

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso

Diluição em ágar na detecção de resistência às polimixinas

Victoria Tedesco Ramos

Porto Alegre, novembro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso

Diluição em ágar na detecção de resistência às polimixinas

Victoria Tedesco Ramos

Prof^a. Dr^a. Juliana Caierão

Orientadora

Porto Alegre, novembro de 2020.

Para meus pais, Giovanna, Cherie e Nina.

Amo vocês.

A ciência desperta um sentimento sublime.

(Carl Sagan)

Este artigo foi elaborado segundo as normas do periódico "Clinical and Biomedical Research" apresentadas em anexo.

RESUMO

As polimixinas despertaram interesse nos últimos anos como estratégia no combate a infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, após terem sido praticamente abandonadas por anos devido a sua elevada nefrotoxicidade. Com isso, ressurgiu, também, a necessidade de avaliar as metodologias de detecção de resistência a essa classe de antibióticos. Ambos os comitês internacionais de padronização (CLSI e EUCAST) definem como método de referência para esse fim a microdiluição em caldo (BMD). Entretanto, diversos estudos têm apontado a diluição em ágar (DA) como um método igualmente satisfatório, apresentando correlação aceitável com a BMD, o que justificou sua inserção, em 2020, no documento do CLSI como método aceitável para a detecção da suscetibilidade à colistina. Inóculos mais volumosos (10 µL) foram essenciais para que essa metodologia apresentasse performance adequada. Cabe ressaltar que, como qualquer metodologia, a DA apresenta desvantagens que devem ser consideradas ao avaliar a possibilidade de implementação na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica. A triagem em ágar (*agar screening*), uma variação da DA, é apresentada como uma opção qualitativa e menos laboriosa para a rotina laboratorial, com aplicação possibilitada pela estreita janela terapêutica das polimixinas, onde a determinação da concentração inibitória mínima pode ter menor impacto no tratamento do paciente. Portanto, apesar de se tratar de um método trabalhoso, a DA surge como um método confiável para a determinação de resistência às polimixinas, com possibilidade de utilização da sua versão qualitativa, para fins de triagem.

Palavras-chave: Polimixinas, polimixina B, colistina, diluição em ágar, microdiluição em caldo.

ABSTRACT

The interest on polymyxins arised recently as a strategy to fight infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria, after being practically abandoned for years due to their high nephrotoxicity. Accordingly, the need to evaluate the methodologies for detecting resistance to this class of antibiotics also reappears. Both international standardization committees (CLSI and EUCAST) define broth microdilution (BMD) as the reference method for this purpose. However, several studies have pointed to agar dilution (AD) as an equally satisfactory method, capable of agreeing with BMD, which justified its inclusion, in 2020, in the CLSI document as an acceptable method for detecting susceptibility to colistin. Larger inoculum (10 μ L) were essential for this methodology to present the adequate performance. It is worth mentioning that, like any methodology, AD has disadvantages that must be evaluated when assessing the possibility of implementation in the routine of clinical microbiology laboratories. Agar screening, a variation of AD, is presented as a qualitative and less laborious option for laboratory routine, with its application making it possible by the narrow polymyxin therapy window, where the determination of the minimum inhibitory concentration may have less impact on the patient treatment. Therefore, despite being a labourious method, an AD arise as a reliable method for determining resistance to polymyxins, with the possibility of using its qualitative version, for screening purposes.

Keywords: Polymyxins, polymyxin B, colistina, agar dilution, broth microdilution.

INTRODUÇÃO

As opções terapêuticas efetivas em casos de infecções por bactérias multirresistentes são restritas atualmente. Esse cenário levou a um interesse aumentado por antimicrobianos há tempos deixados de lado na prática clínica, como as polimixinas. As polimixinas são uma classe de antibióticos descoberta na década de 1940 e isoladas de uma bactéria encontrada no solo (*Paenibacillus polymyxa*). São cinco polimixinas descritas, no entanto, apenas as polimixinas B e E (colistina) têm aplicação clínica, sendo ambas associadas à elevada nefrotoxicidade^{1,2}.

As polimixinas são polipeptídeos policatiônicos cíclicos constituídos, estruturalmente, por um anel heptapeptídeo, ácido 2,4-diaminobutírico e um ácido graxo ligado à estrutura por uma ligação amida³. A colistina se diferencia da polimixina B em apenas um aminoácido, estando presente a D-leucina ao invés de D-fenilalanina na posição 6 do anel peptídico. Enquanto a polimixina B é administrada já como antibiótico ativo, a colistina tem sua administração na forma de colistimetato de sódio, uma pró-droga que se converte em colistina na presença de líquidos biológicos^{3,4}.

Essa classe de antibióticos tem como alvo a membrana externa e citoplasmática de bactérias Gram-negativas. Agem ligando-se ao lipopolissacarídeo (LPS), mais especificamente ao lipídeo A, deslocando os íons de cálcio e magnésio, responsáveis pela estabilização da membrana, levando a um aumento da permeabilidade e consequente perda de material citoplasmático que resulta na morte celular^{4,5}.

O recente interesse que as polimixinas têm levantado também chama a atenção para a necessidade de testes de suscetibilidade padronizados. Contudo, características como sua estrutura catiônica, limitada difusão em ágar e afinidade por plásticos constituem dificuldades para a determinação de um método padronizado com performance adequada^{6,7}.

Em relação ao teste de disco-difusão, o tamanho e carga das polimixinas dificultam a sua difusão através do ágar, resultando em taxas significativas de falsa suscetibilidade, comprometendo a performance do método⁸.

Da mesma forma, metodologias baseadas em fitas de gradiente de concentração do antimicrobiano, tais como o Etest[®], quando comparadas à

microdiluição em caldo (*broth microdilution* – BMD), apresentam erros muito graves e falsa-suscetibilidade em função da sua dificuldade de difusão em ágar. Assim, estes métodos têm, também, performances não aceitáveis para esse fim⁸.

O uso de sistemas automatizados permite a determinação mais rápida da suscetibilidade aos antimicrobianos quando comparados a métodos manuais⁹. No entanto, em relação à BMD, apresentam baixa sensibilidade na identificação de isolados resistentes às polimixinas, se mostrando não confiáveis de forma geral, principalmente quando diante de subpopulações heteroresistentes⁵. Estudos comparativos demonstram, por exemplo, que o sistema Vitek 2[®] (bioMérieux) tem baixa sensibilidade na detecção de resistência à colistina¹⁰. Da mesma forma, o sistema Phoenix[®] (BD Diagnostics) também parece ter altas taxas de falsa suscetibilidade, com a tendência de subestimar a concentração inibitória mínima (CIM) e com baixa sensibilidade na detecção de heteroresistência^{5,11}. Essas observações também se aplicam ao sistema MicroScan[®] (Beckman Coulter Diagnostics)¹².

Pela má performance dos métodos discutidos acima, a BMD é considerada a metodologia referência para a determinação da suscetibilidade às polimixinas⁹. No entanto, deve-se ressaltar que é um método trabalhoso e de difícil execução na rotina de alguns, se não muitos, laboratórios de análises clínicas.

Nesse sentido, a avaliação de metodologias alternativas para a determinação da suscetibilidade às polimixinas apresenta expressiva relevância. A diluição em ágar (DA) tem sido avaliada por diversos autores para esse fim^{13–17}, demonstrando forte correlação com os resultados da BMD. Embora, teoricamente, apresente um certo grau de complexidade técnica, a DA evita a adesão da polimixina ao plástico, o que pode ocorrer no método com caldo. A diluição em ágar apresenta, ainda, a vantagem de se poder testar múltiplos isolados em apenas uma placa^{2,5,16–19}.

Atualmente, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) estabelece pontos de corte clínicos para *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., categorizando os isolados como “intermediários” ou “resistentes” à polimixina B ou colistina, utilizando, para isso, BMD, diluição em ágar ou eluição do disco em caldo^{8,20}. A categoria “sensível” não está presente, reiterando que, mesmo frente a isolados suscetíveis, as polimixinas podem apresentar baixa resposta clínica, o que está associado às suas características farmacocinéticas/farmacodinâmicas. Já o *European Committee on Antimicrobial*

Susceptibility Testing (EUCAST) considera apenas a BMD como método de referência para a determinação de resistência à colistina e estabelece pontos de corte epidemiológicos para a interpretação dos resultados²¹.

Esta revisão bibliográfica descritiva discute o método de diluição em ágar, suas características, vantagens, desvantagens e modificações, comparando-o com a BMD para determinação da suscetibilidade às polimixinas.

MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Na diluição em caldo, uma suspensão bacteriana de concentração padronizada é incubada na presença de diversas concentrações de antimicrobianos (diluições seriadas) em um meio de cultura líquido. Duas variações do método são possíveis considerando o volume de caldo empregado: a macrodiluição, que utiliza tubos de ensaio de vidro e um volume mínimo de 2 mL de caldo; e a microdiluição, empregando volumes de 0,05 a 0,1 mL em microplacas de poliestireno de 96 poços⁵.

Conforme comentado anteriormente, a microdiluição em caldo é o único método para determinação de CIM aprovado por ambos os comitês internacionais de padronização, CLSI e EUCAST^{22,23}, com resultados consistentes quando realizada de acordo com as recomendações das organizações citadas²⁴.

O CLSI recomenda a realização da BMD em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado, com concentrações seriadas de polimixina variando, por exemplo, entre 0,12 a 256 µg/mL, e um inóculo bacteriano padronizado. O inóculo, com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland é diluído e adicionado a cada poço da placa, com o objetivo de atingir uma concentração bacteriana final de, aproximadamente, 5×10^5 UFC/mL¹³. A CIM é definida como a concentração mais baixa de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano visível após incubação à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ¹³, por 16-20h.

É necessário realizar a BMD com caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado pois variações nas concentrações de cátions podem interferir na performance do teste. De fato, cálcio e magnésio reduzem a atividade *in vitro* das polimixinas, possivelmente devido à interação destes cátions com a membrana externa bacteriana^{25,26}. Sabe-se que, para interferir na ação bactericida da polimixina B, Ca^{2+} e Mg^{2+} devem estar na concentração de 2 mM²⁵. Baseado nisso, a concentração

final no meio de cultura deve ser de 20-25 mg/L de cálcio e 10-12,5 mg/L de magnésio.

Quanto a cátions como ferro, zinco e manganês, que podem estar presentes na composição do ágar MH, ainda não se sabe seu efeito sobre a ação das polimixinas. Entretanto, esses íons já foram documentados afetando a CIM de outros antimicrobianos como a tigeciclina²⁷. Reforça-se aqui a necessidade do controle de qualidade dos meios para garantir tais concentrações^{25,26}.

A BMD deve ser realizada em placas de poliestireno sem a adição de surfactantes como o polisorbato 80 (P80)²⁸. É conhecida a tendência das polimixinas de se aderirem a plásticos como o de placas utilizadas na BMD e estudos mostram impacto significativo nas CIMs obtidas com o uso deste material^{29,30}. Essa aderência seria eliminada através da adição do P80, um surfactante não iônico, na concentração de 0,002%. Entretanto, foi demonstrado que o P80, *per se*, apresenta certa atividade antimicrobiana. De fato, estudos sugerem que esse surfactante apresenta atividade sinérgica com a polimixina B em concentrações tão baixas quanto 0,001%³¹. Esse efeito seria causado pela ação do surfactante não iônico junto à membrana externa da bactéria, assim como agem as polimixinas. Dessa forma, a adição do P80 tem maior peso na sua ação sinérgica do que reduzindo a adesão das polimixinas ao plástico, o que levou ambos os comitês, CLSI e EUCAST, a concordarem que a metodologia referência para determinação da CIM de polimixinas não deve conter a adição de P80 ou outros surfactantes^{8,21,32}.

Apesar de ser considerada a técnica de referência, alguns desafios podem ser enfrentados com a BMD. Possivelmente, o principal deles é a ocorrência de *skipped wells*, dificultando a leitura e, conseqüentemente, a determinação da CIM. *Skipped well* se refere ao não crescimento bacteriano em um poço, apesar do crescimento em poços com maiores concentrações do antimicrobiano. Landman *et al.*³³ afirmam em seu estudo que isolados com múltiplos *skipped wells* apresentariam CIMs ilegíveis quando determinadas por BMD.

Nesse sentido, o documento do CLSI estabelece que um único *skipped well* é aceitável e que, nesses casos, o poço com a maior CIM deve ser considerado. No entanto, isolados com mais de um *skipped well* devem ser considerados como tendo CIM de polimixina não interpretável²². A presença de *skipped wells* está associada, dentre outros fatores, à ocorrência de heteroresistência³⁴ que, não raras vezes, é

observada para as polimixinas, sendo mais frequente em algumas bactérias, tais como *Enterobacter* spp.³⁵ e *Acinetobacter baumannii*³⁶.

DILUIÇÃO EM ÁGAR

A diluição em ágar foi desenvolvida em 1929, porém passou a ser empregada em suas versões finais apenas na década de 1940 sendo utilizada até hoje³⁷. Se trata de um método já bem estabelecido que produz resultados quantitativos, determinando a CIM de diversos antimicrobianos³⁷⁻³⁹.

Nesse método, o antimicrobiano é adicionado ao ágar Mueller-Hinton em concentrações seriadas enquanto este ainda se encontra na forma líquida e a mistura é vertida em placas, para solidificação. Cada placa corresponde a uma concentração do antimicrobiano. Em geral, utiliza-se entre 6 e 12 placas para a determinação da CIM, o que pode ser considerada uma desvantagem da técnica, pelo excesso de trabalho envolvido.

Em relação ao inóculo bacteriano, deve-se partir de uma suspensão com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual será diluída e um volume será aplicado na superfície da placa, de modo a obter uma concentração final de bactéria de, aproximadamente, 1×10^4 UFC/mL^{5,18,40}. Como regra, o volume de inóculo adicionado é de 1 μ L. As placas são, então, incubadas por 18 a 24 horas à $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^{5,39}$. Após incubação, é avaliada a presença de colônias na superfície do ágar e a CIM é definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de mais de uma colônia na superfície do ágar⁴¹.

Apesar de considerado um método laborioso para a rotina laboratorial, a diluição em ágar tem sido aplicada em situações específicas. Por exemplo, é o método de referência para a determinação da suscetibilidade de diversos gêneros bacterianos à fosfomicina e um dos métodos possíveis para determinar a suscetibilidade de *S. aureus* à vancomicina^{42,43}. Diversos estudos ainda utilizam a diluição em ágar como método de referência, uma vez que ela apresenta resultados confiáveis e reprodutíveis, para determinação de suscetibilidade à amoxicilina, azitromicina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina, levofloxacino e tigeciclina^{14,44-46}.

O EUCAST não recomenda a diluição em ágar na determinação da suscetibilidade às polimixinas. Já, o CLSI incluiu no seu documento mais recente, de

janeiro de 2020, a recomendação da utilização da diluição em ágar para esse fim. No entanto, deve-se ressaltar que foi publicada a recomendação para a determinação da suscetibilidade à colistina, mas não à polimixina B utilizando DA.

As vantagens da DA incluem a possibilidade de testar múltiplos isolados em uma única placa, além de se tratar de um método com bom custo-benefício, alta reprodutibilidade e confiabilidade na determinação da CIM^{5,38}. Moskowitz *et al.* indica em seu estudo que a diluição em ágar é o método mais sensível para a detecção de resistência às polimixinas em isolados de *P. aeruginosa*¹⁶.

Tanto a polimixina B quanto a colistina consistem na mistura de compostos químicos com atividade antimicrobiana variável. Essa variação entre os componentes, lotes e fabricantes pode ser uma influência na determinação da CIM²⁴.

Embora a colistina seja amplamente utilizada no mundo, alguns países, como o Brasil, têm acesso exclusivamente à polimixina B. Além disso, algumas instituições preferem polimixina B em detrimento à colistina, devido ao fato de a primeira apresentar perfil farmacológico levemente menos tóxico às células renais. Diante disso, e considerando que, apesar de semelhantes, são dois fármacos distintos que devem ser tratados como tal, o CLSI não recomenda mais a utilização de pontos de corte de colistina para prever suscetibilidade à polimixina B. Ao contrário, estabeleceu pontos de corte específicos para ambos os compostos^{20,47}.

Para a realização da DA, a colistina deve ser dissolvida em água estéril e adicionada ao ágar MH de forma a obter-se diluições seriadas^{5,18,40}. Quanto ao volume do inóculo, Humphries *et al.* realizaram um estudo comparativo, que embasou a publicação da técnica pelo CLSI, demonstrando que inóculos de 10 µL apresentam resultados mais satisfatórios do que 1 µL. De fato, o volume maior do inóculo esteve relacionado a percentuais menores de erros muito graves (*very major errors* – VME), além de facilitarem a leitura e interpretação das CIMs. O benefício do inóculo de 10 µL é mais evidente quando avaliados isolados de *Acinetobacter* spp., para os quais houve aumento da concordância categórica junto à redução de VME. Além disso, testes interlaboratoriais demonstraram concordância de 100% quando utilizado maior volume de inóculo para isolados de *Enterobacterales* e *P. aeruginosa* e 95,2% para *A. baumannii*⁴⁷.

Entre as desvantagens relacionadas à DA estão o fato de ser um método laborioso (embora possa ser semiautomatizado), e o preparo das placas requerer

tempo, uma vez que não estão disponíveis comercialmente e que devem ser utilizadas placas frescas, recém preparadas^{5,39}. No entanto, um estudo avaliou a estabilidade da colistina em ágar em placas preparadas previamente e armazenadas sob refrigeração. Não foram observadas discrepâncias nas CIMs obtidas utilizando placas armazenadas por 7 dias nessas condições se comparadas àquelas preparadas imediatamente antes da realização do teste⁴⁸. Esse é um achado bastante relevante, já que torna a realização da técnica mais factível para a realidade dos laboratórios de microbiologia clínica.

Uma variável a afetar os testes de diluição em ágar poderia ser a distribuição heterogênea do antimicrobiano na placa. Nesse sentido, Turlej-Rogacka *et al.* avaliou a distribuição da colistina no ágar, encontrando igual distribuição em diferentes pontos na mesma placa. Esses resultados, junto com as CIMs obtidas, demonstraram alta reprodutibilidade, robustez e confiabilidade da diluição em ágar⁴⁸.

Em comparações realizadas por estudos anteriores, encontrou-se uma concordância satisfatória entre a diluição em ágar e a microdiluição em caldo^{2,6,18,19}. Dafopoulou *et al.* apresentam percentual de suscetibilidade à colistina similares entre os métodos de DA e BMD⁴⁹. Em outro estudo, resultados semelhantes foram encontrados observando-se uma concordância de 97,6% entre os dois métodos na determinação da suscetibilidade à polimixina B, sendo verificado 2,4% de erro maior (major error - ME)¹⁹.

Um estudo com 50 isolados clínicos empregando a adição de P80 encontrou uma concordância de 94% entre os dois métodos¹⁸. Gales *et al.* aponta também uma excelente concordância entre DA e BMD, sendo que as divergências observadas ficaram dentro do intervalo de uma diluição⁶. Variações de uma diluição para mais ou para menos são aceitáveis em testes de diluições seriadas, pois são consideradas uma variação inerente ao método⁵⁰.

Turlej-Rogacka *et al.* concluíram em seu estudo que a DA seria o método de melhor reprodutibilidade em relação à BMD, já que a microdiluição em caldo apresentou importantes desvios, especialmente relacionados à heteroresistência. Os autores apontam que esse fenômeno poderia superestimar as CIMs, caracterizando isolados suscetíveis como resistentes (ME) às polimixinas⁴⁸.

No entanto, um contraponto a essa afirmação é o fato de que os inóculos maiores utilizados na BMD (5×10^5 UFC/mL) em relação à DA (1×10^4 UFC/mL) seriam benéficos para a determinação de subpopulações resistentes em isolados

clínicos suscetíveis à colistina, representando, então, uma limitação da DA⁴⁸. Tais subpopulações têm grande possibilidade de emergir e se tornarem dominantes, especialmente ao longo do tratamento, e a detecção de heteroresistência no laboratório pode ser de vital importância. Ainda no que diz respeito à heteroresistência, Lo Ten Foe *et al.* aponta discrepâncias nas CIMs obtidas por DA e BMD de isolados de *E. cloacae* heteroresistentes, reiterando a influência importante desse fenômeno na determinação da CIM².

Alguns estudos apontam a tendência de obter-se CIMs maiores pelo método da DA em relação a BMD^{17,49}. Ezadi *et al.* sugere que a razão para isso seria as diferentes concentrações de cátion presentes no ágar MH, enquanto o caldo tem parâmetros definidos para cálcio e magnésio⁵¹. Novamente, um adequado controle de qualidade reveste-se de particular importância para garantir que a composição do ágar MH não influencie na atividade das polimixinas e, conseqüentemente, na performance da DA.

Uma vez que as polimixinas apresentam janela terapêutica estreita, a determinação da CIM pode não ser essencial, especialmente quando comparado a antimicrobianos com janelas terapêuticas amplas, tais como os beta-lactâmicos. Portanto, definir, por exemplo, que um determinado microrganismo tem CIMs de polimixinas ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, caracterizando-o como resistente, pode ser suficiente para o adequado tratamento do paciente. Isso torna os testes de triagem em ágar (*agar screening*) opções tentadoras para a implementação na rotina de laboratórios de bacteriologia clínica, já que são menos trabalhosos que a diluição em ágar.

Neste caso, uma única placa de ágar é necessária, pois apenas uma concentração, geralmente aquela correspondente ao ponto de corte, é empregada. Diferentemente da diluição em ágar, este se trata de um método qualitativo e o crescimento de mais de uma colônia na superfície do ágar classifica o isolado como resistente ou suscetível, respectivamente.

Apesar de qualitativo, a triagem em ágar é um método de simples execução e que não requer equipamentos especiais como descrevem Nordmann *et al.* em seu estudo, no qual apresentam um meio de cultura universal para o *screening* de bactérias gram-negativas resistentes às polimixinas, utilizando colistina como antimicrobiano testado. A sensibilidade e especificidade encontradas foram de 100% independentemente do mecanismo de resistência às polimixinas⁵². Outros estudos

também consideraram esse meio como adequado para a triagem de resistência à colistina⁵³⁻⁵⁵.

CONCLUSÕES

A escassez de novos antimicrobianos capazes de combater bactérias Gram-negativas multirresistentes tem atraído o interesse por antibióticos que haviam caído em desuso como as polimixinas, que possuem elevada toxicidade, especialmente renal. Com isso, ressurgem também a necessidade de determinar e avaliar os métodos de detecção de resistência às polimixinas. Para isso, a microdiluição em caldo é o método de referência.

No entanto, a diluição em ágar tem demonstrado excelente performance na detecção da suscetibilidade às polimixinas, justificando sua inserção no documento mais recente do CLSI, como metodologia indicada para esse fim. De fato, estudos demonstram uma excelente correlação entre a diluição em ágar e a microdiluição em caldo.

Deve-se salientar que ambos os métodos têm suas vantagens e desvantagens, que variam desde o preparo dos meios até a leitura do resultado, e que devem ser avaliadas no momento da seleção do método para a implementação na rotina laboratorial.

Uma possibilidade mais simples para a determinação de resistência para uso clínico é triagem em ágar, um teste qualitativo baseado na diluição em ágar. Devido à janela terapêutica estreita, a determinação da CIM, pode não ser essencial em muitas situações clínicas. Assim, a triagem em ágar é um método atrativo para os laboratórios clínicos, já que é menos trabalhoso e tem melhor custo benefício.

Referências

1. van der Heijden IM, Levin AS, De Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, et al. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007;6:8.
2. Lo-ten-foe JR, Smet AMGA De, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, Keulen PHJ Van. Comparative Evaluation of the VITEK 2 , Disk Diffusion , Etest , Broth Microdilution , and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates , Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains . 2007;51(10):3726–30.
3. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet.* 1997 Feb 8;349(9049):418-22. doi: 10.1016/S0140-6736(97)80051-7. PMID: 9033483.
4. Mendes Carlos Alberto Caldeira, Burdmann Emmanuel A. Polimixinas - Revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2009 julho;55(6):752-759.
5. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Vol. 30, *Clinical Microbiology Reviews.* American Society for Microbiology; 2017. p. 557–96.
6. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: Review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):183–90.
7. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. Vol. 12, *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* Elsevier Ltd; 2018. p. 124–36.
8. Turnidge J, Sei K, Mouton J. Polymyxin Susceptibility Testing and Breakpoint Setting. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2019. p. 117–32.
9. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis [Internet].* 2009 Dec 1;49(11):1749–55. Available from: <https://doi.org/10.1086/647952>
10. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 May;13(5):541–4.
11. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Sep;72(9):2528–30.
12. Perez LRR. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system. *APMIS [Internet].* 2015 Nov 1;123(11):951–4. Available from: <https://doi.org/10.1111/apm.12438>
13. Tan TY, Siew L, Ng Y. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. 2006;(August):864–7.
14. Miftahussurur M, Fauzia KA, Nusi IA, Setiawan PB, Syam AF, Waskito LA, et al. E-test versus agar dilution for antibiotic susceptibility testing of *Helicobacter*

- pylori: A comparison study. BMC Res Notes [Internet]. 2020;13(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4877-9>
15. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. Lett Appl Microbiol. 2011;53(5):546–51.
 16. Moskowitz SM, Garber E, Chen Y, Clock SA, Tabibi S, Miller AK, et al. Colistin susceptibility testing: Evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 2010;65(7):1416–23.
 17. Hogardt M, Schmoldt S, Götzfried M, Adler K, Heesemann J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2004 Dec 1;54(6):1057–61. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh470>
 18. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol [Internet]. 2013 Jun 1;51(6):1678 LP – 1684. Available from: <http://jcm.asm.org/content/51/6/1678.abstract>
 19. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, et al. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. Int J Infect Dis [Internet]. 2010;14(7):e596–601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.09.001>
 20. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th edition. Vol. 40. 2020.
 21. EUCAST_colistin. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. [Http://WwwEucastOrg](http://www.EucastOrg) [Internet]. 2016;(March, 22):2016. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
 22. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. 2015;(January).
 23. Committee TE, Testing AS, Changes C, Guidance N, Breakpoint E, Dosages T, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2020;
 24. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: Where are we now? Pharmacotherapy. 2015;35(1):22–7.
 25. Chen CC, Feingold DS. Locus of divalent cation inhibition of the bactericidal action of polymyxin B. Antimicrob Agents Chemother. 1972;2(5):331–5.
 26. NEWTON BA. Site of action of polymyxin on *Pseudomonas aeruginosa*: antagonism by cations. J Gen Microbiol. 1954;10(3):491–9.
 27. Veenemans J, Mouton JW, Kluytmans JAJW, Donnely R, Verhulst C, Van Keulen PHJ. Effect of Manganese in test media on in vitro susceptibility of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. J Clin Microbiol. 2012;50(9):3077–9.
 28. Bardet L, Rolain JM. Development of new tools to detect colistin-resistance among enterobacteriaceae strains. Vol. 2018, Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. Hindawi Limited; 2018.
 29. Albur M, Noel A, Bowker K, MacGowan A. Colistin susceptibility testing: time for a review. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2014 May 1;69(5):1432–4. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt503>

30. Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Cars O. Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Oct 24;61(11):e00857-17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893773>
31. Group PM. *Pseudomonas aeruginosa*. 1971;367–73.
32. Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012;74(4):412–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.025>
33. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter* species. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2013 Dec 1;51(12):4106 LP – 4111. Available from: <http://jcm.asm.org/content/51/12/4106.abstract>
34. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae*; Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 May 1;59(5):2780 LP – 2784. Available from: <http://aac.asm.org/content/59/5/2780.abstract>
35. Kang KN, Klein DR, Kazi MI, Guérin F, Cattoir V, Brodbelt JS, et al. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy-l-arabinose addition to lipid A. *Mol Microbiol*. 2019 Jun;111(6):1604–16.
36. Sherman EX, Wozniak JE, Weiss DS. Methods to Evaluate Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods Mol Biol*. 2019;1946:39–50.
37. Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(SUPPL. 1):1–4.
38. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163–75.
39. Schumacher A, Vranken T, Malhotra A, Arts JJC, Habibovic P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. Vol. 37, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Springer Verlag; 2018. p. 187–208.
40. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2012;0–72. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf
41. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada - Sexta Edição. Vol. 23.
42. BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versão 2.0. 2020;

43. Mueller L, Cimen C, Poirel L, Descombes M-C, Nordmann P. Prevalence of fosfomycin resistance among ESBL-producing *Escherichia coli* isolates in the community, Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2019 May;38(5):945–9.
44. McAuliffe GN, Smith M, Cooper G, Forster RF, Roberts SA. Variability in azithromycin susceptibility results for *neisseria gonorrhoeae* obtained using gradient MIC strip and agar dilution techniques. *J Clin Microbiol*. 2019;57(12):1–6.
45. Özkök S, Togan T, Yesilkaya A, Timurkaynak F, Azap ÖK, Arslan H. In vitro susceptibility of tigecycline against multidrug-resistant gram-negative strains: Etest versus agar dilution. *Chemotherapy*. 2014;60(3):151–6.
46. Barberis CM, Sandoval E, Rodriguez CH, Ramírez MS, Famiglietti A, Almuzara M, et al. Comparison between disk diffusion and agar dilution methods to determine in vitro susceptibility of *Corynebacterium* spp. clinical isolates and update of their susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Sep;14:246–52.
47. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, et al. crossm Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test : a Report from the Clinical and Laboratory. 2019;(October):1–10.
48. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S, et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(2):345–53.
49. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. 2015;59(8):4625–30.
50. Barry AL, Braun LE. Reader error in determining minimal inhibitory concentrations with microdilution susceptibility test panels. *J Clin Microbiol*. 1981;13(1):228–30.
51. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: Challenges, issues, and recommendations. Vol. 57, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2018.
52. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram-negative isolates. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1395–9.
53. van Hout D, Janssen AB, Rentenaar RJ, Vlooswijk JPM, Boel CHE, Bonten MJM. The added value of the selective SuperPolymyxin™ medium in detecting rectal carriage of Gram-negative bacteria with acquired colistin resistance in intensive care unit patients receiving selective digestive decontamination. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020;39(2):265–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03718-5>
54. 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. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2019 Jan 1;63(1):e01618-18. Available from: <http://aac.asm.org/content/63/1/e01618-18.abstract>
55. 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. *Front Microbiol*. 2018;9(NOV):1–7.

ANEXO - Normas do periódico “Clinical and Biomedical Research”

Instruções aos Autores

Escopo e política

A Clinical and Biomedical Research (CBR), antiga Revista HCPA, é uma publicação científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). É um periódico científico de acesso livre que tem a finalidade de publicar trabalhos de todas as áreas relevantes das Ciências da Saúde, incluindo pesquisa clínica e básica. Os critérios de seleção para publicação incluem: originalidade, relevância do tema, qualidade metodológica e adequação às normas editoriais da revista.

A CBR apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] e do *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) [http://www.icmje.org/clin_trial.pdf]. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido número de identificação do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) <http://www.ensaiosclinicos.gov.br> ou de outro banco de dados oficial dedicados ao registro de ensaios clínicos.

Todos os artigos publicados são revisados por pares anônimos. Uma vez que o artigo seja aceito para publicação, os seus direitos autorais são automaticamente transferidos para a revista. O conteúdo do material enviado para publicação na CBR implica que o mesmo não tenha sido publicado e não esteja submetido a outra revista. Artigos publicados na CBR, para serem publicados em outras revistas, ainda que parcialmente, necessitarão de aprovação por escrito dos editores. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de total responsabilidade dos autores. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. As submissões em inglês são fortemente encorajadas pelos editores.

O manuscrito deve enquadrar-se em uma das diferentes categorias de artigos publicados pela revista, conforme a seguir:

Forma e preparação de artigos

SERÃO CONSIDERADOS PARA PUBLICAÇÃO

Editorial

Comentário crítico e aprofundado, preparado a convite dos editores e submetido por pessoa com notório saber sobre o assunto abordado. Os editoriais podem conter até 1000 palavras. Esta seção pode incluir o editorial de apresentação da Revista, assinado pelo Editor, além de editoriais especiais, que compreendem colaborações solicitadas sobre temas atuais ou artigos publicados na Revista.

Instruções aos Autores

Artigos de Revisão

Artigos que objetivam sintetizar e avaliar criticamente os conhecimentos disponíveis sobre determinado tema. Devem conter até 6.000 palavras. Esses artigos devem apresentar resumo, não estruturado com número não superior a 200 palavras (exceto revisões sistemáticas – ver estrutura de resumo em ‘Artigos Originais’) e uma lista abrangente, mas preferencialmente não superior a 80 referências.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Artigos Especiais

Manuscritos exclusivamente solicitados pelos editores, sobre tema de relevância científica, a autores com reconhecida expertise na área e que não se enquadrem nos critérios de Editorial.

Artigos Originais

Artigos com resultados inéditos de pesquisa, constituindo trabalhos completos que contêm todas as informações relevantes que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A sua estrutura de texto deve apresentar os tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. A(s) conclusão(ões) deve(m) estar no último parágrafo da Discussão, não sendo necessária uma seção específica. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas. Para os artigos originais, deve-se apresentar um resumo estruturado (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões), caso o artigo for escrito no idioma português, deverá apresentar também o resumo e título em inglês. O Resumo e o Abstract não devem exceder 250 palavras.

Os artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documentos suplementares em arquivos individuais.

Relatos de Caso

São artigos baseados em casos peculiares e comentários sucintos sobre a importância do caso em relação ao conhecimento atual na área. Devem conter até 1.000 palavras, com um total de, no máximo, duas tabelas ou figuras e 15 referências, já que o objetivo dos relatos não é apresentar uma revisão bibliográfica.

A sua estrutura deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, explicando a relevância do caso; Apresentação do caso (Relato do Caso) e Discussão. Os relatos de casos devem descrever achados novos ou pouco usuais, ou oferecer novas percepções sobre um problema estabelecido. O conteúdo deve

Instruções aos Autores

limitar-se a fatos pertinentes aos casos. O sigilo em relação à identificação dos pacientes é fundamental, não devendo ser relatadas datas precisas, iniciais ou qualquer outra informação não relevante ao caso, mas que eventualmente possa identificar o paciente. Os Relatos de Caso devem ter Resumo não estruturado com no máximo 150 palavras.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documentos suplementares em arquivos individuais.

Relatos de Casos: Imagens em Medicina

Seção destinada à publicação de Imagens elucidativas, não usuais e/ou de amplo interesse de situações médicas. Deve conter até 500 palavras e um total de cinco referências. Duas a três imagens (resolução mínima de 300 dpi).

Cartas

Opiniões e comentários sobre artigo publicado na Revista, sobre temas de relevância científica e/ou observações clínicas preliminares. O texto deve ser breve com, no máximo, 500 palavras. Apenas uma tabela e uma figura são permitidas e, no máximo, cinco referências. Não devem ter resumo.

Comunicações Breves

Comunicações breves são resultados preliminares de pesquisas originais ou estudos mais pontuais que contêm todas as informações relevantes para que o leitor possa avaliar os seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A estrutura é semelhante a artigos originais; no entanto, o resumo (Português, Espanhol, ou Inglês) não deve exceder 150 palavras e o texto não deve exceder 1.200 palavras. Ter no máximo duas Tabelas ou Figuras.

Suplementos

Além dos números regulares, a CBR publica o suplemento da Semana Científica do HCPA.

CONFLITOS DE INTERESSE

Conflitos de interesse surgem quando o autor tem relações pessoais ou financeiras que influenciam seu julgamento. Estas relações podem criar tendências favoráveis ou desfavoráveis a um trabalho e prejudicar a objetividade da análise. Os autores devem informar sobre possíveis conflitos de interesse na ocasião do envio do manuscrito. Cabe ao editor decidir se esta informação deve ou não ser publicada e usá-la para tomar decisões editoriais. Uma forma comum de conflito de interesse é o financiamento de trabalhos de pesquisa por terceiros, que podem ser empresas, órgãos públicos ou outros. Esta obrigação para com a entidade financiadora pode levar o pesquisador a obter resultados que a satisfaçam, tornando

Instruções aos Autores

o estudo tendencioso. Autores devem descrever a interferência do financiador em qualquer etapa do estudo, bem como a forma de financiamento e o tipo de relacionamento estabelecido entre patrocinador e autor. Os autores podem optar por informar nomes de pareceristas para os quais seu artigo não deva ser enviado, justificando-se.

PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE

Informações e imagens de pacientes que permitam sua identificação só devem ser publicadas com autorização formal e por escrito do paciente, e apenas quando necessárias ao objetivo do estudo. Para a autorização formal, o paciente deve conhecer o conteúdo do artigo e ter ciência de que este artigo poderá ser disponibilizado na internet. Em caso de dúvida sobre a possibilidade de identificação de um paciente, como fotos com tarjas sobre os olhos, deve ser obtida a autorização formal. No caso de distorção de dados para evitar identificação, autores e editores devem assegurar-se de que tais distorções não comprometam os resultados do estudo.

EXPERIÊNCIAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS

Toda matéria relacionada com pesquisa em seres humanos e pesquisa em animais deve ter aprovação prévia de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), respectivamente. Os trabalhos deverão estar de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque (vigente ou atualizada), das Resoluções CNS 466/2012 e complementares e da Lei 11.794/2008 para estudos em animais. É importante indicar o número do registro do projeto no respectivo Comitê ou Comissão de Ética, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), se aplicável.

PREPARO DO ARTIGO

O cadastro no sistema como autor e posterior acesso com login e senha são obrigatórios para submissão e verificação do estágio das submissões.

Identificação: devem constar: a) Título do artigo, claro e conciso. Não usar abreviaturas. Título reduzido para constar no cabeçalho e título no idioma inglês; b) Nome completo dos autores; c) Afiliação dos autores com a indicação da instituição e a unidade de vínculo (títulos pessoais e cargos ocupados não deverão ser indicados); d) Indicação do autor correspondente, acompanhada do endereço institucional completo; e) Trabalho apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, o local e a data da realização.

Instruções aos Autores

OS NOMES DE TODOS OS AUTORES DO MANUSCRITO DEVEM SER INDICADOS NO SISTEMA COM OS RESPECTIVOS ENDEREÇOS ELETRÔNICOS.

Resumo e Palavras-chave: os artigos devem conter o resumo em português e em inglês. Verificar a estrutura e o número máximo de palavras conforme descrito para cada tipo de artigo específico (ver anteriormente). Os resumos estruturados, exigidos apenas para os artigos originais, devem apresentar, no início de cada parágrafo, o nome das subdivisões que compõem a estrutura formal do artigo (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões). As palavras-chave, expressões que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de 3 a 10, fornecidas pelo autor, baseando-se no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme, que é uma tradução do MeSH (*Medical Subject Headings*) da *National Library of Medicine*, disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>. As palavras-chave devem ser apresentadas em português e em inglês.

Manuscrito: deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. Citações no texto e as referências citadas nas legendas das tabelas e das figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos.

As referências devem ser citadas no texto sobrescritas, conforme o exemplo: Texto¹. texto¹⁻³, texto^{4,6,9}.

Tabelas: devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e encabeçadas por um título apropriado. Devem ser citadas no texto, mas deve-se evitar a duplicação de informação. As tabelas, com seus títulos e rodapés, devem ser autoexplicativas. As abreviações devem ser especificadas como nota de rodapé sem indicação numérica. As demais notas de rodapé deverão ser feitas em algarismos arábicos e sobrescritas.

Figuras e gráficos: as ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) devem ser enviadas em arquivos separados, em formato JPG (em alta resolução – no mínimo, 300 dpi). Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e serem suficientemente claras para permitir sua reprodução e estarem no mesmo idioma do texto. Não serão aceitas fotocópias. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar a permissão, por escrito, para a sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos submetidos à publicação. As figuras devem possuir um título e legenda (se necessário). Ambos devem preceder a figura propriamente dita.

Instruções aos Autores

Abreviações: as abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. No restante do artigo, não é necessário repetir o nome por extenso.

Nome de medicamentos: deve-se usar o nome genérico.

Havendo citação de aparelhos/equipamentos: todos os aparelhos/equipamentos citados devem incluir modelo, nome do fabricante, estado e país de fabricação.

Agradecimentos: devem incluir a colaboração de pessoas, grupos ou instituições que tenham colaborado para a realização do estudo, mas cuja contribuição não justifique suas inclusões como autores; neste item devem ser incluídos também os agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico, etc. Devem vir antes das referências bibliográficas.

Conflitos de interesse: Caso haja algum conflito de interesse (ver anteriormente) o mesmo deve ser declarado. Caso não haja, colocar nesta seção: “Os autores declaram não haver conflito de interesse”

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com algarismos arábicos. A apresentação deverá estar baseada no formato denominado “*Vancouver Style*”, conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela *List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine* e disponibilizados no endereço: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências e apenas citados no texto. Caso entendam necessário, os editores podem solicitar a apresentação de trabalhos não publicados citados no manuscrito.

Exemplos de citação de referências:

Artigos de periódicos (de um até seis autores)

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

Artigos de periódicos (mais de seis autores)

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.

Instruções aos Autores

Artigos sem nome do autor

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

Livros no todo

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

Capítulos de livro

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.

Livros em que editores (organizadores) são autores

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

Teses

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

Trabalhos apresentados em congressos

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.

Artigo de periódico em formato eletrônico

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>.

Outros tipos de referência deverão seguir o documento

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

Requisitos técnicos

Arquivo word (doc ou .rtf), digitado em espaço duplo, fonte tamanho 12, margem de 2 cm de cada lado, página de título, resumo e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas e as imagens enviadas em formato jpg ou tiff com resolução mínima de 300dpi.

06 abr 2018