

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

**AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DE MALDI-TOF PARA DETERMINAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE À POLIMIXINA B EM BACILOS GRAM NEGATIVOS**

PATRICIA ORLANDI BARTH

Porto Alegre

2022

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

**AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DE MALDI-TOF PARA DETERMINAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE À POLIMIXINA B EM BACILOS GRAM NEGATIVOS**

PATRICIA ORLANDI BARTH

Orientador: Prof^o. Dr. Afonso Luís Barth

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

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Barth, Patricia Orlandi
AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DE MALDI-TOF PARA
DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À POLIMIXINA B EM
BACILOS GRAM NEGATIVOS / Patricia Orlandi Barth. --
2022.
58 f.
Orientador: Afonso Luís Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Sepse. 2. Bacilos gram-negativos. 3. MALDI-TOF.
4. Polimixina B. I. Barth, Afonso Luís, orient. II.
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2021-0296) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob número 49112821100005327. O autor recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Vindo de uma família com três tios padres, não poderia fugir do convencional e não agradecer a Deus em primeiro lugar, por todas as oportunidades que Ele colocou no meu caminho, pelas bênçãos e forças de cada dia atendidas através de minhas orações. Juntamente a Ele, minha família - meu pai Roque Barth e minha mãe Lia Fátima Orlandi Barth - que são minha base e meus pilares, que sempre apoiaram minhas escolhas e incentivaram meus estudos, pelo apoio emocional e financeiro durante toda minha caminhada e serem meu maior exemplo de família e amor, eu nada seria sem eles. E a minha irmã Priscila Orlandi Barth, que é minha inspiração de pesquisadora e profissional e que sempre me auxiliou quando precisei.

Agradeço ao amor da minha vida e meu companheiro, Lucas Vidor Camara, por todo o apoio, carinho, amor, respeito e compreensão. Por dividir a sua vida comigo e apoiar meus estudos, e por tornar meus dias mais fáceis e leves, juntamente com nossos filhotes felinos - Lupi e Mel - que fizeram de nós uma família que eu tanto amo.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Dr. Afonso Luís Barth, por acreditar no meu trabalho, me ensinar todos os dias um pouco mais de microbiologia, por todo suporte nestes dois anos de pesquisa e pelo exemplo de microbiologista, professor e pesquisador. É uma honra ter sido sua orientanda.

Aos meus colegas de laboratório - LABRESIS - pela receptividade, ensinamentos, por todo o auxílio durante a minha pesquisa, inclusive por darem seu sangue (literalmente) para que esta pesquisa pudesse ser realizada, e também pelos momentos de descontração e cafés de todos os dias, que tornaram nossa rotina mais leve.

Aos profissionais do laboratório de microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial: Dariane Pereira, Eliane Wurdig, Larissa Lutz e Valério Aquino, que me ensinaram tudo que sei de microbiologia e continuaram me auxiliando durante o mestrado.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que me recebeu como Residente de Microbiologia, e agora como mestranda, e me deu todo suporte para que minha pesquisa fosse possível.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA, ao Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Bacteriana (INPRA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

E por último, mas não menos importante, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por toda estrutura e excelência de ensino em que tive o privilégio de ser aluna de pós-graduação.

A todos, meu muito obrigada!

RESUMO

Infecções causadas por microrganismos multirresistentes tem se tornado cada vez mais comuns em ambientes hospitalares de todo o mundo. Os bacilos gram-negativos se destacam entre as bactérias multirresistentes pela produção de enzimas carbapenemases capazes de degradar os antibióticos de última geração. Como último recurso, as polimixinas foram reintroduzidas na clínica médica para o tratamento destas bactérias. No entanto, os métodos de determinação da suscetibilidade *in vitro* às polimixinas são limitados, tendo apenas a microdiluição em caldo (método trabalhoso e demorado) como padrão-ouro. Entre as infecções causadas por bactérias multirresistentes, as infecções de corrente sanguínea são as mais preocupantes pois podem levar à sepse e ao choque séptico, as quais têm alta taxa de mortalidade. Este trabalho objetivou desenvolver um método rápido de determinação da suscetibilidade às polimixinas, tanto de colônias crescidas em ágar como diretamente dos frascos positivos de hemoculturas, utilizando a tecnologia de MALDI-TOF. Para isso, foi utilizada a técnica de “microgotas direto na placa” (DOT-MGA) com algumas modificações (DOT-MGA Adaptado) para adaptar às características deste fármaco e com a utilização da placa reutilizável de MALDI-TOF. Para a padronização da técnica foram utilizados 122 isolados bacterianos recuperados de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o teste direto da colônia e 117 isolados para a avaliação direto de hemoculturas, incluindo *Enterobacterales* e Bacilos gram-negativos não-fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp). O DOT-MGA Adaptado apresentou 95% e 100% de concordância categórica entre isolados de colônias crescidas em placas de ágar e direto de hemoculturas, respectivamente. Com isso, o teste DOT-MGA Adaptado demonstrou ser uma ótima alternativa para a determinação da suscetibilidade às polimixinas em laboratórios de microbiologia que possuem o equipamento de MALDI-TOF. O método DOT-MGA Adaptado é uma técnica simples, de baixo custo de materiais de consumo e, principalmente, rápida (resultados em até 4 horas após as hemoculturas sinalizarem positivas) a qual pode fornecer resultados precoces podendo auxiliar mais efetivamente o clínico na escolha da melhor antibioticoterapia para bacilos gram-negativos multirresistentes.

Palavras-chave: MALDI-TOF, Polimixina B, bacilos gram-negativos, *Enterobacterales*, sepse.

ABSTRACT

Infections caused by multidrug-resistant microorganisms have become increasingly common in hospital environments around the world. Gram-negative bacilli stands out among multidrug-resistant bacterias for the production of carbapenemase enzymes capable of degrading the latest generation of antibiotics. As a last resort, polymyxins were reintroduced in the clinic to try to combat the advance of these bacteria, but the methods for determining the in vitro susceptibility to polymyxins still remain limited, with only broth microdilution (a laborious and time-consuming method) as the gold standard. Among infections caused by multidrug-resistant bacteria, bloodstream infections are the most worrisome: they can lead to sepsis and septic shock, which have a high mortality rate. This work aimed to develop a faster method for determining the susceptibility to polymyxins, both in colonies grown on agar and directly from positive blood culture flasks, using the technology of MALDI-TOF. For this, the technique of “direct on target microdroplet growth assay” (DOT-MGA) was used with some modifications (Adapted DOT-MGA) to adapt the technique to the characteristics of this drug and with the use of the reusable MALDI-TOF target. For the standardization of the technique, 122 bacterial isolates recovered from patients attempted at Clinical Hospital of Porto Alegre were used for the evaluation from colonies grown on agar plates and 117 isolates for the evaluation directly from blood cultures, including *Enterobacterales* and non-fermenting gram-negative bacilli (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp). The Adapted DOT-MGA achieved 95% and 100% of categorical agreement between isolates from colonies grown on agar plates and directly from blood cultures, respectively. Thus, the Adapted DOT-MGA demonstrated to be a great alternative option for the determination of susceptibility to polymyxins in microbiology laboratories that have the MALDI-TOF equipment. The Adapted DOT-MGA is a simple technique, with low cost of consumables and, mainly, fast (results within 4 hours after blood cultures flags positive) which can provide early results and can more effectively assist the clinician in choosing the best antibiotic therapy for multidrug-resistant gram-negative bacilli.

Keywords: MALDI-TOF, Polymyxin B, gram-negative bacilli, Enterobacterales, sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de pesquisa em bases de dados

Figura 2. Estrutura química da colistina (a) e da polimixina B (b).

Figura 3. Princípios da tecnologia de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF MS).

Figura 4. Mapa conceitual da resistência bacteriana em bacilos gram-negativos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN - Bacilos gram-negativos
BGNNF - Bacilos gram-negativos não-fermentadores
BRCAST - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
CDC - *Centers for Diseases Controls and Prevention*
CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*
EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
ERC - Enterobactérias resistente aos carbapenêmicos
EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
ICS - Infecção da corrente sanguínea
IMP - Imipinemases
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LPS - lipopolissacarídeo
MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly*
MBL - metalo-betalactamases
MCR – *mobile colistin resistance*
NDM - *New Delhi metallo-beta-lactamase*
OMS - Organização Mundial da Saúde
OXA - Oxacilinas
RA - Resistência aos antibióticos
SIRS - *Systemic Inflammatory Response Syndrome*
SOFA - *Sepsis-related Organ Failure Assessment*
TSAR - Teste Rápido de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UTI - Unidade de Terapia Intensiva
VIM - *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Estratégias de busca	14
2.2 Bacilos gram-negativos resistente aos carbapenêmicos	15
2.3 Polimixinas	16
<i>2.3.1 Resistência às Polimixinas</i>	18
<i>2.3.2 Determinação da Suscetibilidade à Polimixina B</i>	19
<i>2.3.2.1 Determinação da Suscetibilidade à Polimixina B - Métodos Alternativos</i>	20
2.4 Infecção de Corrente Sanguínea	21
<i>2.4.1 Diagnóstico Laboratorial de Infecção na Corrente Sanguínea</i>	22
2.5 MALDI-TOF	23
<i>2.5.1 Identificação bacteriana rápida associada ao teste rápido de sensibilidade aos antimicrobianos (TSAR)</i>	24
3. MARCO CONCEITUAL	26
4. JUSTIFICATIVA	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo Geral	28
5.2 Objetivos Específicos	28
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO CIENTÍFICO	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
PERSPECTIVAS FUTURAS	38
ANEXOS	39
Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	39
Anexo 2 - Resumos Publicados em Congressos	46
Anexo 3 – Diretriz Metodológica (STARD)	47

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antibióticos (RA) é considerada uma das principais ameaças globais na atualidade. Entre os microrganismos portadores de mecanismos de resistência destacam-se as bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos, às quais são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como prioridade número 1 para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, o que demonstra a importância mundial desse tipo de RA (OMS, 2017).

Estima-se que até 2050 a RA causará aproximadamente 300 milhões de mortes com uma perda aproximada de \$100 trilhões de dólares para a economia global (O'NEILL, 2014). Entre as infecções causadas por estes microrganismos multirresistentes, as infecções de corrente sanguínea (ICS) são uma das mais preocupantes pois podem levar à sepse e apresentam uma maior taxa de mortalidade em 30 dias, quando comparadas com ICS causadas por outras bactérias. Em um estudo realizado por Sabino e colaboradores, em 2019, foi constatado que pacientes com ICS por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) tiveram uma mortalidade em 30 dias de 63,8% enquanto que pacientes com ICS por outras bactérias a mortalidade em 30 dias foi de 33,4%.

Embora seja difícil de se estimar precisamente a incidência da sepse, um estudo recente estimou que em 2017 houve 48,9 milhões de casos e 11 milhões de mortes relacionadas à sepse em todo o mundo, o que representou quase 20% de todas as mortes globais (RUDD et al, 2020). Isso fez com que a OMS recentemente classificasse a sepse como prioridade de saúde mundial (REINHART et al., 2017).

A identificação rápida do patógeno causador da infecção é um dos fatores determinantes para a eficácia do tratamento. A administração de antibióticos nas primeiras 3 horas da constatação da sepse implica em uma mortalidade até 14% menor dos pacientes comparados com aqueles que recebem antibiótico após 3 horas (SEYMOUR et al., 2017). Entretanto, as técnicas convencionais utilizadas em laboratórios de microbiologia de rotina costumam levar até 48 horas, após a hemocultura apresentar crescimento bacteriano, para a liberação do laudo com a identificação e susceptibilidade do microrganismo (VLEK; BONTEN; BOEL, 2012).

Diferentemente dos métodos tradicionais, a metodologia baseada na técnica de espectrometria de massas denominada Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS) é uma metodologia que permite a identificação de microrganismos, a partir do crescimento colonial, em questão de minutos. A técnica de MALDI-TOF se baseia na ionização de material cristalizado em uma superfície (massa microbiana) por pulsos curtos de laser; os íons (proteínas de baixo peso molecular) são acelerados num campo magnético e migram em um tubo de vácuo. As proteínas ionizadas são detectadas na parte superior do tubo de vácuo a partir do 'tempo de voo' da proteína, o que gera um espectro que é comparado com um banco de dados, o que permite a identificação microbiana (MURRAY, 2010).

A utilização do MALDI-TOF na rotina laboratorial permitiu a identificação mais rápida dos microrganismos em comparação aos métodos convencionais e assim pode contribuir com a diminuição do tempo para intervenção terapêutica mais efetiva (HUANG et al., 2013). A utilização de MALDI-TOF para identificação de microrganismos já se tornou uma realidade na rotina de muitos laboratórios de microbiologia e só não é mais amplamente utilizada devido ao alto custo do equipamento. A metodologia de MALDI-TOF além de permitir a identificação rápida de microrganismos tem sido avaliada para outras finalidades como a detecção de mecanismos de resistência ou mesmo para a tipagem de microrganismos. Assim, devido a rapidez do MALDI-TOF, seria importante que essa técnica pudesse ser utilizada na avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos a fim de permitir que o laboratório de microbiologia possa prover não somente a identificação do microrganismo, mas também sua resposta *in vitro* aos antimicrobianos em um tempo consideravelmente mais curto do que o tempo necessário para a identificação e antibiograma por métodos convencionais (TIMBROOK et al., 2017).

Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar um método rápido de determinação da suscetibilidade ao antimicrobiano Polimixina B - antibiótico de escolha para bactérias gram-negativas resistente aos carbapenêmicos - de colônias puras crescidas em ágar e direto do frasco de hemocultura com o auxílio do sistema MALDI-TOF.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias de busca

A revisão da literatura foi realizada através de dados do PubMed/Medline, BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e Scielo, utilizando de forma combinada ou isolada as palavras chaves: “Direct on target microdroplet growth assay”, “MALDI-TOF AND antimicrobial susceptibility test” e “MALDI-TOF AND polymyxin” (Figura 1).

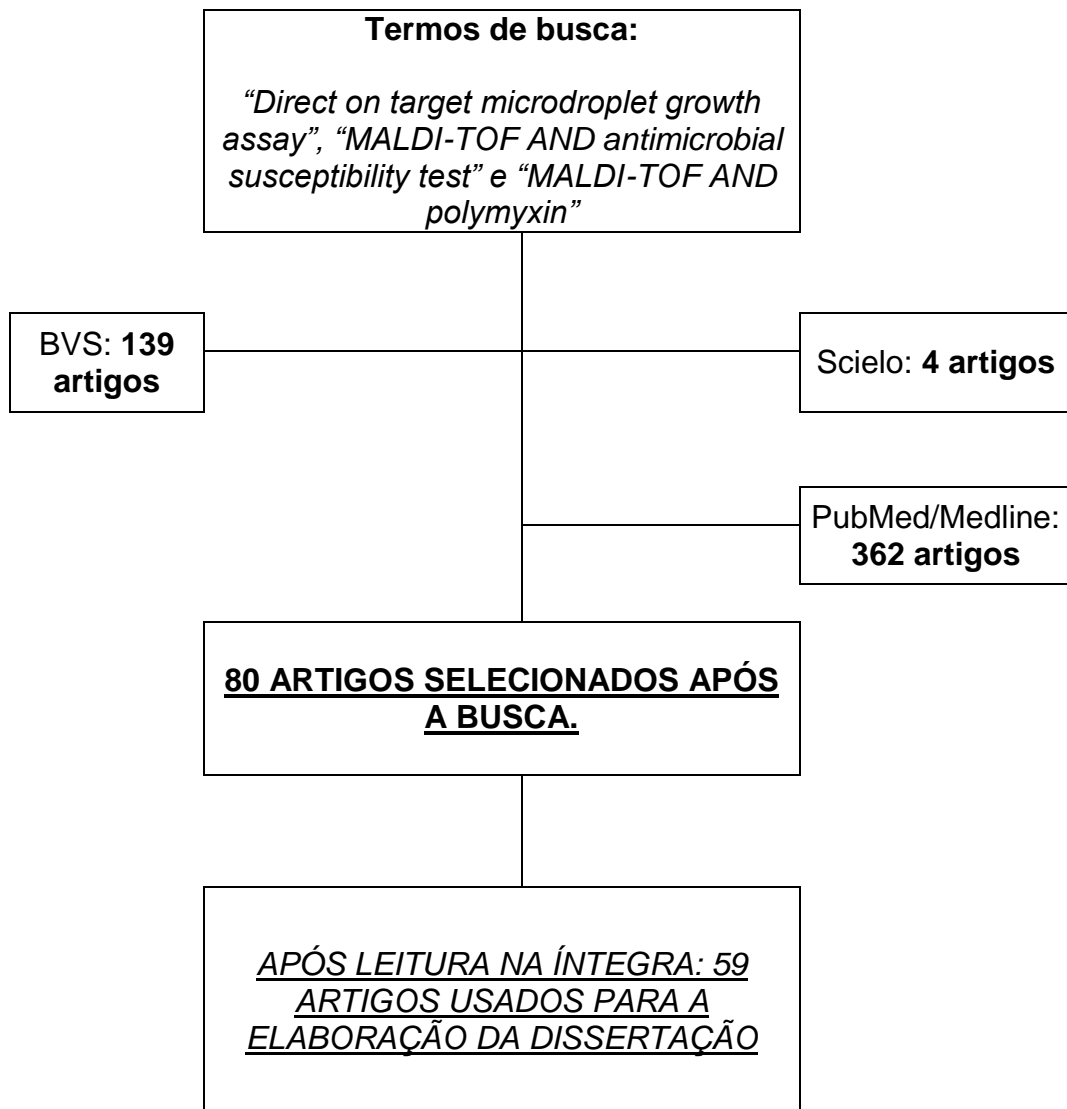


Figura 1. Fluxograma de pesquisa em bases de dados

Os artigos foram selecionados, inicialmente, com base em seus títulos e resumos e, após a leitura na íntegra dos artigos, os que correspondiam com o assunto foram utilizados. Foram selecionados 59 artigos de língua inglesa de 1995 a 2022. Outros artigos citados pelos estudos selecionados também foram incluídos para a elaboração da dissertação.

2.2 Bacilos gram-negativos resistente aos carbapenêmicos

Os principais bacilos gram-negativos (BGN) de importância clínica podem ser divididos em 2 grandes grupos: as enterobactérias e os BGN não fermentadores (BGNNF). Esses grupos de bactérias são responsáveis pela maioria das infecções hospitalares e comunitárias e por isso sua identificação é de suma importância para o direcionamento terapêutico (OPLUSTIL, 2004). Nas últimas décadas, infecções hospitalares causadas por microrganismos multirresistentes têm causado um significativo aumento da morbidade e mortalidade em pacientes, assim como um importante impacto nos custos das internações (HANSEN, 2021).

O sucessivo aumento de resistência contra antibióticos aminoglicosídeos, beta lactâmicos e fluorquinolonas fez com que restassem como tratamento de escolha os carbapenêmicos para tratar infecções causadas por BGN (TZOUVELEKIS, 2012). Contudo, o extensivo uso dos carbapenêmicos nos últimos anos fez com que surgissem cada vez mais casos de bactérias resistentes a todas essas classes de antibióticos, incluindo os carbapenêmicos, o que se tornou um problema de saúde pública em todo o mundo devido à escassez de opções para tratar essas infecções (MIRIAGOU, 2010; BASSETI, 2019).

As ERC são consideradas pelo “Centers for Diseases Controls and Prevention” (CDC) como bactérias da ordem *Enterobacterales* que apresentam resistência fenotípica a qualquer um dos carbapenêmicos, ou ainda, possuam alguma enzima codificadora de carbapenemase (VAN DUIN et al., 2020). Assim como as ERC, alguns BGNNF como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos também são considerados importantes causadores de infecções hospitalares e são considerados patógenos prioritários pela Organização Mundial de

Saúde para a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos e diagnósticos mais rápidos (OMS, 2017).

A resistência aos carbapenêmicos em BGN pode ocorrer por mutação cromossomal, mas geralmente ocorre por transferência horizontal de elementos genéticos carreadores de genes de carbapenemases. As carbapenemases podem ser divididas em dois grandes grupos: serino-carbapenemases e metalo-betalactamases (MBL). O primeiro grupo contém um grupo serina em seu sítio ativo e pode ser inativado por inibidores de beta-lactamases, já o segundo contém íon zinco no seu sítio ativo, e são inibidos por compostos quelantes como o EDTA (QUEENAN, BUSH, 2007). Conforme a definição de Ambler, as serino-carbapenemases podem ser de Classe A - sendo a mais conhecida a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); de Classe C (cefalosporinases, como AmpC) e de Classe D (oxacilinas). Já as MBL, pertencentes a Classe B de Ambler, englobam como principais enzimas a Imipinemase (IMP), a “Verona integron-encoded metallobeta-lactamase” (VIM) e a “New Delhi metallobeta-lactamase” (NDM) (BUSH e JACOBY, 2010; NORDMANN e POIREL, 2002; VAN DUIN e DOI, 2017).

Com o significativo aumento de infecções causadas por essas bactérias produtoras de carbapenemases nos últimos anos, se faz necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais rápidos para a identificação do patógeno e determinação da sensibilidade para que se possa controlar o aumento da resistência bacteriana e aumentar as chances de vida de pacientes que venham a adquirir estas infecções (DIENE; ROLAIN, 2014; PEREZ, BONOMO, 2019).

2.3 Polimixinas

As polimixinas são uma classe de antimicrobianos descoberta nos anos 1940 que são produzidas por uma bactéria gram-positiva encontrada nos solos: *Paenibacillus polymyxa* (BENEDICT; LANGLYKKE, 1947). Introduzida na clínica no final dos anos 1950, esta classe de antibióticos compreende as moléculas Polimixina B e Polimixina E (colistina). Ambas apresentam atividade similar e diferem apenas por um aminoácido na sua estrutura química (Figura 2), sendo que tiveram como o diferencial de serem muito específicas para BGN, em contraste com todos os antibióticos reportados na época (ROSS et al. 1959; VELKOV et al. 2019). Uma das

diferenças clínicas entre as duas formas de polimixinas é que a polimixina B não é indicada para uso oral, podendo ser administrada pelas vias intravenosa, intramuscular, inalatória, intratecal, ou ainda por via tópica (KWA et al., 2007). O mecanismo de ação das polimixinas se dá por meio da interação entre o polipeptídeo catiônico do antimicrobiano com os lipopolissacarídeos (LPS) aniônicos da membrana externa da bactéria, que leva a um vazamento do conteúdo celular e então à lise bacteriana (FALAGAS, KASIAKOU e SARAVOLATZ, 2005).

Após alguns anos no tratamento de doenças infecciosas, se relacionou o uso das polimixinas à uma alta incidência de nefrotoxicidade e neurotoxicidade, e com a introdução de novos antimicrobianos mais seguros e igualmente eficazes, como os beta lactâmicos, as polimixinas foram deixadas de serem utilizadas na clínica médica (KOCK-WESER et al., 1970). No entanto, com o aumento do uso dos antimicrobianos beta lactâmicos, em particular os carbapenêmicos, foi criada uma pressão seletiva que contribuiu no aparecimento de resistência aos carbapenêmicos (HAMZAOUI et al., 2018). Assim, as polimixinas foram reintroduzidas na clínica como última opção terapêutica contra ERC e BGNNF resistentes aos carbapenêmicos (OSEI, 2016).

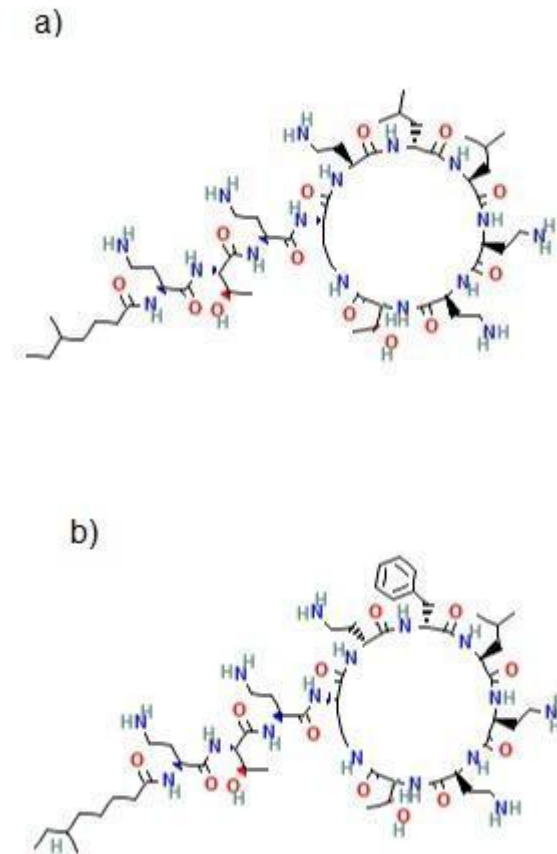


Figura 2. Estrutura química da colistina (a) e da polimixina B (b). Fonte: PubChem. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.3.1 Resistência às Polimixinas

O aumento do uso das polimixinas nos últimos anos para tratamento de infecções causadas pelas bactérias multirresistentes ocasionou o surgimento de cepas resistentes a este antibiótico. Embora muitos mecanismos de resistência já tenham sido descritos, a principal forma de resistência às polimixinas é devido à uma modificação no LPS da bactéria através da adição de um grupo 4-amino-4-desoxy-arabinose, fosfoetanolamina ou galactosamina no lipídio A, o que é causado por alterações cromossômicas nos sistemas *phoP/phoQ* e *pmrA/pmrB*. Essas alterações fazem com que as polimixinas percam a capacidade de ligação na membrana da bactéria, inativando assim a sua ação (CANNATELLI, 2017; MOFFATT, HARPER E BOYCE, 2019).

Além disto, uma disseminação mundial de um gene denominado *mcr-1* mediado por plasmídeo tem sido reportada atualmente como consequência do amplo uso das polimixinas, tanto na clínica como no ecossistema (LIU, 2020; MMATLI, 2020). Este tipo de resistência gerou um alerta global, já que a resistência devido a transmissão plasmidial tende a se disseminar de forma muito mais rápida do que a cromossomal (LIU, et al., 2016).

Estudos sugerem que a transmissão do gene *mcr-1* pode acontecer através da cadeia alimentar ou contato direto entre humanos e animais, como também através de contaminações ambientais pela água e vegetais, tendo como principal vetor o trato gastrointestinal de animais submetidos ao uso de polimixinas como promotor de crescimento na agroindústria (CHEN et al., 2017). Apesar disto, não se observou na clínica um aumento expressivo de resistência às polimixinas por este gene (LI et al., 2019). Ainda, a Polimixina apresenta uma alta taxa de sensibilidade a bacilos gram-negativos produtores de carbapenemases, podendo chegar a mais de 90% de suscetibilidade em alguns países (ZHANG et al., 2018).

2.3.2 Determinação da Suscetibilidade à Polimixina B

A determinação *in vitro* da susceptibilidade das polimixinas é influenciada por alguns fatores, principalmente pelas propriedades catiônicas deste fármaco, o que torna mais limitada as técnicas utilizadas para sua análise. Os testes de disco-difusão e de gradiente de concentração, amplamente utilizados para a determinação da suscetibilidade a antimicrobianos nos laboratórios de rotina de microbiologia, não são reproduzíveis para as polimixinas principalmente devido à baixa capacidade de difusão do antibiótico no meio ágar, sendo estas técnicas não recomendadas pelo CLSI e EUCAST (BAKTHAVATCHALAM et al. 2018).

A microdiluição em caldo, descrita na ISO 20776-1, a qual utiliza um meio de cultura com cátion ajustado para se adequar às características moleculares das polimixinas é considerada de referência para a determinação da suscetibilidade a esses antibióticos, apesar de ser um método laborioso e demorado (necessita em torno de 24 horas). Por este motivo, algumas empresas criaram kits comerciais para a realização da microdiluição da polimixina, com o antibiótico liofilizado nas placas de microtitulação, como Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific), MICRONAUT-S (Merlin

Diagnostika) e Policimbac® (Probac do Brasil) que, embora possuam uma melhor correlação com a metodologia padrão, ainda assim necessitam do mesmo tempo de incubação (24 horas), o que não auxiliaria em um exame mais rápido (MATUSCHECK et al. 2018; DALMOLIN, 2020; WANG et al., 2021).

2.3.2.1 Determinação da Suscetibilidade à Polimixina B - Métodos Alternativos

Alguns autores sugerem que sejam desenvolvidos novos métodos mais rápidos de detecção à resistência em Polimixinas. Como exemplo disso, Nordmann e Poirel desenvolveram em 2016 o 'Rapid Polymyxin NP', método colorimétrico que detecta a resistência à Polimixina através da alteração de pH e consequente mudança de coloração do meio de cultura em poucas horas. Apesar de ser um método de fácil execução e resultados rápidos, ele demonstrou não possuir bons resultados em isolados com baixo nível de resistência, como também não pode ser utilizado diretamente de colônias bacterianas crescidas em Ágar MacConkey - um dos meios de cultura mais utilizados na rotina de microbiologia para isolamento de bacilos gram-negativos. Além do mais, a necessidade de ajuste do pH do meio e a leitura visual do teste podem interferir na interpretação dos resultados (POIREL, JAYOL E NORDMANN, 2017; NETO et al., 2020).

Outros testes alternativos para a determinação da suscetibilidade às Polimixinas são os testes automatizados. Equipamentos como Vitek 2 System (bioMérieux®) e Phoenix (BD Diagnostics®) fazem a incubação das bactérias em contato com diferentes concentrações do antibiótico e realizam a leitura de acordo com o crescimento bacteriano nas concentrações definidas. Apesar de serem mais simples de realizar e liberarem o resultado de forma mais rápida (4 - 16 horas), estes testes possuem um alto custo e uma baixa capacidade de detecção de isolados resistentes, não sendo indicados para uso pelos manuais CLSI e EUCAST (TAN, NG, 2017; POIREL, JAYOL E NORDMANN, 2017).

Existem também meios seletivos que podem ser utilizados como testes de triagem para detecção de isolados resistentes às polimixinas: Superpolymyxin®, ChromID® Colistin R e CHROMagar™ COL-APSE. Esses meios de cultura possuem colistina na sua composição, favorecendo o crescimento de microrganismos resistentes a este antibiótico e inibindo o crescimento de isolados sensíveis. Estes

meios seletivos podem ser úteis na triagem de isolados resistentes, porém, não informam a real suscetibilidade da bactéria às polimixinas, e requerem um tempo de incubação também de 24 horas (LESHABA, MBELLE, SEKYERE, 2022).

2.4 Infecção de Corrente Sanguínea

A corrente sanguínea é estéril, porém pode ser invadida por bactérias (bacteremia) sendo que normalmente o próprio corpo humano se encarrega de destruí-las sem provocar qualquer manifestação clínica ao indivíduo. A presença de bactérias na corrente sanguínea pode, no entanto, levar a uma intensa resposta imune do hospedeiro, gerando o processo de sepse. De acordo com o terceiro consenso internacional de definições para sepse e choque séptico, sepse deve ser definida como disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (SINGER et al., 2016).

Na sepse, o organismo produz mediadores inflamatórios que produzem febre ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia e o aumento ou diminuição de células sanguíneas, sendo fatores importantes para a determinação da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica - ou do inglês, "Systemic Inflammatory Response Syndrome" (SIRS) de acordo com o "American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine" (1992). A SIRS, desde 1992, foi considerada um importante parâmetro para detectar a sepse em pacientes antes das hemoculturas se tornarem positivas, porém, seu critério ainda era limitado (KAUKONEN et al., 2015), o que fez com que surgisse um novo consenso para definir o estágio de sepse em um paciente: Sepsis 3.

A nova definição de sepse foi estabelecida seguindo o critério de Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos Relacionados à Sepse (SOFA) o qual utiliza um somatório de pontos para determinar o quadro de sepse, e leva em consideração a pressão sanguínea, plaquetas, bilirrubina, catecolaminas e escala de Glasgow (SINGER, 2016).

Os principais indivíduos afetados pela sepse bacteriana são pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), atingindo cerca de 30% desses pacientes em todo o mundo. Além dos riscos de vida que afetam pacientes com sepse, esse processo infeccioso pode deixar sequelas irreparáveis nos indivíduos. Um estudo realizado por Iwashyna e colaboradores em 2012 mostrou uma relação em

pacientes idosos que sobreviveram à sepse com novos comprometimentos cognitivos que ocasionaram a perda de independência para a realização de suas funções diárias.

Os critérios clínicos para suspeitar de sepse e iniciar um tratamento rápido são imprescindíveis para aumentar as chances de vida do paciente. No entanto, os resultados de exames laboratoriais também apresentam um papel muito importante no diagnóstico e tratamento da sepse pois fornecem a identificação do patógeno bem como sua suscetibilidade *in vitro* aos antibióticos.

2.4.1 Diagnóstico Laboratorial de Infecção na Corrente Sanguínea

A detecção do agente etiológico em pacientes com suspeita de sepse é feita através do exame bacteriológico do sangue (hemocultura). Para a hemocultura, deve-se coletar pelo menos 40 ml de sangue, se paciente adulto, e inocular em frascos com meio de cultura líquido, os quais devem ser incubados à 37°C para avaliação de crescimento bacteriano (OPLUSTIL, 2020). Atualmente, a maioria dos laboratórios de microbiologia utilizam equipamentos automatizados (BacT/ALERT® 3D - BioMérieux; ou BACTEC® - BD Diagnostic Systems) para processamento das hemoculturas. Esses equipamentos detectam a presença de bactérias através da liberação de CO₂ produzido durante o processo de crescimento bacteriano nos frascos (JORGENSEN et al., 1997).

Depois que as hemoculturas apresentam crescimento bacteriano, a identificação dos microrganismos é feita tradicionalmente através de métodos bioquímicos convencionais, os quais são dependentes do crescimento dos microrganismos em meios específicos para sua identificação, o que leva em torno de 24 horas (OPLUSTIL, 2020). Técnicas moleculares têm sido aplicadas para acelerar a identificação dos microrganismos de hemoculturas positivas, como hibridização *in situ* e tecnologia microarray. Entretanto, essas técnicas são limitadas pelo número de patógenos que conseguem detectar, e apresentam um custo muito elevado para uma rotina laboratorial (MULDREW, K.L., 2009).

Métodos automatizados para a identificação bacteriana têm ganhado espaço nos laboratórios por fornecerem um resultado mais preciso em menos tempo. Entre as principais tecnologias automatizadas no Brasil, destaca-se o Vitek-2, Microscan e

Phoenix, equipamentos que realizam a identificação bacteriana, bem como o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos a partir da colônia crescida em meio de cultura sólido e liberam o resultado em algumas horas (JIN et al. 2006). Estes métodos, embora sejam de utilização frequente nos laboratórios de microbiologia, além de necessitarem de um tempo não tão curto para a liberação do resultado, necessitam de insumos comerciais (painéis) considerados bastante caros para a execução do teste, e não possuem um banco de dados tão robusto quanto novos equipamentos já desenvolvidos (MALDONADO, ROBLEDO, 2017).

2.5 MALDI-TOF

Entre os métodos automatizados de identificação bacteriana mais atuais destaca-se o MALDI-TOF. Diferentemente dos métodos tradicionais que utilizam a avaliação de provas bioquímicas (sejam eles manuais ou automatizados), a metodologia de MALDI-TOF é uma metodologia que permite a identificação de microrganismos, a partir do crescimento colonial, em questão de minutos. A técnica de MALDI-TOF se baseia na ionização, por pulsos curtos de laser, de material (massa microbiana) cristalizado em uma superfície; os íons (proteínas de baixo peso molecular) são acelerados num campo magnético e migram em um tubo de vácuo. As proteínas ionizadas são detectadas na parte superior do tubo de vácuo e a partir do tempo de voo e da massa da proteína é gerado um espectro proteico que é comparado com um banco de dados, o que, em última instância, permite a identificação microbiana (Figura 3) (MURRAY, 2010; SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2017.)

Apesar do custo inicial alto para a aquisição do equipamento de MALDI-TOF, essa técnica permite reduzir significativamente os custos com reagentes utilizados pelos métodos tradicionais de identificação bacteriana. Aliado à facilidade da técnica, rapidez para a liberação dos resultados e alta reprodutibilidade dos testes, o MALDI-TOF representa uma tecnologia inovadora e avançada que já está substituindo os métodos tradicionais em muitos laboratórios de rotina ao redor do mundo (TRAN, 2015; JANG, 2018).

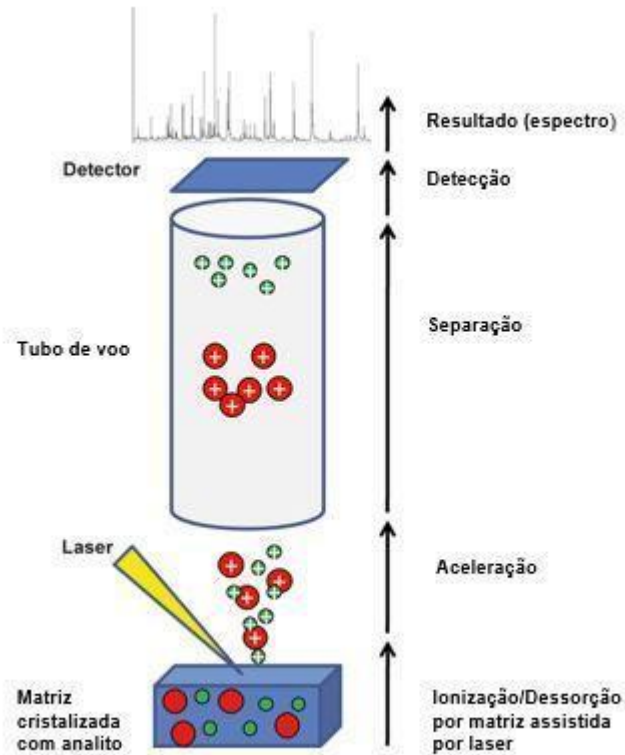


Figura 3. Princípios da tecnologia de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF MS). Adaptado de Croxatto, Prod'hom e Greub, 2011.

2.5.1 Identificação bacteriana rápida associada ao teste rápido de sensibilidade aos antimicrobianos (TSAR)

As técnicas de identificação rápida de bactérias diretamente de frascos de hemoculturas reduzem o tempo de liberação do exame em média em 24 horas, o que já permitiria guiar a terapia antimicrobiana conforme o tipo de bactéria identificada (LAGACE-WIENS et al, 2012). A identificação rápida de microrganismos é uma alternativa importante para auxiliar no diagnóstico e otimizar o tratamento de pacientes com sepse. Entretanto, somente a identificação bacteriana rápida sem o teste de sensibilidade rápido pode não ser tão impactante para otimizar o tratamento do paciente com sepse (BEGANOVIC et al, 2019). De fato, Timbrook e colaboradores em 2017 avaliaram o impacto da identificação bacteriana rápida com e sem o TSAR e chegaram à conclusão de que o risco de mortalidade reduziu significativamente quando a identificação rápida era acompanhada de TSAR. Além disso, o tempo de

permanência hospitalar também foi avaliado e demonstrou ser reduzido quando a identificação e o teste de sensibilidade são rápidos.

O MALDI-TOF já foi bem validado quanto à sua performance na identificação de microrganismos, e tem seu uso aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, bem como por diversos outros órgãos de vigilância no mundo. O que se espera no futuro é poder validar outros métodos alternativos utilizando o MALDI-TOF, como a determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos, para que possam ser usados além da pesquisa, mas também nos laboratórios de rotina em todo o mundo (FLORIO et al., 2020, ANVISA, 2022).

3. MARCO CONCEITUAL

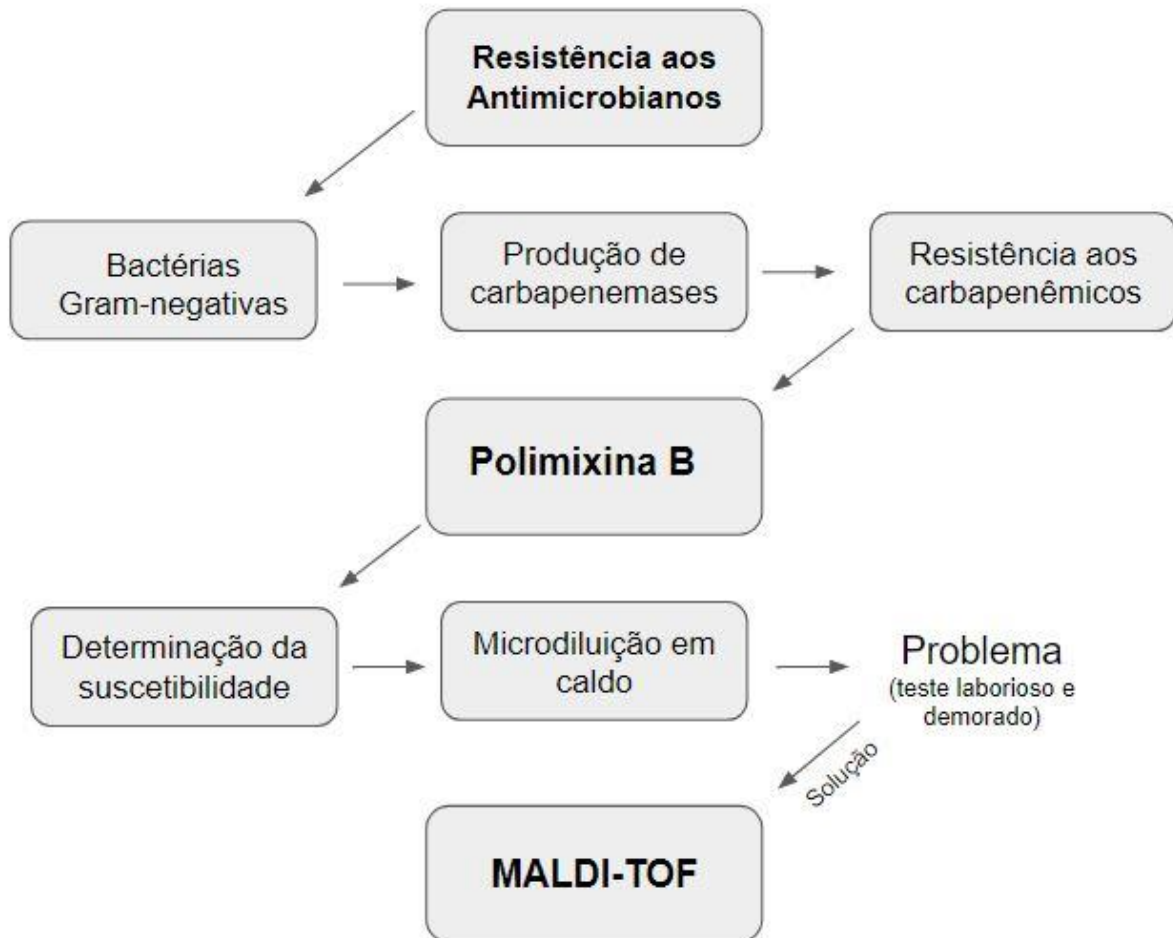


Figura 4. Mapa conceitual da resistência bacteriana em bacilos gram-negativos

4. JUSTIFICATIVA

A diminuição do tempo para liberação dos resultados da rotina de microbiologia (identificação do microrganismo e teste de sensibilidade aos antimicrobianos) é essencial para otimização do diagnóstico e tratamento dos pacientes, especialmente aqueles com infecções por BGN produtores de carbapenemases. O aumento global das infecções por ERC e não-fermentadores resistentes aos carbapenêmicos é alarmante e representa uma ameaça crescente à prestação de cuidados de saúde e à segurança do paciente. Para estas infecções, uma das últimas e mais usadas opções de tratamento é a Polimixina B, que também teve seu uso aumentado, o que, conseqüentemente, levou ao surgimento de resistência a este antibiótico nos últimos anos.

Atualmente, o método de identificação de bactérias e o resultado do TSA tradicionais requerem em média 48 horas. Ainda, para a determinação da suscetibilidade à Polimixina B, a técnica de microdiluição em caldo embora seja o método padrão, é bastante laboriosa e demorada.

Assim, se faz necessário o desenvolvimento de métodos rápidos que permitam realizar a identificação bacteriana e determinar seu perfil de sensibilidade o mais breve possível. Em pacientes com ICS, o risco torna-se ainda mais elevado e, por isso, é importante o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que possam ser realizados diretamente dos frascos de hemoculturas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a tecnologia de MALDI-TOF como método rápido de teste de suscetibilidade de Polimixina B para bacilos gram negativos.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho do MALDI-TOF para a determinação da suscetibilidade à Polimixina B em *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos em colônias crescidas em ágar.
- Avaliar o desempenho do MALDI-TOF para a determinação da suscetibilidade à Polimixina B em bacilos gram-negativos não-fermentadores resistentes aos carbapenêmicos em colônias crescidas em ágar.
- Determinar o perfil de suscetibilidade de bacilos gram-negativos frente à Polimixina B diretamente dos frascos de hemoculturas e comparar com o método padrão.

REFERÊNCIAS

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 20, n; 6, p. 864-874, 1992.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351208701201873/>>. Acesso em 06 de outubro de 2022.

BAKTHAVATCHALAM, Y.D. et al. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v. 12, p. 124-136, 2018.

BASSETTI, M. et al. Treatment of infections due to MDR Gram-Negative bacteria. **Frontiers in medicine**. v. 6, n. 74, 2019.

BEGANOVIC, M. et al. Interplay between rapid diagnostic tests and antimicrobial stewardship programs among patients with bloodstream and other severe infectious. **Journal of Applied Laboratory Medicine**. v. 3, n. 4, p. 601 - 616, 2019.

BENEDICT, R. G.; LANGLYKKE, A. F. Antibiotic activity of Bacillus polymyxa. **Journal of bacteriology**, v. 54, n.24, 1947.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, BrCast. Tabela de pontos de corte clínicos. Disponível em: <<http://brcast.org.br/>>. Acesso em 25 de maio de 2021.

BUSH, K; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CANNATELLI, A. et al. An allelic variant of the PmrB sensor kinase responsible for colistin resistance in an Escherichia coli strain of clinical origin. **Scientific Reports**. v. 7, n. 5071, 2017.

CHEN, K. et al. Widespread distribution of mcr-1-bearing bacteria in the ecosystem, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**. v.22, n. 39, p.17-00206, 2017.

CROXATTO, A., PROD'HOM, G. GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 36, n. 2, p. 380 - 407, 2011.

DALMOLIN, T.V. et al. Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 51, n. 3, p. 1135–1137, 2020.

- DIENE, S.M., ROLAIN, J.M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, p. 831–838, 2014.
- FALAGAS, M.E., KASIAKOU, S.K., SARAVOLATZ, L.D. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**. v. 40, p. 1333-1341, 2005.
- FLORIO, W. et al. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, p. 572909, 2020.
- HAMZAOU, Z. et al. An outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, associated with OmpK35 and OmpK36 porin loss in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**. v. 24, p. 1137–1147, 2018.
- HANSEN, G.T. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative. **Infectious Diseases Therapy**. v. 10, p. 75 - 92, 2021.
- HUANG, A. M. et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. **Clinical Infectious Diseases**. v. 57, n. 9, p.1237-1245, 2013.
- IDELEVICH, E.A. et al. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, p. 738 - 743, 2018.
- IWASHYNA, T.J. et al. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. **Journal of the American Geriatrics Society**. v. 60, n. 6, p. 1070-1077, 2012.
- ISO 20776-1. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization, 2006.
- JANG, K.S, KIM, Y.H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**. v. 56, n. 4, p. 209-216, 2018.
- JIN, W.Y. et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 70, p. 442 - 447, 2006.
- JORGENSEN, J.H. et al. Controlled clinical laboratory comparison of BACTEC plus aerobic/F resin medium with BacT/Alert aerobic FAN medium for detection of

bacteremia and fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.1, p.53-58, 1997.

KAUKONEN, K.M. et al. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. **The New England Journal of Medicine**. v. 372, n. 17, p. 1629–1638, 2015.

KOCH-WESER et al. Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. **Annal of Internal Medicine**. v. 72, p. 857–868, 1970.

KWA, A. et al. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 5, n. 5, p. 811–821, 2007.

LAGACE-WIENS, P.R.S. et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 10, p. 3324 - 3328, 2012.

LESHABA, T.M., MBELLE, N.M., SEKYERE, J.O. Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: A systematic review of established and novel detection methods. **Journal of Applied Microbiology**. v. 132, p. 8 - 30, 2021.

LI, Z. et al. Emergent Polymyxin Resistance: End of na Era? **Open Forum Infectious Diseases**. v. 6, n. 10, p. ofz368, 2019.

LIU, F. et al. Occurrence and molecular characteristics of mcr-1-positive *Escherichia coli* from healthy meat ducks in Shandong Province of China. **Animals (Basel)**. v. 10, p. 1299, 2020.

LIU, Y. 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**. v. 16, n. 2, p.161-168, 2016.

MALDONADO, L.S.O., ROBLEDO, C.L., ROBLEDO, J.A. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. **Infectio**. v. 22, n. 1, p. 35-45, 2018.

MATUSCHECK, E. et al. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, p. 865-870, 2018.

MIRIAGOU, V. et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n. 2, p. 112-22, 2010.

MMATLI, M. et al. Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review of current reports. **mSystems**. v. 5, p. e00783-20, 2020.

MOFFATT, J.H., HARPER, M., BOYCE, J.D. Mechanisms of Polymyxin Resistance. Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. Advances in Experimental Medicine and Biology. **Springer**. v. 1145, 2019, P. 55-72, 2019.

MULDREW K.L. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Current Opinion in Pediatrics**. v. 21, n. 1, p. 102-111, 2009.

MURRAY, P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, p. 1626–1630, 2010.

NETO, O.C.C. Difficulty in detecting low levels of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates: evaluation of Rapid Polymyxin NP test, Colispot Test and SuperPolymyxin medium. **New Microbes and New Infections**. v. 36, p. 100722, 2020.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negatives aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid detection of Polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 22, n. 6, p. 1038-1043, 2016.

O'NELL, J. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Future Health and Wealth of Nations, 2014. Disponível em <<http://amr-review.org/>> Acesso em 16 setembro de 2021.

OPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. São Paulo: Sarvier, 2004.

OPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica - 4ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2020.

Organização Mundial da Saúde. Sepsis, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>>. Acesso em 16 setembro de 2021.

Organização Mundial da Saúde. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>>. Acesso em 26 de março de 2020.

Organização Mundial da Saúde. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis, 2017. Disponível em:

<https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1>. Acesso em 25 de maio de 2021.

OSEI, S.J. et al. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. **Journal of Applied Microbiology**. v.121, p. 601–617, 2016.

PEREZ, F., BONOMO, R.A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: global action required. **The Lancet Infectious Disease**. v. 9, n. 6, p. 561-562, 2019.

PROBAC. Policimbac®. Disponível em: <http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/Policimbac%20-%20Rev%2000.pdf>. Acesso em: 03 de outubro de 2022.

POIREL, L.; JAYOL, A; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

QUEENAN, A.M., BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Review**. v. 20, p. 440-458, 2007.

REINHART, K. et al. Recognizing sepsis as a global health priority - a WHO resolution. **The New England Journal of Medicine**. v. 377, p. 414-417, 2017.

ROSS, S., PUIG, J.R., ZAREMBA, E.A. Colistin: some preliminary laboratory and clinical observations in specific gastroenteritis in infants and children. **Antibiotics Annual**. v. 7, .p. 89–100, 1959.

RUDD, K.E et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**. v. 395, p. 200-11, 2020.

SABINO, S. et al. A Cohort Study of the Impact of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections on Mortality of Patients Presenting with Sepsis. **mSphere**. v. 10, n. 4, p. e00052-19, 2019.

SCHUBERT, S.; KOSTRZEWA, M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 23, p. 17-20, 2017.

SENG, P. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical of Infectious Disease**. v. 49, n. 4, p. 543-551, 2009.

SEYMOUR, C.W. et al. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. **The New England Journal of Medicine**. v. 376, p. 2235–2244, 2017.

SINGER M. et al. The third international consensus definitions for Sepsis and septic shock (Sepsis-3). **JAMA** 315. v. 8, p. 801–810, 2016.

TIMBROOK, T.T. et al. The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Disease**. v. 64, n. 1, p. 15 - 23, 2017.

TAN, Y.G., NG, S.Y. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 13, n. 5, p. 541 - 544, 2007.

TRAN, A. et al. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 53, n. 8, p. 2473-2479, 2015.

TZOUVELEKIS; L.S., et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n.4, p. 682-707, 2012.

VAN DUIN, D. et al. Molecular and Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in the United States: a Prospective Cohort Study. **Lancet Infectious Diseases**. v. 20, n. 6, p. 731-741, 2020.

VAN DUIN, D., DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Virulence**. v. 19, n. 8 p. 460-469, 2017.

VELKOV, T. et al. History, Chemistry and Antibacterial Spectrum. *In*: LI, J., NATION, R., KAYE, K. (eds) Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **Springer**. v. 1145, p. 15-36, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_3. Acesso em: 11 de novembro de 2021.

VLEK, A.L.M, BONTEN, M.J.M, BOEL, C.H.E. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. **PLoS ONE**. v. 7, p. e32589, 2012.

WANG, Y. et al. Performance of different methods for testing polymyxin B: comparison of broth microdilution, agar dilution and MIC test strip in mcr-1 positive and negative *Escherichia coli*. **Letter in Applied Microbiology**. v. 73, n. 2, p. 197-205, 2021.

ZHANG, Y. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Reports from the China CRE Network. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**. V. 25, n. 62, p. e01882-17. 2018.

ARTIGO CIENTÍFICO

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço da disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases e com a escassez de opções terapêuticas contra estas bactérias, a Polimixina B ainda é uma opção importante no manejo de pacientes que adquirem estas infecções. Com a dificuldade na realização de métodos práticos para determinação da suscetibilidade às polimixinas, novos métodos mais rápidos e simples deverão ser desenvolvidos para serem utilizados como alternativas à microdiluição em caldo (método padrão).

Neste estudo foi possível padronizar um novo método para a determinação da suscetibilidade à Polimixina B, utilizando o mesmo meio de cultura do método padrão-ouro e a mesma concentração de antibiótico como ponto de corte, diminuindo o tempo de realização do teste em pelo menos 20 horas. Os resultados deste estudo demonstraram uma excelente correlação entre o novo método (DOT-MGA Adaptado) e o método padrão, tanto para colônias obtidas de meio sólido bem como para colônias em frascos positivos de hemoculturas. É importante ressaltar que para a determinação da suscetibilidade às polimixinas pela microdiluição em caldo, somente é possível através de colônias crescidas em meio sólido, o que acarreta em demora de liberação do resultado do exame em pelo menos mais um dia.

O método de DOT-MGA original testou apenas a Polimixina E (colistina), e não obteve resultados satisfatórios para isolados bacterianos resistentes, inviabilizando o uso deste método para tal antibiótico (IDELEVICH et al., 2021). Com os ajustes realizados neste trabalho (alteração na concentração de bactérias e da diluição do meio, além da adição de ácido fórmico), foi possível chegar a um protocolo mais prático. Diferentemente do trabalho original em que se utilizou placas hidrofóbicas (não reutilizáveis) de MALDI-TOF, todos os testes foram realizados com placas de metal reutilizáveis, diminuindo os custos. Outro ponto importante a ressaltar, foi a utilização do software MBT Compass (o mesmo utilizado para a identificação de bactérias) em contraste com o método original em que foi necessário ser criado um outro software para a análise dos resultados.

Com isso, este novo método (DOT-MGA Adaptado) para a determinação da suscetibilidade à Polimixina B tem um grande potencial como método de triagem para detecção mais rápida de resistência às polimixinas, podendo ser utilizado em qualquer laboratório que possua o equipamento de MALDI-TOF, com os próprios insumos do

mesmo. A informação da suscetibilidade à Polimixina B pelo método DOT-MGA Adaptado pode ser liberada de forma muito mais rápida, em pelo menos um dia antes do resultado da microdiluição em caldo, e isso deverá auxiliar de forma muito significativa o tratamento de pacientes com infecção na corrente sanguínea.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Levando em consideração as técnicas disponíveis para a determinação da suscetibilidade à Polimixina B, a técnica de DOT-MGA Adaptada mostrou ser uma das melhores opções para laboratórios que possuem o equipamento de MALDI-TOF. Além de ser uma técnica relativamente simples de ser executada, não necessita de insumos adicionais aos que já se utiliza para a identificação microbiana, e se consegue acessar ao resultado final em um tempo relativamente mais curto do que outras metodologias, inclusive a metodologia padrão de microdiluição em caldo.

Assim como o MALDI-TOF foi liberado pela ANVISA para uso na rotina laboratorial no âmbito da identificação bacteriana, se espera que este equipamento, que possui uma variedade tão grande de opções de uso, possa também ser certificado para a determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos com o auxílio deste trabalho.

ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da tecnologia de MALDI-TOF para determinação da concentração inibitória mínima de Polimixina B direto de hemoculturas.

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49112821.1.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.929.039

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1759134.pdf de 05/07/2021.

Trate-se de um Projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina/Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UFRGS. Os principais indivíduos afetados pela sepse são pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), atingindo cerca de 30% desses pacientes em todo o mundo. Além dos riscos de vida que afetam pacientes com sepse, esse processo infeccioso pode deixar sequelas irreparáveis nos indivíduos. Os critérios clínicos para suspeitar de sepse e iniciar um tratamento rápido são imprescindíveis para aumentar as chances de vida do paciente. No entanto, os resultados de exames laboratoriais também apresentam um papel muito importante no diagnóstico e tratamento da sepse pois fornecem a identificação do patógeno bem como sua suscetibilidade *in vitro* aos antibióticos. Nas últimas décadas, infecções hospitalares causadas por microrganismos multirresistentes têm causado um significativo aumento da morbidade e mortalidade em pacientes, assim como um importante impacto nos custos das internações. Com o constante uso dos antimicrobianos betalactâmicos, incluindo os

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.929.039

carbapenêmicos, se criou uma pressão seletiva que resultou no aparecimento de resistência aos carbapenêmicos e esse crescente aumento fez com que as polimixinas fossem reintroduzidas na clínica como última opção terapêutica contra bactérias resistentes. Hoje em dia, muitos casos de resistência a Polimixina B já tem sido reportados, sendo necessário fazer o teste de sensibilidade a polimixina B o quanto antes para auxiliar no tratamento de pacientes com infecções sanguíneas por bactérias multirresistentes. A identificação rápida do patógeno causador da infecção é um dos fatores determinantes para a eficácia do tratamento. A administração de antibióticos nas primeiras 3 horas da constatação da sepse implica em uma mortalidade até 14% menor dos pacientes comparados com aqueles que recebem antibiótico após 3 horas (SEYMOUR et al., 2017). Entretanto, as técnicas convencionais utilizadas em laboratórios de microbiologia de rotina costumam levar até 48 horas, após a hemocultura apresentar crescimento bacteriano, para a liberação do laudo com a identificação e susceptibilidade do microrganismo (VLEK; BONTEN; BOEL, 2012). Diferentemente dos métodos tradicionais, a metodologia baseada na técnica de espectrometria de massas denominada Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS) é uma metodologia que permite a identificação de microrganismos, a partir do crescimento colonial, em questão de minutos. A técnica de MALDI-TOF se baseia na ionização de material (massa microbiana) cristalizado em uma superfície por pulsos curtos de laser; os íons (proteínas de baixo peso molecular) são acelerados num campo magnético e migram num tubo de vácuo. As proteínas são detectadas na parte superior do tubo de vácuo e a partir do tempo de voo a massa exata da proteína pode ser calculada gerando um espectro proteico que é comparado com um banco de dados o que permite a identificação microbiana (MURRAY, 2010). A utilização do MALDI-TOF na rotina laboratorial permitiu a identificação mais rápida dos microrganismos em comparação aos métodos convencionais e assim pode contribuir com a diminuição do tempo para intervenção terapêutica mais efetiva (HUANG et al., 2013). A utilização de MALDI-TOF para identificação de microrganismos já se tornou uma realidade na rotina de muitos laboratórios de rotina de microbiologia e só não é mais amplamente utilizada devido ao alto custo do equipamento. A metodologia de MALDI-TOF além de permitir a identificação rápida de microrganismos tem sido avaliada para outras finalidades como a detecção de mecanismos de resistência ou mesmo para a tipagem de microrganismos. Assim, devido a rapidez do MALDI-TOF, seria importante que essa técnica pudesse ser utilizada na avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos a fim de permitir que o laboratório de microbiologia

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.929.039

possa prover não somente a identificação do microrganismo mas também sua resposta in vitro aos antimicrobianos em um tempo considerável mais curto do que o tempo necessário para a identificação e antibiograma por métodos convencionais (TIMBROOK et al., 2017). Neste sentido, este trabalho objetivou desenvolver um método rápido de determinação da sensibilidade ao antimicrobiano Polimixina B direto do frasco de hemocultura com o auxílio do sistema MALDI-TOF.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a tecnologia de MALDI-TOF como método rápido de teste de sensibilidade de Polimixina B para bacilos Gram Negativos obtidos diretamente de hemoculturas.

Objetivos Secundários:

Avaliar o desempenho do MALDI-TOF para a determinação da concentração inibitória mínima de Polimixina B.

Determinar o perfil de sensibilidade de bacilos Gram Negativos à Polimixina B diretamente dos frascos de hemoculturas e comparar com o método padrão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As amostras de enterobactérias em hemoculturas incluídas neste estudo serão obtidas a partir de materiais clínicos encaminhados para cultura de rotina na Unidade de Microbiologia, ou seja, os exames microbiológicos serão executados independentemente da realização deste estudo. Em nenhum momento será solicitado aos pacientes algum exame extra aos que usualmente já são solicitados de rotina. Portanto, não será feito nenhum contato direto com pacientes. Este projeto envolve riscos biológicos mínimos, pois o estudo envolverá o uso de amostras biológicas no laboratório de microbiologia, não havendo a participação direta de pacientes.

Benefícios:

Atualmente, o método de identificação de bactérias e o resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos tradicionais requerem em média 48 horas. Devido à gravidade das infecções de corrente sanguínea, se faz necessário o desenvolvimento de métodos rápidos que permitam realizar a identificação bacteriana e determinar seu perfil de sensibilidade o mais breve possível – idealmente ainda no primeiro dia de positividade do frasco de hemocultura, como propõe nosso

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.929.039

estudo. Assim, o paciente poderá receber o tratamento correto mais rápido e aumentar suas chances de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B – método rápido: Um inóculo bacteriano equivalente a 0,5 da escala de Macfarland será preparado a partir do pellet obtido pela técnica de identificação rápida. O inóculo será diluído em salina em 1:100, e 3 µL desta suspensão será adicionado em um spot da lâmina do MALDI-TOF (MBT Biotarget 96; Bruker Daltonics), e em cada spot será acrescido 3 µL de caldo Muller Hinton cátion ajustado contendo polimixina B, em diferentes concentrações, sendo cada spot uma concentração. A lâmina será incubada a 35°C por 4 horas em uma câmara úmida, e então o caldo com polimixina B será removido com o auxílio de um papel-filtro colocado em cima das microgotas. Após isso, deverá se esperar que eventuais microgotas sequem totalmente. Será adicionada a matriz CHCA, e a lâmina será inserida no equipamento MALDI-TOF. A interpretação como sensível ou resistente será baseada no padrão do Software MALDI Biotyper 3.1, de acordo com estudos prévios (IDELEVICH et al, 2018), da seguinte forma: quando a espécie bacteriana for identificada com um score 1,7, a cepa será considerada sensível àquela concentração de antibiótico. Quando a espécie bacteriana não for identificada satisfatoriamente pelo equipamento (score < 1,7), a cepa será considerada resistente à concentração de antibiótico analisada.

Metodologia de Análise de Dados:

Para o cálculo amostral, foi utilizado o Software PSS Health: Power and Sample Size for Health Researchers, versão online. Para um resultado com 91% de sensibilidade, 99% de especificidade e um nível de confiança de 95% chegou-se ao número de 290 amostras. Como outros trabalhos neste sentido utilizaram um número amostral significativamente menor, e devido aos custos das análises, iremos realizar primeiramente um projeto piloto com um número de 50 amostras, e após verificaremos a necessidade de um novo cálculo amostral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios estão adequados.

Solicita dispensa de TCLE.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.929.039

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer N° 4.871.951 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 03/08/2021. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão adicionada em 03/08/2021 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- Este projeto está aprovado para revisão de registros e material de 50 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- O projeto está cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa (20210296) para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- Deverão ser adicionados relatórios semestrais e um relatório final do projeto no cadastro do mesmo, no Sistema AGHUse Pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1759134.pdf	03/08/2021 15:13:49		Aceito
Outros	termoLGPD.pdf	03/08/2021 15:13:25	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Outros	respostaspendenciascep.docx	03/08/2021 15:11:47	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOMESTRADOPLATAFORMA.docx	03/08/2021 15:10:19	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.929.039

Outros	FR_assinada_HCPA_20210296.pdf	07/07/2021 11:27:44	Milene Gladzik Rangel	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoProjetoPatricia.pdf	19/06/2021 14:09:04	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 25 de Agosto de 2021

Assinado por:
Têmis Maria Félix
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Anexo 2 - Resumos Publicados em Congressos

BARTH, P.O., MOREIRA, N.K., VOLPATO, F.C.Z., WINK, P.L., ECHEVARRIA, A.Y., BARTH, A.L. Rapid polymyxin B susceptibility testing directly from positive blood cultures using the MALDI-TOF system. 8º Simpósio Brasileiro em Microbiologia (SIMC), São Paulo, 2022.

BARTH, P.O., VOLPATO, F.C.Z., WINK, P.L., ECHEVARRIA, A.Y., BARTH, A.L. MALDI-TOF for rapid antimicrobial susceptibility testing: a new alternative for broth microdilution. 42º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 2022.

Texto em Jornais de Notícias/Revistas:

BARTH, P.O. Resistência a antibióticos e a necessidade de métodos rápidos de detecção de bactérias. Jornal da Universidade - UFRGS, 15 set. 2022.

Prêmios:

BARTH, P.O., VOLPATO, F.C.Z. ,BARTH, A.L. New susceptibility test to Polymyxin B for non-fermenters directly from positive blood cultures. Melhor trabalho (1º lugar) no 18º Congresso Gaúcho de Análises Clínicas (CONGRELAB), Porto Alegre, 2022.

Anexo 3 – Diretriz Metodológica (STARD)

Section & Topic	No	Item
TITLE OR ABSTRACT		
OK	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)
ABSTRACT		
OK	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)
INTRODUCTION		
OK	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test
OK	4	Study objectives and hypotheses
METHODS		
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)
OK		
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria
Not Applicable	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication
OK	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy
OK	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory
	18	Intended sample size and how it was determined
RESULTS		
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram
Not Applicable	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard
OK		
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard
DISCUSSION		
OK	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test
OTHER INFORMATION		
OK		
	28	Registration number and name of registry
	29	Where the full study protocol can be accessed
	30	Sources of funding and other support; role of funders