UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos

DARLAN AUGUSTO DA COSTA ROCHA

Tese para obtenção do título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio.

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos

DARLAN AUGUSTO DA COSTA ROCHA

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em **Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)**.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio.

São Paulo
2019

Dedicatória

Dedico todo esforço que depositei neste trabalho à minha mãe Regina Marcia da Costa (*in memoriam*), que já se foi, mas continua sendo minha maior fonte de força e inspiração na vida, com todo o meu amor e gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a minha esposa Flávia, pessoa com quem amo partilhar minha vida e que não poupou esforços para me ajudar. Sua presença me trouxe segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Jorge, por me acolher em seu laboratório, por ter me proporcionado muito conhecimento científico, ter me motivado, acreditado em meu potencial, além de todas manifestações de caráter e apoio em todos os momentos difíceis dos últimos anos. A minha principal fonte de inspiração e um grande exemplo de vida. É um privilégio e motivo de orgulho trabalhar sob sua liderança.

Ao meu irmão Danilo, que é um dos meus principais incentivadores, que me mantém motivado para atingir meus objetivos, para que “nunca desista !!!”, e me ajuda a distrair com lama e graxa nos fins de semana.

Agradeço também aos maravilhosos momentos que passo com meus familiares quando vou para Minas Gerais ou interior de São Paulo, especialmente ao meu Pai Waldir, Altairzo, Tio José Márcio e Tio Rui Mário e aos amigos que me deram muita ajuda e suporte Fabi, Marina Eloi, Juliana, Mayne, Suely, Aline e especialmente à Bruna pela apresentação há um bom tempo atrás da linguagem R, principal software utilizado nesta tese.

Aos assessores científicos do grupo Fleury Alessandra, Valdemir, Amauri e Karin, bem como os colaboradores do P&D e Microbiologia Danielle, Ellen, Fernanda, Sabrina e Carla que me ajudaram muito, principalmente com treinamentos, utilização dos equipamentos, pedidos de reagentes, consultas ao sistema e leituras de testes realizados nos fins de semana.

Agradeço ao Grupo Fleury pelo apoio financeiro para a execução do projeto, além da disponibilização dos isolados, infraestrutura, equipamentos e corpo técnico científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O aprendizado constante é bom, é estimulante, nos atualiza e assim nos habilita a interagir com os novos desafios e com as permanentes mudanças com muito mais habilidade e competência” ...

” ...estamos sempre aprendendo, estudando, experimentando, observando.”

Floriano Serra

RESUMO

Rocha, D. A. C.. **Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram negativos** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2019.

Introdução. Bacilos Gram negativos são importantes agentes de infecções graves, particularmente no ambiente hospitalar. Nos últimos anos tem havido um número crescente de infecções por isolados produtores de carbapenemases, o que limita as opções de tratamento. Infecções por microrganismos multi-resistentes estão relacionados a taxas de mortalidade mais elevadas e a rapidez no diagnóstico e a terapia empírica combinada podem reduzir as taxas de mortalidade. A espectrometria de massas (MS) trouxe um grande ganho de tempo na identificação microbiana, mas os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA), que fornecem resultados fidedignos e em uso na rotina clínica demandam 16 a 20 horas de incubação. O uso combinado da MS e métodos rápidos de TSA permitiria reduzir o tempo do ajuste terapêutico, potencialmente reduzindo a mortalidade. Há na literatura a descrição de novos métodos para TSA rápidos, mas a maioria não está comercialmente disponível. Dentre eles, a citometria de fluxo (CF) e métodos baseados em condutividade elétrica (CE) potencialmente atendem a demanda.

Materiais e métodos. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo (MC) com leitura visual (18h) foi considerada o padrão ouro. A determinação das CIMs por CF foi realizada após 120 min de incubação a 37ºC, marcação com indicadores celulares, contagem celular padronizada com microesferas e algoritmo em linguagem R para análise de vários arquivos citométricos simultaneamente. A avaliação da sensibilidade foi realizada para polimixina B (PB), amicacina (AMI) e meropenem (MEM). Para padronização do método de CIM foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* 3313 produtora de MCR-1*, Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 produtora de KPC, *K. pneumoniae* J9243971 e *Proteus mirabilis* J9103900, além de 51 concentrados bacterianos provenientes de hemoculturas positivas para diferentes espécies. Além das concentrações convencionais, foram realizados testes com concentrações elevadas de PB e leitura após 15 min de incubação. As aquisições obtidas na presença de PB foram comparadas com aquelas obtidas sem exposição.
O teste rápido por CE foi feito inicialmente padronizado com as cepas *E. coli* 3313 e *P. mirabilis* J9103900. Três tubos foram preparados: um com suspensão bacteriana, o segundo com suspensão submetida a sonicação e o terceiro com suspensão bacteriana exposta à PB. A seguir os três tubos foram analisados por CE.

Resultados e discussão. Para a determinação da CIM por CF houve concordância essencial e categórica de 94,12% para AMI, concordância essencial de 94,12% e categórica de 98,04% para MEM e concordância essencial de 94,12% e categórica de 100% para PB quando comparadas com a CIM não automatizada, dessa forma houve apenas 5,88% de erros menores para AMI e 1,96% para MEM. A análise por CE permitiu diferenciar bactérias íntegras daquelas lisadas, entretanto, os ensaios contendo apenas solução de sulfato de polimixina B ou sulfato de sódio não foram reprodutíveis.

Conclusões. Os resultados da determinação da CIM por CF indicam ótima correlação (>94%) com MC para PB, AMI e MEM. Os ensaios com CE permitiram diferenciar

células íntegras de células lisadas, mas há necessidade de modificação do dispositivo de medição.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Condutividade elétrica. Resistência microbiana a drogas. Teste de sensibilidade microbiana. Métodos rápidos.
darlan

ABSTRACT

Rocha, D. A. C.. ***Fast methods for antimicrobial susceptibility assessment in Gram-negative bacilli.*** *Doctoral Thesis. School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, 2019.*

Introduction. *Gram-negative bacilli are important agents of serious infections, particularly in the hospital setting. In recent years there have been a growing number of infections by carbapenemase-producing isolates, which limits treatment options. Multi-resistant microorganism infections are related to higher mortality rates and rapid diagnosis and combined empirical therapy may reduce mortality rates. Mass spectrometry (MS) has brought a great deal of time for microbial identification, but antibiotic susceptibility testing (AST), which provides reliable results and in routine clinical use, requires 16 to 20 hours of incubation. The combined use of MS and fast AST methods would reduce the time to therapeutic adjustment, potentially reducing mortality. New methods for fast AST are described in the literature, but most are not commercially available. Among them, flow cytometry (FC) and methods based on electrical conductivity (EC) potentially meet the demand.*

Materials and methods. *The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution (BD) with visual reading (18h) was considered the gold standard. The determination of MICs by FC was performed after 120 min of incubation at 37ºC, marking with cellular indicators, standardized cellular counting with beads and R language algorithm for analysis of several cytometric files simultaneously. Sensitivity evaluation was performed for polymyxin B (PB), amikacin (AMI) and meropenem (MEM). For standardization of the MIC method, the strains Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, MCR-1 producer E. coli 3313, KPC producer Klebsiella pneumoniae BAA-1705, K. pneumoniae J9243971, Proteus mirabilis J9103900 and 51 bacterial concentrates from positive blood cultures for different species were used. In addition to conventional concentrations, tests with high concentrations of PB and reading after 15 min of incubation were performed. Acquisitions obtained in the presence of PB were compared with those obtained without exposure.*

The fast EC test was initially standardized with E. coli 3313 and P. mirabilis J9103900 strains. Three tubes were prepared: one with bacterial suspension, the second with sonication suspension and the third with bacterial suspension exposed to PB. Then the three tubes were analyzed by EC.

Results and discussion. *The determination of MIC by FC there was an essential agreement and categorical agreement of 94.12% for AMI, essential agreement of 94.12% and categorical agreement of 98.04% for MEM and essential agreement of 94.12% and categorical agreement of 100% for PB when compared to non-automated MIC, thus there were only 5.88% of minor errors for AMI and 1.96% for MEM. The analysis by EC allowed to differentiate intact bacteria from those lysed, however, the assays containing only polymyxin B sulfate solution or sodium sulfate were not reproducible.*

Conclusions*. The results of the MIC determination by FC indicate an excellent correlation (> 94%) with BD for PB, AMI, and MEM. The EC assays allowed differentiating intact cells from lysed cells, but there is a need for modification of the measuring device.*

Keywords: *Flow cytometry. Electric conductivity. Microbial drug resistance. Microbial Sensitivity Test. Fast methods.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9

1.1 Métodos tradicionais para determinar sensibilidade a antimicrobianos 12

1.2 Microscopia em tempo real 14

1.3 Espectrometria de massas 15

1.4 Métodos baseados em amplificação de DNA 17

1.5 Testes rápidos para detecção de isolados resistentes à carbapenêmicos e polimixinas 17

1.6 Citometria de fluxo 18

1.7 Condutividade elétrica de culturas bacterianas 22

5 CONCLUSÕES 25

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

1 INTRODUÇÃO

O grupo de bactérias *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanniii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. são frequentemente isolados de casos de infecções nosocomiais, e são geralmente resistentes à maioria absoluta dos antimicrobianos comercialmente disponíveis. Por isso são referenciados com a sigla ESKAPE, pois conseguem "escapar" da ação dos antimicrobianos. A dificuldade no tratamento das infecções causadas por este grupo de microrganismos se reflete em altas taxas de morbidade e mortalidade (EL-MAHALLAWY et al., 2016; FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2017). *Klebsiella pneumoniae* é um dos patógenos mais importantes do grupo ESKAPE por sua maior frequência em relação aos demais, grande diversidade de mecanismos de resistência e capacidade de disseminação de novos mecanismos de resistência (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

As infecções mais importantes causadas por *K. pneumoniae* são bacteremias (12,3%), pneumonias (10,2%), meningites e infecções de pele e tecidos moles (10,4%) (COQUE et al., 2002; GALES et al., 2012; RAMIREZ et al., 2014; WOLOJ et al., 1986).

A alta taxa de colonização de pacientes com *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases (KpPC) tem se tornado um problema epidemiológico e clínico, pois podem causar infecção e se disseminar em ambiente hospitalar causando surtos, e alguns países já consideram esse microrganismo endêmico (TUMBARELLO et al., 2015). Esses microrganismos inativam quase todos os β-lactâmicos disponíveis para uso clínico e usualmente apresentam resistência concomitante a antimicrobianos importantes na prática médica, a exemplo de fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (DAIKOS et al., 2014). Os antibióticos mais ativos são a colistina e tigeciclina; contudo alguns trabalhos indicam aumento na taxa de resistência para esses antimicrobianos, o que dificulta muito o tratamento dos pacientes infectados (DAIKOS et al., 2014). Mais recentemente foi introduzida na prática clínica a associação ceftazidima-avibactam, que tem ação adequada contra a maioria dos isolados produtores de KPC, mas não contra aqueles produtores de metalo-betalactamases e algumas variantes de KPC, a exemplo de KPC-3, KPC-23 e KPC-31(ANTONELLI et al., 2019; GAIBANI et al.,

2018; GALANI et al., 2019; HAIDAR et al., 2017; LIVERMORE et al., 2015; SHIRLEY, 2018).

Infecções graves causadas por KpPC apresentam alta taxa de mortalidade média quando comparadas com *K. pneumoniae* não produtoras de carbapenemases, de até 32,1% contra 9,9%, respectivamente (GASINK et al., 2009).

A taxa de mortalidade associada a KpPC varia de 22 a 78%, dependendo da doença de base e idade da população estudada, além disso está associada à maior taxa de mortalidade relacionada com infeções no ambiente hospitalar (TUMBARELLO; LOSITO; GIAMARELLOU, 2018; TUMBARELLO et al., 2015). O maior desafio no tratamento de infecções por KpPC é a escolha adequada do melhor tratamento. Estudos recentes sugerem regimes com dois ou mais antimicrobianos. A taxa de mortalidade é de 44,4% quando o tratamento é monoterápico, enquanto a taxa de mortalidade é de 27,2% quando o tratamento é combinado (DAIKOS et al., 2014; TUMBARELLO et al., 2018; TUMBARELLO et al., 2015). Daikos e colaboradores (2014) descrevem que a taxa de mortalidade utilizando carbapenêmicos em terapia combinada é de 19,9%, indicando um efeito sinérgico e que a monoterapia com colistina ou aminoglicosídeos é menos efetiva (DAIKOS et al., 2014).

A redução no tempo para o diagnóstico de infecções, identificação do agente infeccioso e tratamento do paciente, principalmente aqueles com infecções sistêmicas e causadas por microrganismos resistentes, é fundamental para a diminuição da mortalidade e do tempo de permanência do paciente no hospital (BARENFANGER; DRAKE; KACICH, 1999; CHANDRASEKARAN et al., 2018; CHOI et al., 2017; DOERN et al., 1994; INGLIS; EKELUND, 2019; MACHEN; DRAKE; WANG, 2014; PEREZ et al., 2013; TRENHOLME et al., 1989). Com a introdução da tecnologia de espectrometria de massas MALDI-ToF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight Mass Spectrometry*) na rotina laboratorial de microbiologia clínica, é possível a identificação de bactérias a nível de gênero ou espécie em alguns minutos, desde que haja uma massa bacteriana mínima (PEREZ et al., 2013).

Para a determinação da sensibilidade antimicrobiana, de bactérias em laboratórios clínicos, atualmente são utilizados métodos tradicionais a exemplo da disco-difusão, microdiluição em caldo e gradiente em fita ou sistemas

automatizados como Vitek2, Microscan e Phoenix. Existem várias metodologias publicadas que são capazes de reduzir o tempo de análise quando comparado com os métodos tradicionais e automatizados, a exemplo de citometria de fluxo, medidas de condutividade elétrica, espectrometria de massas, microscopia em tempo real, e métodos baseados em amplificação de DNA (Tabela 1). No entanto, essas metodologias precisam de validação e comparação com os métodos tradicionais, principalmente os que são baseados em concentração inibitória mínima para garantir a segurança do resultado e interpretação pelos pontos de corte preconizados pelo EUCAST ou CLSI (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009) (VAN BELKUM; DUNNE, 2013).

Tabela 1 - Características dos principais métodos utilizados para determinação de sensibilidade ou resistência bacteriana

Método	**Princípio do método**	**Inóculo > 10^5 Células**	**PC ou CD**	**Custo**	**Manual ou automático**	**CIM Real?**	**Tempo para resultado (horas)**
Diluição em ágar	Inibição do crescimento em meio sólido com antibióticos	Sim	CD	Baixo	Manual	Sim	>10
Testes automatizados (Vitek, Phoenix, Microscan)	Monitoramento do crescimento ou conversão do substrato utilizando sistema óptico	Sim	CD	Baixo	Automático	Sim/ Não	6-18
Microdiluição em caldo	Inibição de crescimento em meio líquido acrescido de antibióticos	Sim	CD	I	Manual e Automático	Sim/ Não	>10
Ágar Cromogênico	Conversão metabólica de compostos cromogênicos presentes no meio	Sim	CD	I	Manual	Não	>10
Disco difusão	Medida de inibição de crescimento em torno de disco contendo antibiótico	Sim	CD	Baixo	Manual e Automático	Sim/ Não	>10
Fita gradiente	Medida de inibição de crescimento em torno de fita contendo gradiente de concentração de antibiótico	Sim	CD	I	Manual e Automático	Sim	>10

Método	Princípio do método	Inóculo > 10^5 Células	PC ou CD	Custo	Manual ou automático	CIM Real?	Tempo para resultado (horas)
PCR	Amplificação de DNA	Não	CD	I	Manual e Automático	Não	<1
Microscopia em tempo real	Registro de divisão bacteriana (em nível celular) em tempo real	Não	CD	NC	Manual	Não	<1
Citometria de fluxo	Medidas de tamanho, complexidade e marcação de células viáveis e inviáveis.	Não	CD/PC	I	Automático	Sim/ Não	<5
MALDI-ToF MS	Detecção de produção de proteínas e produtos de degradação de antibióticos	Sim	PC	I	Automático	Não	<5
Microfluídos	Monitoramento de crescimento ou conversão de substrato em meio líquido na escala de nanolitros	Não	PC	NC	Automático	Sim/ Não	<5
Sequenciamento de nova geração	Sequenciamento de DNA genômico	Não	CD/PC	Alto	Automático	Não	>10
Medidas de impedância	Monitoramento de características elétricas da suspensão contendo células expostas a antibióticos	Sim	PC	NC	Automático	Não	<5

CD – Comercialmente disponível; PC – Prova de conceito; NC – Não conhecido; I – Intermediário. Adaptado de (VAN BELKUM; DUNNE, 2013).

1.1 Métodos tradicionais para determinar sensibilidade a antimicrobianos

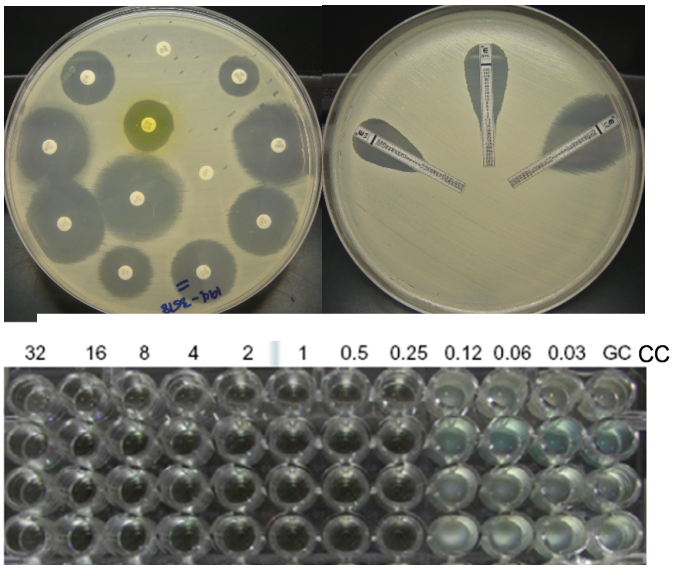
O método de microdiluição em caldo se baseia na diluição seriada do antibiótico em caldo Mueller Hinton, de forma que várias concentrações do antibiótico são testadas na placa. Após o preparo das diluições, uma suspensão bacteriana com uma concentração padronizada (1 a 5 x 10^5 UFC/mL) é inoculada. Em seguida a placa é incubada por 16-20 horas a 35 ± 1˚C. Após o período de incubação, é possível visualizar uma massa bacteriana no fundo dos poços nos quais a concentração do antibiótico não foi capaz de inibir o crescimento. A concentração inibitória mínima é o primeiro poço da diluição no

qual não há, visivelmente, crescimento bacteriano (Figura 1) (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

O método de disco-difusão é prático, barato e bem padronizado. O teste é feito inoculando uma suspensão bacterina na concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL sobre a superfície de ágar Mueller Hinton. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com concentrações fixas de antimicrobianos são posicionados na superfície do ágar. A placa é incubada por 16 a 20 horas a 35˚±1°C. Os antibióticos presentes nos discos se difundem concentricamente no ágar, formando um halo de inibição de crescimento. O diâmetro de cada halo é aferido e comparado com tabelas contendo os pontos de corte, sendo possível categorizar o isolado como sensível (S), sensível aumentando exposição (I) ou resistente (R) para cada antibiótico testado (Figura1) (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

O teste com gradientes em fita é feito inoculando uma suspensão com concentração de aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL sobre a superfície de ágar Mueller Hinton e fitas, com uma escala em uma das faces e um gradiente de antimicrobiano na outra, são aplicadas na superfície do ágar. A placa é incubada por 16 a 20 horas a 35 ± 1˚C. A leitura do teste é feita na interseção da elipse de inibição com a fita, correspondendo à concentração inibitória mínima (Figura 1) (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

Figura 1 – Testes tradicionais para determinação da sensibilidade aos antimicrobianos

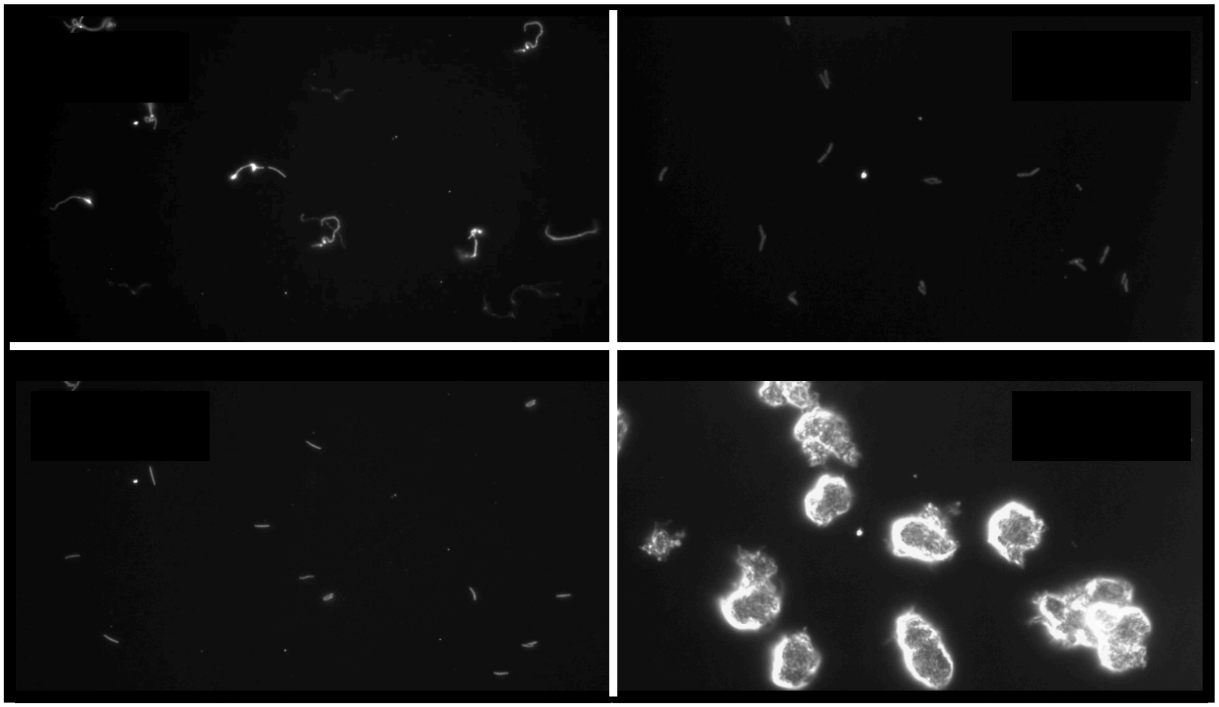


Disco-difusão (superior esquerda), gradiente em fita (superior direita) e microdiluição em caldo (inferior), utilizando polimixina B em *Pseudomonas aeruginosa* com concentrações que variam de 32 à 0,03 mg/L e controle de crescimento (CC) Adaptado de (JORGENSEN, J. H.; FERRARO, 2009).

1.2 Microscopia em tempo real

Atualmente há disponível comercialmente o dispositivo Accelerate® (exemplo de análises de densidade óptica de crescimento e microscopia automatizada com análise em tempo real), o qual pode identificar um isolado em até 90 minutos e o antibiograma em aproximadamente 7 horas. É baseado em preparação automática da amostra, no qual a identificação é realizada por FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization* e para o teste de sensibilidade, as células bacterianas são imobilizadas entre duas lâminas plásticas contendo diferentes concentrações de antimicrobiano, permitindo uma análise microscópica de cada célula, e consequentemente avaliação do crescimento microbiano. A determinação da concentração inibitória mínima é feita pela análise morfo-cinética da amostra, por microscopia de campo escuro das células previamente imobilizadas (Figura 2) (PANCHOLI et al., 2018; PANTEL; MONIER; LAVIGNE, 2018) (BURNHAM et al., 2014; FREDBORG et al., 2013) (CHOI et al., 2013; CHOI et al., 2014; MOHAN et al., 2013; TANG et al., 2013).

Figura 2 – Aquisições do equipamento Accelerate – Análise morfo-cinética de células



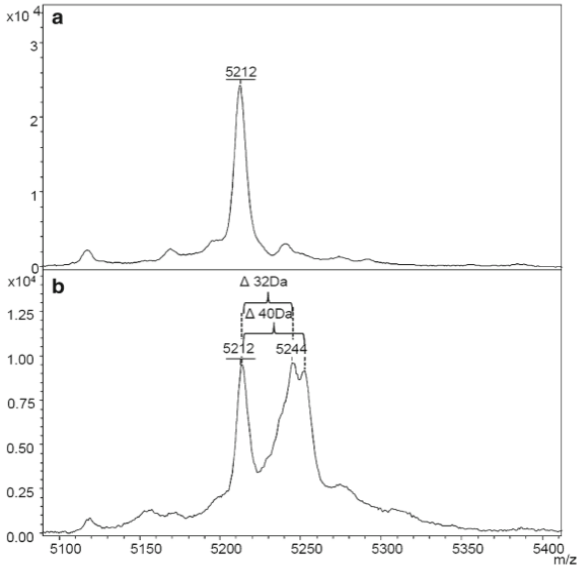
Teste de sensibilidade a antibióticos por análise morfo-cinética. Isolados da esquerda: *Escherichia coli* sensível à piperacilina-tazobactam (CIM=2 mg/L). Figura superior tempo 0 e inferior após incubação. Isolados da direita: *Escherichia coli* resistente à ceftazidima (CIM=32 mg/L), figura superior tempo 0 e inferior após incubação. Retirado de (ACCELERATE DIAGNOSTICS, 2018).

1.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi primeiramente sugerida para utilização na identificação de bactérias em 1975 por Anhalt e Fenselau (ANHALT; FENSELAU, 1975). Uma das maneiras desenvolvidas para a utilização da espectrometria de massas para testes de sensibilidade a antibióticos se baseia na incorporação metabólica de aminoácidos marcados com isótopos estáveis (SILAC – *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture*). O microrganismo é cultivado em duas condições diferentes: a primeira em meio convencional (com abundância de isótopos naturais estáveis) sem antibióticos; a segunda em meio de composição química similar exceto pela presença de uma forma isotopomérica de um aminoácido, como a lisina (que pode ser marcada, por exemplo, com C^{13} e N^{15}) e acrescido do antibiótico testado. As duas culturas são combinadas e analisadas por espectrometria de massas. A detecção de pares isotopoméricos (mais pesados) resultantes da incorporação de aminoácidos pesados, decorrente de síntese proteica, indica a proliferação do

microrganismo na presença do antibiótico, ou seja, a resistência (Figura 3) (JUNG et al., 2014).

Figura 3 - Diferentes espectros gerados pelo método Maldi-TOF por SILAC



(A) Espectro de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio de cultura com lisina nativa. (B) Espectro de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio de cultura com lisina marcada com isótopos estáveis. Notar duplo pico com lisina nativa e lisina marcada, Retirado de Jung (2014) (JUNG et al., 2014).

Outra aplicação da espectrometria de massas para o teste de sensibilidade a antibióticos recentemente descrita é mais simples e resumidamente consiste em realizar a leitura do método de microdiluição por espectrometria de massas. Um volume de 6μL de cada poço de um ensaio de microdiluição convencional, é dispensado diretamente na *target plate* do espectrômetro de massas e imediatamente após a inoculação é incubado por até seis horas, sendo então realizada a aquisição no equipamento. No poço no qual não há antibiótico a bactéria não é inibida e há a produção de proteínas de maneira exponencial, sendo possível a identificação da bactéria; caso contrário, no poço que contém antibiótico, a depender da concentração, as bactérias são inibidas de maneira que a quantidade de proteínas se mantém próxima ou a mesma do inóculo inicial e abaixo do limite de detecção do equipamento. Cada concentração é testada em triplicata. A ausência de identificação da bactéria pelo instrumento indica sensibilidade ao antibiótico testado (IDELEVICH et al., 2018; LI et al., 2018).

1.4 Métodos baseados em amplificação de DNA

O sistema FilmArray é um kit comercialmente disponível, baseado em dupla PCR (*Polymerase chain reaction*), contém vários pares de iniciadores para identificação de patógenos e alguns genes de resistência. O ensaio se baseia em duas etapas de amplificação: a primeira reação amplifica em uma região alvo e sequencialmente o produto se movimenta em uma matriz que contém vários poços, cada um com um par de iniciadores (primers). Numa segunda etapa ocorre amplificação de DNA individualizada por poço e alvos, na qual o fluorocromo LCGreen® intercala com o DNA amplificado revelando os poços com reação positiva. As reações são realizadas em triplicata. Esse sistema pode detectar em 70 minutos 15 gêneros e 11 espécies de bactérias, além de genes de resistência *mecA*, *vanA/B* e bla_{KPC} (MARCH-ROSSELLO, 2017). Métodos moleculares baseados em PCR são bastante confiáveis, e neste caso a sensibilidade está entre 83 a 100% e especificidade superior à 99% para os diferentes alvos. As amostras provenientes de hemoculturas positivas podem ser utilizadas diretamente no kit. No entanto, métodos moleculares, baseados em PCR só amplificam sequências previamente conhecidas, não avaliam expressão dos genes de resistência, porinas e bombas de efluxo, que também resultam em resistência antimicrobiana. Além desse kit, existem outros métodos moleculares baseados PCR multiplex *in house* (QUILES et al., 2015), bem como *microarray* e sequenciamento; entretanto atualmente têm alto custo e o tempo para obtenção de resultados supera o necessário para a realização da microdiluição, que é o padrão ouro. Além disso, é necessária mão de obra especializada para análise.

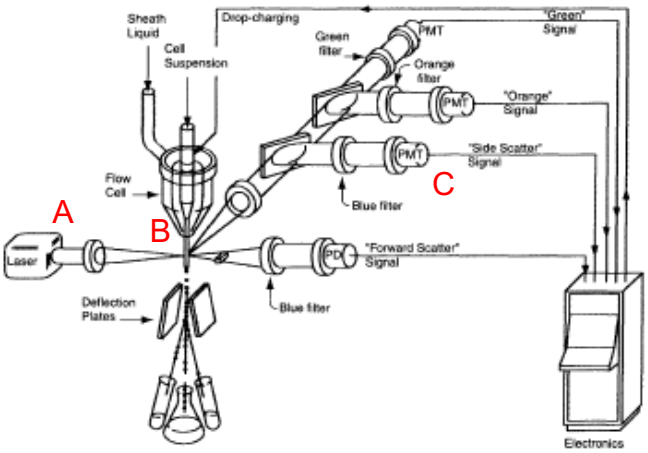
1.5 Testes rápidos para detecção de isolados resistentes à carbapenêmicos e polimixinas

Há também os testes rápidos de triagem para detecção de isolados resistentes à carbapenêmicos, polimixinas e aminoglicosídeos. As carbapenemases inicialmente hidrolisam o anel betalactâmico dos carbapenêmicos e a seguir ocorre reação de descarboxilação, o que resulta na redução do pH do meio (Carba-NP e BlueCarba). No caso das polimixinas ou aminoglicosídeos, o teste se baseia em detectar isolados que são resistentes e, portanto, mesmo após a exposição ao antibiótico são capazes de crescer e metabolizar a glicose, produzindo ácido, após 2 horas de incubação (*Rapid Polymyxin NP*). Esses métodos permitem a detecção rápida (até 2 horas) de bactérias resistentes a altos níveis de antibióticos; no entanto não são capazes de fornecer a concentração inibitória mínima (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016; NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012; PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013).

1.6 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo pode ser definida como um método para medida e análise de partículas em suspensão, submetidas a um fluxo. Os dados são obtidos dos sinais da variação da transmissão/absorção e reflexão da luz do laser que incide nas partículas presentes no fluxo (Figuras 4 e 5) (GIVAN, 2001).

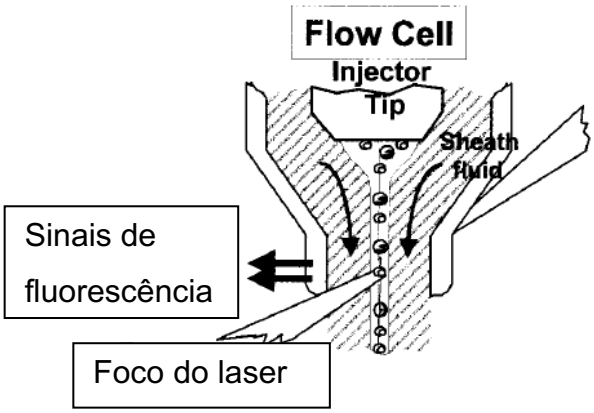
Figura 4 – Componentes de um citômetro de fluxo



A – Laser; B- Foco do laser e fluxo com suspensão de partículas; C – Conjunto de detectores e filtros que detectam a informação da variação da transmissão de luz obtida para o computador para ser possível a análise dos dados. Retirado de Givan (2001) (GIVAN, 2001).

Figura 5 – Foco hidrodinâmico do citômetro de fluxo

Célula de fluxo e ponta do injetor



Foco hidrodinâmico que permite a centralização das células no líquido para a passagem no laser. Retirado de Alvarez-Barrientos (2001) (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000).

O citômetro de fluxo é um equipamento, que apesar do nome, não necessariamente lida apenas com células, mas pode aferir também diversos tipos de partículas que podem ser suspensas em meio líquido e submetidas ao fluxo, e que podem absorver ou dispersar de algum modo a luz emitida pelo laser. A análise dessa dispersão permite obter dados de tamanho, complexidade e capacidade de ligação com cromógenos específicos que são excitados pelo laser (GIVAN, 2001). A grande vantagem da utilização da citometria de fluxo em comparação com a microscopia (método que avalia diretamente as estruturas celulares) é que milhões de células podem ser avaliadas em todos os parâmetros do equipamento em apenas alguns segundos (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; GAUTHIER; ST-PIERRE; VILLEMUR, 2002), além de menor subjetividade e possibilidade de avaliações quantitativas mais precisas.

Em microbiologia clínica, a citometria de fluxo pode ser utilizada em análises de detecção direta, testes sorológicos e testes de susceptibilidade de bactérias, fungos, parasitas e vírus (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000). Há na literatura diversos trabalhos que aplicam a metodologia de diversas maneiras para os diferentes microrganismos, principalmente em testes de susceptibilidade (Tabela 2) (BARBOSA et al., 2014; FREDRICKS et al., 2006; PINA-VAZ, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2005; SHRESTHA et al., 2011; VALE-SILVA et al.; WANG et al., 2014).

A análise de bactérias em citometria de fluxo com fluorocromos permite a avaliação de parâmetros como a viabilidade celular (integridade) e algumas vias metabólicas (atividade bacteriana) e é possível separar as análises por

populações com cada uma dessas características. A avaliação de determinados antibióticos juntamente com os corantes de viabilidade celular permite a avaliação da atividade do antibiótico sobre a célula bacteriana (bactericida ou bacteriostático) além de permitir a análise de milhões de células concomitantemente (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000).

Apesar do grande potencial de aplicabilidade clínica representado pela citometria de fluxo, é necessário o estudo comparativo de métodos tradicionais de susceptibilidade a antibióticos recomendados pelo CLSI e EUCAST com o método de citometria de fluxo para aplicabilidade em laboratórios clínicos. A citometria de fluxo pode reduzir o tempo de análise do antibiograma de 24 horas para até 90 minutos (BROEREN et al., 2013; GAUTHIER et al., 2002); contudo há uma escassez de trabalhos recentes que tenham avaliado a citometria de fluxo, principalmente com espécies que possuem diversos mecanismos de resistência, o que torna o método pouco estudado em relação aos métodos tradicionais de susceptibilidade a antimicrobianos. A Tabela 2 sumariza os principais trabalhos utilizando citometria de fluxo aplicada ao teste de sensibilidade a antibióticos. Além disso, o tempo mínimo para liberação dos resultados é bastante heterogêneo: de 90 minutos a 6 horas (com exceção das micobactérias). Apesar da heterogeneidade de protocolos, a citometria de fluxo pode reduzir substancialmente o tempo para obtenção do perfil de sensibilidade aos antibióticos com determinação da concentração inibitória mínima e não simplesmente detectar resistência.

Tabela 2 – Revisão de principais trabalhos que realizaram antibiograma por citometria de fluxo

Ano de publicação	Microrganismos estudados	Marcadores para citometria	Tipo de resultado	Tempo mínimo para o resultado	Antibióticos testados	Referência
1982	*Escherichia coli*	Brometo de etídio	CIM	3 horas	Cefazolina, moxalactam, cefamandol	(MARTINEZ et al., 1982)
1989	*Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis*	Brometo de etídio	Categoria	2 horas	Amicacina	(COHEN; SAHAR, 1989)
1996	*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium gordonae e Mycobacterium marinum*	Diacetato de fluoresceína	CIM	24 horas	Ciprofloxacino, claritromicina, eritromicina, kanamicina, rifampicina e tobramicina	(BOWNDS et al., 1996)
1997	*Escherichia coli*	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol [DiBAC4(3)]	Contagem de unidades formadoras de colônias	4 horas	Azitromicina, cefuroxima, e ciprofloxacino	(JEPRAS et al., 1997)
1998	*Mycobacterium tuberculosis*	Diacetato de fluoresceína	CIM	24 horas	Rifampicina, isoniazida, etambutol	(KIRK et al., 1998)
2002	*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus e Staphylococcus epidermidis*	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol [DiBAC4(3)] e Iodeto de propídio	Categoria	2 horas	Ampicilina, carbenicilina, ceftriaxona, ceftazidima, gentamicina, nitrofurantoina, norfloxacino, oxacilina, penicilina G, tetraciclina cotrimoxazol e vancomicina	(GAUTHIER et al., 2002)
2005	*Mycobacterium tuberculosis*	SYTO 16 e Iodeto de propídio	Categoria	72 horas	Estreptomicina, rifampicina, isoniazida, etambutol	(PINA-VAZ, C. et al., 2005)
2006	*Mycobacterium tuberculosis*	Contagem bacteriana (Sem corantes)	Categoria	24 horas	Pirazinamida	(FREDRICKS et al., 2006)
2011	*Staphylococcus aureus*	BRAG3	Triagem para MRSA	4 horas	Oxacilina	(SHRESTHA et al., 2011)

Ano de publicação	Microrganismos estudados	Marcadores para citometria	Tipo de resultado	Tempo mínimo para o resultado	Antibióticos testados	Referência
2012	*Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa*	SYTO9 e Iodeto de propídio	Populações lesionadas e viáveis	5 horas	Ampicilina, gentamicina, cefotaxima, piperacilina, amicacina, ciprofloxacino, ceftazidima, vancomicina	(SOEJIMA; MINAMI; IWATSUKI, 2012)
2013	*Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol [DiBAC4(3)]	CIM + triagem para ESBL	3 horas	Ceftazidima, cefotaxima, ácido clavulânico	(FARIA-RAMOS et al., 2013)
2013	*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*	Contagem bacteriana (Sem corantes)	CIM	90 min	Amoxicilina, piperacilina, gentamicina	(BROEREN et al., 2013)
2017	*Klebsiella pneumoniae*	Hoechst 33342, SYTO® 9 e Iodeto de propídio	Categoria	1 hora	Meropenem, Imipenem, Ertapenem	(MULRONEY et al., 2017;2018)
2018	*Yersinia pestis*	Corante Oxonol (SynaptoGreen C4/FM1–43)	CIM	6 horas	Ciprofloxacino, ampicilina, gentamicina, doxiciclina	(ZAHAVY et al., 2018)

1.7 Condutividade elétrica de culturas bacterianas

Alguns antimicrobianos como polimixinas, ß-lactâmicos e aminoglicosídeos têm ação bactericida, podendo causar o rompimento bacteriano com consequente liberação de íons, enzimas, proteínas e material genético para o meio extracelular, pois atuam na estrutura da parede e/ou membrana celular (BECKER; COOPER, 2013; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

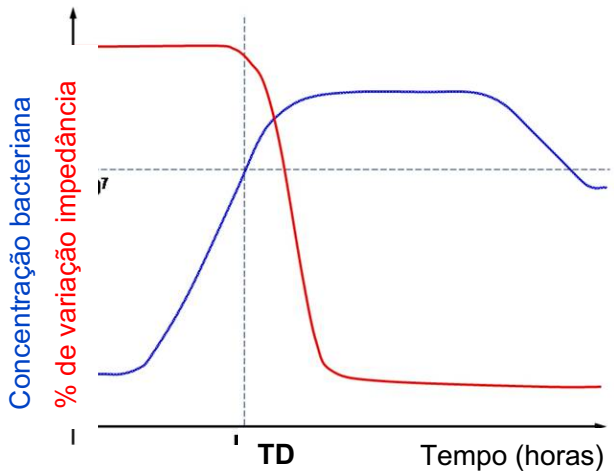
O aumento da concentração desses compostos liberados no meio extracelular, após a exposição das células bacterianas a um antibiótico, pode ser um indicador de morte ou injúria celular e pode ser aplicado para a determinação da sensibilidade a antibióticos. Métodos químicos e físicos podem ser utilizados para a mensuração desses compostos, a exemplo de eletrodo seletivo de íons,

espectrofotometria de absorção atômica, espectrometria de massas, medida de pH, condutividade elétrica, impedância, capacitância e métodos colorimétricos. Vários desses métodos já são comercialmente disponíveis, mas não para esse tipo de aplicação, e apresentam faixas de linearidade que são utilizados para dosagem de níveis séricos em humanos, provavelmente fora da faixa de detecção de biomoléculas liberadas por bactérias expostas a antibióticos e muitas vezes são dispendiosos, um fator impeditivo para laboratórios de pequeno e médio portes.

A condutividade elétrica em culturas bacterianas monitora o crescimento microbiano por um sinal elétrico que corresponde ao movimento dos íons entre dois eletrodos. Esse tipo de metodologia foi descrita inicialmente no final do século XIX (STEWART, 1899). Posteriormente, os métodos de condutividade, impedância e capacitância para o monitoramento de bactérias foram descritos e são utilizados principalmente por indústrias de alimentos, a exemplo da determinação do tempo de prateleira de produtos de consumo, verificação da contaminação por microrganismos em produtos industrializados e também em saúde pública para determinar carga bacteriana em amostras ambientais (BANCALARI et al., 2016; NOBLE, 1999).

Um dos equipamentos comerciais que afere a condutividade, impedância e capacitância é o Bactometer® da bioMérieux, divisão de indústria e ambiente. Foi um equipamento desenvolvido para a indústria farmacêutica, cosméticos, ambiente e alimentos (RAUGEL, 1999); no entanto, há uma publicação descrevendo a utilização deste equipamento para validação da sensibilidade a antibióticos e determinação da concentração inibitória mínima pela medida da impedância em tempo real (HUANG et al., 1998). O princípio de funcionamento do equipamento é a medida da impedância em cada amostra ao longo do tempo de incubação, permitindo a geração de uma curva na qual se avalia o porcentual de variação da medida atual comparada com a anterior. Dependendo do aumento da quantidade de microrganismos ou atividade metabólica, é induzida uma mudança no sinal, levando a uma inflexão da curva e determinando o tempo de detecção (TD), o qual é possível correlacionar com a quantidade de bactérias na amostra (Gráfico 1) (RAUGEL, 1999).

Gráfico 1 – Variação da Impedância em função do crescimento bacteriano



Adaptado de (RAMÍREZ et al., 2009).

Atualmente, com o avanço tecnológico de microcontroladores digitais, há disponibilidade no mercado de equipamentos com código aberto e de baixo custo, a exemplo dos controladores Arduino e ESP32. É possível desenvolver um equipamento controlado por esses dispositivos no qual pode-se aplicar algoritmos capazes de aferir condutância, capacitância e impedância de células em suspensão. Uma vez desenvolvido, faz-se necessária a comparação com métodos tradicionais de susceptibilidade a antibióticos preconizados pelo CLSI e EUCAST e desenvolvimento e validação de testes rápidos ou de triagem para bactérias que apresentam alto nível de resistência. Bactérias sensíveis ao antibiótico testado causariam diferença na impedância enquanto bactérias resistentes não causariam aumento ou exibiriam um padrão distinto.

5 CONCLUSÕES

O teste rápido para triagem de isolados resistentes à polimixina B, utilizando citometria de fluxo funciona com altas concentrações do antibiótico mesmo para bactérias intrinsecamente resistentes, tem potencial para funcionar com cepas sensíveis, no entanto concentrações próximas ao ponto de corte precisam ser avaliadas com bactérias com CIMs próximas ao ponto de corte.

A determinação da concentração inibitória mínima para amicacina, meropenem e polimixina B, utilizando citometria de fluxo obteve uma concordância superior a 94% quando comparada com microdiluição em caldo.

O método de condutividade elétrica é capaz de detectar pequenas alterações em meios líquidos, portanto, consegue diferenciar células íntegras das lisadas, seja por lise física ou por exposição ao antibiótico polimixina B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCELERATE DIAGNOSTICS, I. Morphokinetic Cellular Analysis. 2018. Disponível em: < http://acceleratediagnostics.com/technology/mca/ >. Acesso em: 13/09/2018.

ALVAREZ-BARRIENTOS, A. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev,** v. 13, n. 2, p. 167-95, Apr 2000.

AMBRIZ-AVINA, V.; CONTRERAS-GARDUNO, J. A.; PEDRAZA-REYES, M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 461941, 2014.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. v. 47, p. 219–225, 1975.

ANTONELLI, A. et al. KPC-31 expressed in a ceftazidime/avibactam-resistant Klebsiella pneumoniae is associated with relevant detection issues. **J Antimicrob Chemother,** v. 74, n. 8, p. 2464-2466, Aug 1 2019.

BANCALARI, E. et al. Application of Impedance Microbiology for Evaluating Potential Acidifying Performances of Starter Lactic Acid Bacteria to Employ in Milk Transformation. **Front Microbiol,** v. 7, p. 1628, 2016.

BARBOSA, J. et al. Evaluation of Giardia duodenalis viability after metronidazole treatment by flow cytometry. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 8, p. 1078-80, Dec 2014.

BARENFANGER, J.; DRAKE, C.; KACICH, G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. **J Clin Microbiol,** v. 37, n. 5, p. 1415-8, May 1999.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chem Biol,** v. 8, n. 1, p. 105-15, Jan 18 2013.

BECTON, D. A. C. BBLTM PromptTM Inoculation System For use with the Disc Diffusion Susceptibility Test. 2010. Disponível em: < http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8808061(201006).pdf >.

BIOMERIÉUX. ETEST APPLICATION GUIDE. 2012. Disponível em: < (https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/supplementary_inserts_-_16273_-_b_-_en_-_eag_-_etest_application_guide-3.pdf) >.

BIOSCIENCES, B. Spectrum viewer. 2019. Disponível em: < https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/product-selection-tools/spectrum-viewer. >. Acesso em: 21/09/2019.

BOI, P. et al. Evaluation of Escherichia coli viability by flow cytometry: A method for determining bacterial responses to antibiotic exposure. **Cytometry B Clin Cytom,** v. 88, n. 3, p. 149-53, May-Jun 2015.

BOWNDS, S. E. et al. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. **J Clin Microbiol,** v. 34, n. 6, p. 1386-90, Jun 1996.

BRITANNICA, E. Platinum. 2018. Disponível em: < https://www.britannica.com/science/platinum >. Acesso em: 31/08/2018.

BRITANNICA, E. Semiconductor. 2018. Disponível em: < https://www.britannica.com/science/semiconductor >. Acesso em: 31/02/2018.

BROEREN, M. A. et al. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. **Clin Microbiol Infect,** v. 19, n. 3, p. 286-91, Mar 2013.

BURNHAM, C. A. et al. Rapid ertapenem susceptibility testing and Klebsiella pneumoniae carbapenemase phenotype detection in Klebsiella pneumoniae isolates by use of automated microscopy of immobilized live bacterial cells. **J Clin Microbiol,** v. 52, n. 3, p. 982-6, Mar 2014.

BURNS, J. L. et al. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol,** v. 38, n. 5, p. 1818-22, May 2000.

BURT HOUTZ; JOE TROTTER; SASAKI, D. Tips on Cell Preparation for Flow Cytometric Analysis and Sorting, BD FACService TECHNOTES. 2004.

CHANDRASEKARAN, S. et al. Direct-from-Blood-Culture Disk Diffusion To Determine Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria: Preliminary Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. **J Clin Microbiol,** v. 56, n. 3, Mar 2018.

CHAPIN, K. C.; MUSGNUG, M. C. Direct susceptibility testing of positive blood cultures by using Sensititre broth microdilution plates. **J Clin Microbiol,** v. 41, n. 10, p. 4751-4, Oct 2003.

CHOI, J. et al. Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 1148, Apr 25 2017.

CHOI, J. et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. **Lab Chip,** v. 13, n. 2, p. 280-7, Jan 21 2013.

CHOI, J. et al. A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis. **Sci Transl Med,** v. 6, n. 267, p. 267ra174, Dec 17 2014.

CLAUSELL, A. et al. Influence of polymyxins on the structural dynamics of Escherichia coli lipid membranes. **Talanta,** v. 60, n. 2-3, p. 225-34, Jun 13 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019., 2019.

COHEN, C. Y.; SAHAR, E. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. **J Clin Microbiol,** v. 27, n. 6, p. 1250-6, Jun 1989.

COQUE, T. M. et al. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 2, p. 500-10, Feb 2002.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. Potential Impact of Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing on the Clinical Management of Gram-Negative Bacteremia Using the FASTinov((R)) Kit. **Front Microbiol,** v. 8, p. 2455, 2017.

COYLE, M. B. et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. **J Clin Microbiol,** v. 20, n. 3, p. 473-7, Sep 1984.

DAIKOS, G. L. et al. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 58, n. 4, p. 2322-8, 2014.

DE CUETO, M. et al. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 8, p. 3734-8, Aug 2004.

DERIS, Z. Z. et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. **J Antibiot (Tokyo),** v. 67, n. 2, p. 147-51, Feb 2014.

DOERN, G. V. et al. Evaluation of a direct blood culture disk diffusion antimicrobial susceptibility test. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 20, n. 5, p. 696-8, Nov 1981.

DOERN, G. V. et al. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. **J Clin Microbiol,** v. 32, n. 7, p. 1757-62, Jul 1994.

EL-MAHALLAWY, H. A. et al. Bacteremia due to ESKAPE pathogens: An emerging problem in cancer patients. **J Egypt Natl Canc Inst,** v. 28, n. 3, p. 157-62, Sep 2016.

ELLIS, B. et al. **flowCore: Basic structures for flow cytometry data. R package version 1.50.0.**: Bioconductor version: Release (3.9) 2019.

EUCAST, C. E. D. T. D. S. A. A. EUCAST Expert Rules Version 3.1. Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Tables. 2016.

_____. Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. 2019.

EUCAST, C. E. D. T. D. S. A. A.; BRCAST, C. B. D. T. D. S. A. A. Controle de Qualidade de Rotina e Controle de Qualidade Interno para Determinação da CIM e Disco-Difusão Conforme Recomendação do BrCAST - EUCAST. 2018.

_____. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2019.

FARIA-RAMOS, I. et al. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect,** v. 19, n. 1, p. E8-E15, Jan 2013.

FAY, D.; OLDFATHER, J. E. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. **J Clin Microbiol,** v. 9, n. 3, p. 347-50, Mar 1979.

FDA, U. S. D. O. H. A. H. S. F. A. D. A. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. 2009.

FOUNOU, R. C.; FOUNOU, L. L.; ESSACK, S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One,** v. 12, n. 12, p. e0189621, 2017.

FREDBORG, M. et al. Real-time optical antimicrobial susceptibility testing. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 7, p. 2047-53, Jul 2013.

FREDRICKS, B. A. et al. Rapid pyrazinamide susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by flow cytometry. **J Microbiol Methods,** v. 67, n. 2, p. 266-72, Nov 2006.

GAIBANI, P. et al. In vivo evolution of resistant subpopulations of KPC-producing Klebsiella pneumoniae during ceftazidime/avibactam treatment. **J Antimicrob Chemother,** v. 73, n. 6, p. 1525-1529, Jun 1 2018.

GALANI, I. et al. Genomic characterization of a KPC-23-producing Klebsiella pneumoniae ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. **Clin Microbiol Infect,** v. 25, n. 6, p. 763 e5-763 e8, Jun 2019.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 73, n. 4, p. 354-60, Aug 2012.

GANT, V. A. et al. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. **J Med Microbiol,** v. 39, n. 2, p. 147-54, Aug 1993.

GASINK, L. B. et al. Risk factors and clinical impact of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae. **Infect Control Hosp Epidemiol,** v. 30, n. 12, p. 1180-5, Dec 2009.

GAUTHIER, C.; ST-PIERRE, Y.; VILLEMUR, R. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. **J Med Microbiol,** v. 51, n. 3, p. 192-200, Mar 2002.

GIVAN, A. L. **Flow cytometry : first principles**. 2ª. New York: Wiley-Liss, 2001. ISBN 0-471-38224-8.

GRIMALDI, N. M. C. Condutimetria. 2018. Disponível em: < http://www.c2o.pro.br/hackaguas/apes03.html >. Acesso em: 31/08/2018.

HAIDAR, G. et al. Mutations in blaKPC-3 That Confer Ceftazidime-Avibactam Resistance Encode Novel KPC-3 Variants That Function as Extended-Spectrum beta-Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 61, n. 5, May 2017.

HOUGHTON, J. L. et al. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? **Chembiochem,** v. 11, n. 7, p. 880-902, May 3 2010.

HOYOS-MALLECOT, Y. et al. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. **J Microbiol Methods,** v. 105, p. 98-101, Oct 2014.

HUANG, A. H. et al. Direct antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli in blood cultures by an electrochemical method. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 10, p. 2882-6, Oct 1998.

IDELEVICH, E. A. et al. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. **Clin Microbiol Infect,** v. 24, n. 7, p. 738-743, Jul 2018.

INGLIS, T. J. J.; EKELUND, O. Rapid antimicrobial susceptibility tests for sepsis; the road ahead. **J Med Microbiol,** v. 68, n. 7, p. 973-977, Jul 2019.

JEPRAS, R. I. et al. Rapid assessment of antibiotic effects on Escherichia coli by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 41, n. 9, p. 2001-5, Sep 1997.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clin Infect Dis,** v. 49, n. 11, p. 1749-55, Dec 1 2009.

JORGENSEN, S. C. J.; RYBAK, M. J. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Pharmacotherapy,** v. 38, n. 4, p. 444-461, Apr 2018.

JUNG, J. S. et al. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 33, n. 6, p. 949-55, Jun 2014.

KIEHN, T. E.; CAPITOLO, C.; ARMSTRONG, D. Comparison of direct and standard microtiter broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. **J Clin Microbiol,** v. 16, n. 1, p. 96-8, Jul 1982.

KIRK, S. M. et al. Flow cytometric testing of susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 6, p. 1568-73, Jun 1998.

LESLEY, E. S. **A method for identifying bacteria in a sample**. WO2011138765A1 2011.

LI, M. et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a qualitative method in Acinetobacter baumannii complex. **J Microbiol Methods**, Sep 4 2018.

LIVERMORE, D. M. et al. In vitro selection of ceftazidime-avibactam resistance in Enterobacteriaceae with KPC-3 carbapenemase. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 59, n. 9, p. 5324-30, Sep 2015.

MACHEN, A.; DRAKE, T.; WANG, Y. F. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. **PLoS One,** v. 9, n. 2, p. e87870, 2014.

MARCH-ROSSELLO, G. A. Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. **Enferm Infecc Microbiol Clin,** v. 35, n. 3, p. 182-188, Mar 2017.

MARTINEZ, O. V. et al. The effect of some beta-lactam antibiotics on Escherichia coli studied by flow cytometry. **Cytometry,** v. 3, n. 2, p. 129-33, Sep 1982.

MOELLERING, R. C., JR.; ELIOPOULOS, G. M.; SENTOCHNIK, D. E. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. **J Antimicrob Chemother,** v. 24 Suppl A, p. 1-7, Sep 1989.

MOHAN, R. et al. A multiplexed microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing. **Biosens Bioelectron,** v. 49, p. 118-25, Nov 15 2013.

MULLER, S.; NEBE-VON-CARON, G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. **FEMS Microbiol Rev,** v. 34, n. 4, p. 554-87, Jul 2010.

MULRONEY, K. T. et al. Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 1903, May 15 2017.

_____. Author Correction: Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Sci Rep,** v. 8, n. 1, p. 6697, Apr 24 2018.

NCBI, N. C. F. B. I. Platinum. 2018. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23939 >. Acesso em: 31/08/2018.

NCBI, N. C. F. B. I. PubChem - Thiazole Orange. 2019. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov//#query=Thiazole-orange) >.

NOBLE, P. A. Hypothetical model for monitoring microbial growth by using capacitance measurements--a minireview. **J Microbiol Methods,** v. 37, n. 1, p. 45-9, Jul 1999.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis,** v. 22, n. 6, p. 1038-43, Jun 2016.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis,** v. 18, n. 9, p. 1503-7, Sep 2012.

O'DRISCOLL, N. H. et al. Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. **Arch Microbiol,** v. 200, n. 5, p. 793-802, Jul 2018.

PANCHOLI, P. et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. **J Clin Microbiol,** v. 56, n. 4, Apr 2018.

PANTEL, A.; MONIER, J.; LAVIGNE, J. P. Performance of the Accelerate Pheno system for identification and antimicrobial susceptibility testing of a panel of multidrug-resistant Gram-negative bacilli directly from positive blood cultures. **J Antimicrob Chemother,** v. 73, n. 6, p. 1546-1552, Jun 1 2018.

PEREZ, K. K. et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. **Arch Pathol Lab Med,** v. 137, n. 9, p. 1247-54, Sep 2013.

PINA-VAZ, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. Safe susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. **J Med Microbiol,** v. 54, n. Pt 1, p. 77-81, Jan 2005.

PINA-VAZ, C. I. A. et al. **Fluorescent method of detecting microorganisms resistant to a therapeutic agent**. 9,290,790 B2 2012.

PINA-VAZ, C. I. A. et al. **Kit and method of detecting the resistant microorganisms to a therapeutic agent**. WO2012164547 A1 2012.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 12, p. 4281-3, Dec 2013.

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

QUILES, M. G. et al. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. **BMC Infect Dis,** v. 15, p. 283, Jul 23 2015.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. **Molecules,** v. 22, n. 12, Dec 19 2017.

RAMIREZ, M. S. et al. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the Paradigm. **Microbiol Spectr,** v. 2, n. 5, p. 1-15, 2014.

RAMÍREZ, N. et al. Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for a fast microbiological diagnosis. **Biotecnología Aplicada,** v. 26, p. 72-78, 2009.

RAUGEL, P. J. Ranges of Products Manufactured by the Industry and Environment Division of bioMerieux. **Rapid Food Analysis and Hygiene Monitoring**, 1999. Disponível em: < https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-58362-9_9.pdf >. Acesso em: 31/08/2018.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Res Int,** v. 2016, p. 2475067, 2016.

SECO, B. M. S. et al. Improved blood culture workflow for faster identification of KPC-producing Enterobacterales. **Braz J Microbiol,** v. 50, n. 1, p. 127-132, Jan 2019.

SHIRLEY, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs,** v. 78, n. 6, p. 675-692, Apr 2018.

SHRESTHA, N. K. et al. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus by flow cytometry after brief antibiotic exposure. **J Clin Microbiol,** v. 49, n. 6, p. 2116-20, Jun 2011.

SHRESTHA, N. K. et al. Immuno-flow cytometry for the rapid identification of Staphylococcus aureus and the detection of methicillin resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 8, p. 1879-82, Aug 2012.

SILVA, A. P. et al. Rapid Flow Cytometry Test for Identification of Different Carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 6, p. 3824-6, Jun 2016.

SOEJIMA, T.; MINAMI, J.; IWATSUKI, K. The exclusive use of flow cytometry to evaluate the antibiotic-susceptibility. **Biochim Biophys Acta,** v. 1820, n. 12, p. 1980-6, Dec 2012.

STEWART, G. N. The Charges Produced by the Growth of Bacteria in the Molecular Concentration and Electrical Conductivity of Culture Media. **J Exp Med,** v. 4, n. 2, p. 235-43, Mar 1 1899.

TABER, H. W. et al. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. **Microbiol Rev,** v. 51, n. 4, p. 439-57, Dec 1987.

TANG, Y. et al. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. **Anal Chem,** v. 85, n. 5, p. 2787-94, Mar 5 2013.

TRAN, T. B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? **Int J Antimicrob Agents,** v. 48, n. 6, p. 592-597, Dec 2016.

TRENHOLME, G. M. et al. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. **J Clin Microbiol,** v. 27, n. 6, p. 1342-5, Jun 1989.

TUMBARELLO, M.; LOSITO, A. R.; GIAMARELLOU, H. Optimizing therapy in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Curr Opin Infect Dis,** v. 31, n. 6, p. 566-577, Dec 2018.

TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 7, p. 2133-43, Jul 2015.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol Rev,** v. 56, n. 3, p. 395-411, Sep 1992.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev,** v. 16, n. 3, p. 430-50, Jul 2003.

VALE-SILVA, L. A. et al. Comparison of the Etest and a rapid flow cytometry-based method with the reference CLSI broth microdilution protocol M27-A3 for the echinocandin susceptibility testing of Candida spp. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 6, p. 941-6, Jun 2012.

VAN BELKUM, A.; DUNNE, W. M., JR. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 7, p. 2018-24, Jul 2013.

VAN, P. et al. **ggcyto: Next-generation open-source visualization software for cytometry.** Bioinformatics 2018.

VANHOOF, R.; SONCK, P.; HANNECART-POKORNI, E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia. **J Antimicrob Chemother,** v. 35, n. 1, p. 167-71, Jan 1995.

WAITES, K. B. et al. Direct susceptibility testing with positive BacT/Alert blood cultures by using MicroScan overnight and rapid panels. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 7, p. 2052-6, Jul 1998.

WALBERG, M.; GAUSTAD, P.; STEEN, H. B. Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. **J Antimicrob Chemother,** v. 37, n. 6, p. 1063-75, Jun 1996.

WANG, Z. et al. A flow cytometry-based quantitative drug sensitivity assay for all Plasmodium falciparum gametocyte stages. **PLoS One,** v. 9, n. 4, p. e93825, 2014.

WEGNER, D. L.; MATHIS, C. R.; NEBLETT, T. R. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapidly growing blood pathogens. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 9, n. 5, p. 861-2, May 1976.

WEME, E. T. Rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by direct inoculation and reading of disc diffusion tests after 3-4 hours. **APMIS,** v. 126, n. 11, p. 870-876, Nov 2018.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** : Springer-Verlag New York 2016.

_____. **stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations** 2019.

WIMMER, J. L. et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. **J Clin Microbiol,** v. 50, n. 7, p. 2452-4, Jul 2012.

WOLOJ, M. et al. Plasmid-encoded amikacin resistance in multiresistant strains of Klebsiella pneumoniae isolated from neonates with meningitis. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 29, n. 2, p. 315-9, Feb 1986.

ZAHAVY, E. et al. Rapid Antibiotic Susceptibility Determination for Yersinia pestis Using Flow Cytometry Spectral Intensity Ratio (SIR) Fluorescence Analysis. **J Fluoresc**, Aug 16 2018.

ZHANG, L. et al. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 44, n. 12, p. 3317-21, Dec 2000.