, 2020, 2019a; Hatrongjit *et al.*, 2018; Jousset *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019; Lescat *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017; Rebelo *et al.*, 2018; Teo *et al.*, 2018). Entretanto, estas metodologias possuem um alto custo de implantação e manutenção, além de necessitarem de profissionais capacitados para sua execução (Caniaux *et al.*, 2017).

CONCLUSÕES

Apesar dos inúmeros avanços em relação às técnicas e metodologias disponíveis, a detecção de resistência a polimixinas ainda constitui um desafio para os laboratórios de análises clínicas, visto que não há, até o momento, um método que seja pouco oneroso, financeiramente aplicável e apresente resultados fidedignos em todas as principais espécies envolvidas neste mecanismo de resistência.

Desta forma, conclui-se que possivelmente não haverá um método universal que atenda às necessidades de todos os laboratórios. Porém, a associação de duas ou mais técnicas pode ser viável, visto que desta maneira é possível atender as necessidades clínicas com métodos de *screening* e de determinação de níveis de concentração inibitória mínima, e obter a confirmação de mecanismo de resistência para fins epidemiológicos com outros testes.

REFERÊNCIAS

Abdul Momin MHF, Bean DC, Hendriksen RS, Haenni M, Phee LM, Wareham DW. CHROMagar COL-APSE: A selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant gram-negative pathogens. *Journal of Medical Microbiology* 2017;66:1554–61. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000602>.

Bardet L, Okdah L, le Page S, Baron SA, Rolain JM. Comparative evaluation of the UMIC Colistine kit to assess MIC of colistin of gram-negative rods. *BMC Microbiology* 2019;19:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1424-8>.

Bardet L, le Page S, Leangapichart T, Rolain JM. LBJMR medium: A new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria. *BMC Microbiology* 2017;17:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1128-x>.

Bardet L, Rolain JM. Development of new tools to detect colistin-resistance among enterobacteriaceae strains. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3095249>.

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. *Journal of Medical Microbiology* 2019;68:1189–93. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001030>.

Bontron S, Poirel L, Nordmann P. Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (*mcr-1*) from cultured bacteria and stools 2016:10–2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw139>.

Büdel T, Clément M, Bernasconi OJ, Principe L, Perreten V, Luzzaro F, *et al.* Evaluation of edta-And dpa-based microdilution phenotypic tests for the detection of *mcr*-mediated colistin resistance in enterobacteriaceae. *Microbial Drug Resistance* 2019;25:494–500. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0275>.

Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, le Page S, Hadjadj L, Rolain JM. Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes and New Infections* 2016;13:71–4. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.06.017>.

Chew KL, La M van, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr*-positive enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *Journal of Clinical Microbiology* 2017;55:2609–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17>.

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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2020;98:115099. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115099>.

Clément M, Büdel T, Bernasconi OJ, Principe L, Perreten V, Luzzaro F, *et al.* The EDTA-based disk-combination tests are unreliable for the detection of MCR-mediated colistin-resistance in Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiological Methods* 2018;153:31–4. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.08.008>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI M100 ED30:2020. 2020.

Dafopoulou K, Vourli S, Tsakris A, Pournaras S. An update on polymyxin susceptibility testing methods for *Acinetobacter baumannii*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2019;0:1. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1667230>.

Dalmolin TV, Carneiro M dos S, de Castro LP, Volpato FCZ, Wink PL, de Lima-Morales D, *et al.* Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. *Brazilian Journal of Microbiology* 2020a;51:1135–7. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00246-9>.

Dalmolin TV, Mazzetti A, Ávila H, Kranich J, Carneiro GIB, Arend LNVS, *et al.* Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2020b;96:114910. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910>.

- Donà V, Bernasconi OJ, Kasraian S, Tinguely R, Endimiani A. A SYBR® Green-based real-time PCR method for improved detection of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human stool samples. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017;9:57–60. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.007>.
- Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L, *et al.* Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: The MALDIxin test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018a;73:3359–67. <https://doi.org/10.1093/jac/dky330>.
- Dortet L, Broda A, Bernabeu S, Glupczynski Y, Bogaerts P, Bonnin R, *et al.* Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020;75:110–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz405>.
- Dortet L, Potron A, Bonnin RA, Plesiat P, Naas T, Filloux A, *et al.* Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Scientific Reports* 2018b;8:1–5. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35041-y>.
- Escalante EG, Condor KY, di Conza JA, Gutkind GO. Phenotypic detection of plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology* 2020;58:1–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.01555-19>.
- Esposito F, Fernandes MR, Lopes R, Muñoz M, Sabino CP, Cunha MP, *et al.* Detection of colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* by use of assays based on inhibition by EDTA and zeta potential. *Journal of Clinical Microbiology* 2017;55:3454–65. <https://doi.org/10.1128/JCM.00835-17>.
- Fenwick AJ, Bergman Y, Lewis S, Yee R, Uhlemann AC, Cole N, *et al.* Evaluation of the NG-test *mcr-1* lateral flow assay and EDTA-colistin broth disk elution methods to detect plasmid-mediated colistin resistance among Gram-negative bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2020;58:1–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.01823-19>.
- Fonseca e Silva D, Silva-Dias A, Gomes R, Martins-Oliveira I, Ramos MH, Rodrigues AG, *et al.* Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2019;54:820–3. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.016>.
- Furniss CRD, Kostrzewa M, Mavridou DAI, Larrouy-Maumus G. The clue is in the lipid A: Rapid detection of colistin resistance. *PLoS Pathogens* 2020;16:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008331>.
- Furniss RCD, Dortet L, Bolland W, Drews O, Sparbier K, Bonnin RA, *et al.* Detection of colistin resistance in *Escherichia coli* by use of the MALDI biotyper sirius mass spectrometry system. *Journal of Clinical Microbiology* 2019;57:1–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01427-19>.
- Germ J, Cerar Kišek T, Kokošar Ulčar B, Lejko Zupanc T, Mrvič T, Kerin Povšič M, *et al.* Surveillance cultures for detection of rectal and lower respiratory tract carriage of colistin-resistant Gram-negative bacilli in intensive care unit patients: comparison of direct plating and pre-enrichment step. *Journal of Medical Microbiology* 2019a;68:1269–78. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001029>.
- 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. *European Journal of Clinical*

- Microbiology and Infectious Diseases 2019b;38:2159–62. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03657-1>.
- Germ J, Seme K, Cerar Kišek T, Teržan T, Premru MM, Križan Hergouth V, *et al.* Evaluation of a novel epidemiological screening approach for detection of colistin resistant human Enterobacteriaceae isolates using a selective SuperPolymyxin medium. *Journal of Microbiological Methods* 2019c;160:117–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.011>.
- Giordano C, Barnini S. Rapid detection of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS peak-based assay. *Journal of Microbiological Methods* 2018;155:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.008>.
- Girlich D, Bernabeu S, Grosperin V, Langlois I, Begasse C, Arangia N, *et al.* Evaluation of the Amplidiag CarbaRMCR Kit for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing and Colistin-Resistant Bacteria 2019a:1–4.
- Girlich D, Bogaerts P, Bouchahrouf W, Bernabeu S, Langlois I, Begasse C, *et al.* Evaluation of the Novodiag CarbaR+, a Novel Integrated Sample to Result Platform for the Multiplex Qualitative Detection of Carbapenem and Colistin Resistance Markers. *Microbial Drug Resistance* 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0132>.
- Girlich D, Naas T, Dortet L. Comparison of the superpolymyxin and chromid colistin R screening media for the detection of colistin-resistant Enterobacteriaceae from spiked rectal swabs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2019b;63:1–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.01618-18>.
- Hatrongjit R, Kerdsin A, Akeda Y, Hamada S. Detection of plasmid-mediated colistin-resistant and carbapenem-resistant genes by multiplex PCR. *MethodsX* 2018;5:532–6. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.016>.
- He X, Mavrici D, Patfield S, Rubio FM. Development of novel antibodies for detection of mobile colistin-resistant bacteria contaminated in meats. *Scientific Reports* 2018;8:2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34764-2>.
- Hong JS, Kim D, Kang DY, Park BY, Yang S, Yoon EJ, *et al.* Evaluation of the BD Phoenix M50 automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing with clinical isolates in Korea. *Microbial Drug Resistance* 2019;25:1142–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0370>.
- van Hout D, Janssen AB, Rentenaar RJ, Vlooswijk JPM, Boel CHE, Bonten MJM. The added value of the selective SuperPolymyxinTM medium in detecting rectal carriage of Gram-negative bacteria with acquired colistin resistance in intensive care unit patients receiving selective digestive decontamination. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2020;39:265–71. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03718-5>.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2019;57:1–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-19>.
- Ierardi V, Domenichini P, Reali S, Chiappara GM, Devoto G, Valbusa U. *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance identified by atomic force microscopy. *Journal of Biosciences* 2017;42:623–36. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9713-6>.

Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of polymyxin-resistant enterobacteriaceae from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2016;54:2273–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00918-16>.

Jayol Aurélie, 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018a;92:90–4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.006>.

Jayol Aurélie, Nordmann P, André C, Poirel L, Dubois V. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018b;73:1272–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dky012>.

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. *Clinical Microbiology and Infection* 2018;24:175–9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.002>.

Jayol Aurélie, Poirel L, André C, Dubois V, Nordmann P. Detection of colistin-resistant Gram-negative rods by using the SuperPolymyxin medium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018c;92:95–101. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.008>.

Jean SS, Gould IM, Lee W sen, Hsueh PR. New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *Drugs* 2019;79:705–14. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01112-1>.

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 Microbiology* 2020;20:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1692-3>.

Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Creton E, Cotellon G, Sauvadet A, *et al.* Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection of the five families of plasmid-encoded colistin resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2019;53:302–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.022>.

Kon H, Abramov S, Amar Ben Dalak M, Elmaliach N, Schwartz D, Carmeli Y, *et al.* Performance of Rapid Polymyxin™ NP and Rapid Polymyxin™ Acinetobacter for the detection of polymyxin resistance in carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and Enterobacteriales. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020;75:1484–90. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa050>.

Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Ögünç D, Yildiz E, Çolak D, Günseren F, *et al.* Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin against Gram-negative Bacteria. *Mikrobiyoloji Bulteni* 2019;53:254–61. <https://doi.org/10.5578/mb.68066>.

Lei S, Lv J, Gao S, Srinivas S, Feng Y. Developing an efficient multiplex PCR method to detect mcr-like genes. *Science China Life Sciences* 2019;62:705–7. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9512-3>.

Lescat M, Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Performances of the rapid polymyxin acinetobacter and pseudomonas tests for colistin susceptibility testing. *Microbial Drug Resistance* 2019a;25:520–3. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0153>.

- Lescat M, Poirel L, Nordmann P. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of *mcr-1* to *mcr-5* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018;92:267–9. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.010>.
- 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*. *Journal of Clinical Microbiology* 2019b;57:1–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-18>.
- Li B, Chai Z, Yan X, Liu C, Situ B, Zhang Y, *et al.* An enzyme-free homogenous electrochemical assay for sensitive detection of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2018;410:4885–93. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1130-7>.
- Li J, Shi X, Yin W, Wang Y, Shen Z, Ding S, *et al.* A multiplex SYBR green real-time PCR assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02078>.
- Li Z, Cao Y, Yi L, Liu JH, Yang Q. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infectious Diseases* 2019;6:1–10. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz368>.
- Lin Z, Zhao X, Huang J, Liu W, Zheng Y, Yang X, *et al.* Rapid screening of colistin-resistant: *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* by the use of Raman spectroscopy and hierarchical cluster analysis. *Analyst* 2019;144:2803–10. <https://doi.org/10.1039/c8an02220h>.
- Lutgring JD, Kim A, Campbell D, Karlsson M, Brown AC, Burd EM. Evaluation of the MicroScan colistin well and gradient diffusion strips for colistin susceptibility testing in enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology* 2019;57:1–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01866-18>.
- 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. *Journal of Microbiological Methods* 2018;153:35–9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.08.010>.
- Malli E, Papagiannitsis CC, Xitsas S, Tsilipounidaki K, Petinaki E. Implementation of the Rapid Polymyxin™ NP test directly to positive blood cultures bottles. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2019a;95:3–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114889>.
- Malli E, Tsilipounidaki K, Xitsas S, Pyridou P, Papagiannitsis CC, Petinaki E. Implementation of the Rapid Polymyxin *Acinetobacter* Test to Detect Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance* 2019b;00:1–2. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0221>.
- Nabti LZ, Sahli F, Ngaiganam EP, Radji N, Mezaghcha W, Lupande-Mwenebitu D, *et al.* Development of real-time PCR assay allowed describing the first clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring plasmid-mediated colistin resistance *mcr-8* gene in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2020;20:266–71. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.018>.
- Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Phuong DM, Shimada K, Anh NQ, Binh NG, *et al.* Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2015;21:617–9. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.04.002>.

- Nijhuis RHT, Veldman KT, Schelfaut J, van Essen-Zandbergen A, Wessels E, Claas ECJ, *et al.* Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in clinical isolates and stool specimens obtained from hospitalized patients using a newly developed real-time PCR assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016;71:2344–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw192>.
- Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram-negative isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2016a;54:1395–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00446-16>.
- Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases* 2016b;22:1038–43. <https://doi.org/10.3201/eid2206.151840>.
- Osei Sekyere J, Sephofane AK, Mbelle NM. Comparative Evaluation of CHROMagar COL-APSE, MicroScan Walkaway, ComASP Colistin, and Colistin MAC Test in Detecting Colistin-resistant Gram-Negative Bacteria. *Scientific Reports* 2020;10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63267-2>.
- Poirel L, Larpin Y, Dobias J, Stephan R, Decousser JW, Madec JY, *et al.* Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018;90:7–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.012>.
- Przybysz SM, Correa-Martinez C, Köck R, Becker K, Schaumburg F. SuperPolymyxin™ medium for the screening of colistin-resistant gram-negative bacteria in stool samples. *Frontiers in Microbiology* 2018;9:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02809>.
- Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance* 2018;23:1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>.
- Rodriguez CH, Maza J, Tamarin S, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. In-house rapid colorimetric method for detection of colistin resistance in Enterobacterales: A significant impact on resistance rates. *Journal of Chemotherapy* 2019;31:432–5. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1637557>.
- Sadek M, Poirel L, Nordmann P. Optimal detection of extended-spectrum β -lactamase producers, carbapenemase producers, polymyxin-resistant Enterobacterales, and vancomycin-resistant enterococci from stools. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2020a;96:114919. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114919>.
- Sadek M, Tinguely C, Poirel L, Nordmann P. Rapid Polymyxin/Pseudomonas NP test for rapid detection of polymyxin susceptibility/resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2020b;39:1657–62. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03884-x>.
- Sautrey G, Duval RE, Chevalley A, Fontanay S, Clarot I. Capillary electrophoresis for fast detection of heterogeneous population in colistin-resistant Gram-negative bacteria. *Electrophoresis* 2015;36:2630–3. <https://doi.org/10.1002/elps.201500064>.
- Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. crossm Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test for Polymyxin B Resistance 2017a;55:3016–20.

Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Colistin and polymyxin B minimal inhibitory concentrations determined by etest found unreliable for gram-negative bacilli. *Ochsner Journal* 2017b;17:239–42. <https://doi.org/10.1043/1524-5012-17.3.239>.

Simner PJ ;*et al.* Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Bacilli 2019:1–7.

Singhal L, Sharma M, Verma S, Kaur R, Britto XB, Kumar SM, *et al.* Comparative evaluation of broth microdilution with polystyrene and glass-coated plates, agar dilution, E-test, vitek, and disk diffusion for susceptibility testing of colistin and polymyxin B on carbapenem-resistant clinical isolates of acinetobacter baum. *Microbial Drug Resistance* 2018;24:1082–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0251>.

Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. New approach to identify colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by high-resolution melting curve analysis assay. *Letters in Applied Microbiology* 2020;70:290–9. <https://doi.org/10.1111/lam.13270>.

Teo JW, Octavia S, Cheng JW, Lin RT. Evaluation of an in-house developed multiplex real-time PCR for the detection of IMP, OXA-23, GES carbapenemases and the transmissible colistin-resistant mcr gene on the BD MAX™ open system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018;90:67–9. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.010>.

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) 2016:2016.

Tolosi R, Apostolakis I, Laconi A, Carraro L, Grilli G, Cagnardi P, *et al.* Rapid detection and quantification of plasmid-mediated colistin resistance genes (mcr-1 to mcr-5) by real-time PCR in bacterial and environmental samples. *Journal of Applied Microbiology* 2020:0–2. <https://doi.org/10.1111/jam.14738>.

Volland H, Dortet L, Bernabeu S, Boutal H, Haenni M, Madec JY, *et al.* Development and multicentric validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of mcr-1-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology* 2019;57:1–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01454-18>.

Wang H, Chen Y, Strich JR, Drake SK, Youn JH, Rosenberg AZ, *et al.* Rapid detection of colistin resistance protein MCR-1 by LC-MS/MS. *Clinical Proteomics* 2019;16:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9228-2>.

Wang J, Zhou J, Chen Y, Zhang X, Jin Y, Cui X, *et al.* Rapid one-step enzyme immunoassay and lateral flow immunochromatographic assay for colistin in animal feed and food. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2019;10:1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0389-7>.

Wink PL, Caierão J, Nunes AGA, Collar GDS, Martins JB, Dalmolin TV, *et al.* Evaluation of EDTA and Dipicolinic Acid in Broth Microdilution with Polymyxin B as a Phenotypic Test to Detect the mcr-1 Gene. *Microbial Drug Resistance* 2020;26:329–33. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0172>.

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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018;92:102–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.009>.

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*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2020;22:40–2. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.006>.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A detecção de resistência a polimixinas se apresenta como um notável problema no âmbito laboratorial e, apesar de inúmeras técnicas terem sido desenvolvidas e estarem em aperfeiçoamento ainda não há um método que atenda a todos os requisitos recomendados pelas entidades da área, seja pouco oneroso, acessível financeiramente e ao mesmo tempo apresente bons resultados em todas as principais espécies envolvidas neste mecanismos de resistência.

De fato, nota-se que alguns problemas são recorrentes em diferentes técnicas, como é o caso da heteroresistência em cepas de *Enterobacter* spp. Diferentemente da resistência tradicional, onde toda a linhagem bacteriana é resistente a um determinado medicamento, a heteroresistência consiste na presença de uma subpopulação de células bacterianas resistentes ao antibiótico, dentro de uma população suscetível. Este fenômeno é, muitas vezes, subestimado ou não detectado, levando a falhas no tratamento, uma vez que as células suscetíveis são eliminadas enquanto a subpopulação resistente sobrevive e se reproduz rapidamente. Por isso, há a necessidade de métodos específicos para detecção deste fenômeno, especialmente quando a subpopulação é excessivamente baixa e, portanto, ainda mais difícil de detectar (Bardet & Rolain, 2018; Sherman *et al.*, 2019).

Outro desafio é a melhoria na execução dos testes de sensibilidade, uma vez que atualmente ainda apresentam uma série de desafios, tais como: a má difusão da droga em ágar, as propriedades policatiônicas da molécula da droga que se adere a superfícies negativamente carregadas e a variação de composição química do medicamento (Bardet & Rolain, 2018).

Além disso, há uma considerável discrepância entre os métodos para a detecção de resistência à polimixinas, principalmente no que diz respeito a execução técnica. Resultados inconsistentes não contribuem para avanços na resolução da atual questão chave com relação as polimixinas, que é a determinação do melhor método para a detecção de resistência.

Por isso, uma análise crítica deve ser feita antes da implementação de um método com este objetivo, levando em consideração as recomendações vigentes, as reais necessidades do laboratório e as metodologias utilizadas nos estudos que serviram de embasamento para a tomada de decisão, visto que nem sempre refletem as recomendações metodológicas atuais.

Sendo assim, é possível concluir que dificilmente haverá um método universal capaz de atender as necessidades de todos os laboratórios. Seja pela ampla variedade de condições estruturais e financeiras das instituições, seja pelas características de interesse epidemiológico locais. Entretanto, a associação de técnicas parece ser um caminho viável, visto que é possível atender as necessidades clínicas com métodos de *screening* e de determinação de níveis de

concentração inibitória mínima com alguns testes, e obter a confirmação de mecanismo de resistência para fins epidemiológicos com outros testes.

REFERÊNCIAS

- Bardet L, Rolain JM. Development of new tools to detect colistin-resistance among enterobacteriaceae strains. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3095249>.
- Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017;36:415–20. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2846-y>.
- Gharaibeh MH, Shatnawi SQ. An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. *Veterinary World* 2019;12:1735–46. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1735-1746>.
- Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, Tooke CL, et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Scientific Reports* 2017;7:1–10. <https://doi.org/10.1038/srep39392>.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2019;57:1–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-19>.
- Jean SS, Gould IM, Lee W sen, Hsueh PR. New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *Drugs* 2019;79:705–14. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01112-1>.
- Lepelletier D, Bonnet R, Plésiat P, Nicolas-Chanoine MH, Berger-Carbonne A, Chidiac C, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1) among Enterobacteriaceae strains: Laboratory detection of resistance and measures to control its dissemination. *Medecine et Maladies Infectieuses* 2018;48:250–5. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.01.010>.
- Li Z, Cao Y, Yi L, Liu JH, Yang Q. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infectious Diseases* 2019;6:1–10. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz368>.
- 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. *The Lancet Infectious Diseases* 2016;16:161–8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Moffat JH, Harper M, Boyce JD. Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. vol. 1145. 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0>.
- Osei Sekyere J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen* 2019;8:1–21. <https://doi.org/10.1002/mbo3.682>.
- Sherman EX, Wozniak JE, Weiss DS. Methods to Evaluate Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*, 2019, p. 39–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_4.
- Wang C, Feng Y. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10 2020;9.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH

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. 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