

## RAPID POLYMYXIN NP

Deteção da sensibilidade e da resistência das enterobactérias às polimixinas (colónia e hemocultura)

10 testes (REF 23000)



CPB 0405-PT-2018-02

Apenas para diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional  
Os testes são apenas para uso único.

### I - FINALIDADE

O teste rápido de Rapid Polymyxin NP permite detetar a sensibilidade e a resistência das enterobactérias contra as polimixinas (polimixina E ou colistina e polimixina B) a partir de uma cultura bacteriana no meio de gel de agar ou de uma emocultura positiva.

### 2 – INTERESSE

O desenvolvimento de bactérias multirresistentes a várias famílias de antibióticos (denominadas bactérias multirresistentes ou BMR) representa um desafio de saúde pública, reduzindo drasticamente as opções terapêuticas de tratamento e aumentando a taxa de mortalidade em unidades de cuidados intensivos. Entre as BMR, as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ou outras espécies) são a principal fonte de infeções por BMR com bacilos gram-negativos. São responsáveis pela maioria das infeções comunitárias (urinárias, pulmonares, intra-abdominais, sanguíneas) e nosocomiais. Além disso, sua resistência adquirida aos β-lactâmicos penicilinas, cefalosporinas, monobactam) eo amplo espectro de aminoglicosídeos e quinolonas é cada vez mais relatado no mundo. Este desenvolvimento de bactérias BMR reviveu o interesse em antiga classe de antibióticos, polimixinas (polimixina E ou colistina, e polimixina B), que são geralmente considerados moléculas de último recurso.

No entanto, o uso crescente de colistina leva hoje a o surgimento e multiplicação de novas cepas de Enterobactérias multi-resistente à colistina e carbapenems, e constitui uma nova ameaça à durabilidade de um arsenal terapêutico.

O controlo dos impasses terapêuticos eo controlo dos riscos infecciosos em ambientes clínicos, portanto, avaliação rápida da susceptibilidade e perfis de resistência de cepas colistina bacteriana.

Os métodos atualmente disponíveis para esta determinação de sensibilidade ou resistência à colistina não estão adaptadas às necessidades clínico e hospitalar. Eles são considerados tediosos, longos (24h, MIC em meio líquido) ou falta de confiabilidade como o caso métodos de difusão ágar. Teste de Rapid Polymyxin NP define resistência de Enterobacteriaceae com colistina em menos de 3 horas de forma sensível e específica.

Este teste é rápido, fácil de usar, fácil de ler e adaptado a todos os laboratórios de análise. Ele usa um método de detecção de líquido resistência fenotípica, que permite a implementação de local imediato de antibioticoterapia apropriada ou identificação de sujeitos com cepas resistentes à colistina, a fim de limitar riscos de disseminação epidémica.

### 3 – PRINCÍPIO

O teste Rapid Polymyxin NP baseia-se no princípio descrito por Nordmann, Jayol e Poirel (1-2-3).

Este método em meio líquido baseia-se na deteção colorimétrica da metabolização rápida da glicose, ligada ao crescimento bacteriano, na presença de uma concentração definida de colistina.

A acidificação do meio de cultura devida a este crescimento é visualizada pela mudança de cor de laranja para amarelo do indicador de pH (vermelho de fenol).

### 4 – REAGENTES

Descrição	Quantidade
<b>RP NaCl:</b> frasco 3 mL de meio líquido contendo 0,85 g/L de NaCl para a preparação do inoculum	12
<b>RP Medium:</b> frasco de 1,5 mL de meio de cultura para enterobactérias, à base de caldo Mueller-Hinton (25 g/L) ajustado em catiões, de glicose 10 g/L e de vermelho de fenol (50 mg/L) como indicador de pH	10
<b>RP calerias colistina:</b> galeria contendo um poço de controlo negativo C-, um poço de teste contendo colistina em concentração de 2 µg/mL e um poço de Controlo de crescimento bacteriano C+. Galeria condicionada em saqueta de alumínio com dessicante integrado.	10
<b>RP TC (Turbidity Control):</b> frasco de 3 mL de solução de sulfato de bário que serve de piloto de turbidez	1
<b>Closing System:</b> capa protetora da galeria semeada em plástico translúcido	10

### 5 - PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Os reagentes desta caixa são destinados ao diagnóstico *in vitro* unicamente e devem ser manipulados por pessoas autorizadas.

As amostras, culturas bacterianas e os reagentes semeados são potencialmente infecciosos, e devem ser manipulados com as precauções de uso, respeitando as regras de higiene e regulamentação em vigor no país de uso para este tipo de produto.

O uso de um posto de segurança microbiológica (PSM) dado.

Não usar os reagentes para além do prazo de validade.

Os reagentes devem ser armazenados a temperaturas entre +2 e +8°C.

Não usar os reagentes danificados ou mal conservados antes da utilização.

Não usar frascos RP Medium que mostrem sinais de fugas.

Rapid Polymyxin NP traduzem a sensibilidade ou resistência à colistina das estirpes enterobacterianas presentes na amostra, mas não podem servir só por si para executar um diagnóstico clínico. Este deve ser realizado pelo médico em função dos resultados biológicos e dos sinais clínicos.

### 6 - RECOLHA DAS AMOSTRAS

Osmicro-organismos a testar devem ter sido isolados preferencialmente em meios de cultura não-ácida de tipo Luria Bertani, Mueller Hinton, Columbia agar 5% sangue de ovelha, Chocolate agar-Poly/Vitex, Eosin Methylene Blue agar ou geloses cromogénicas. São excluídos da lista desses meios, por exemplo, as geloses de tipo Drigalski. A realização do teste deve ser feita a partir de colónias recém-obtidas (15 h a 24 h de incubação)). As enterobactérias provenientes de amostras de sangue podem ser testadas diretamente a partir de hemoculturas monomicrobianas incubadas sob condições aeróbicas ou anaeróbicas

### 7 - PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes fornecidos estão prontos a usar.

O kit e os reagentes mantidos a +2 +8°C no seu acondicionamento de origem são estáveis até a data de validade indicada na caixa.

Os reagentes RP Medium e RP NaCl são apenas para uso único.

Se o reagente RP TC for utilizado para a calibração de inóculos

Colónias isoladas, deve ser mantido até que o último reagente seja usado RP médio do kit.O reagente RP TC deve ser armazenado a +2 +8°C e protegido da luz.

### 8 - REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Recipientes para resíduos contaminados

Densitómetro

Pipeta e cones

Estufa qualificada a +36°C +/- 2°C

### 9 -MODO DE OPERAR

#### 9.1 TESTE A PARTIR DE COLÓNIAS ISOLADAS EM MEIO GELOSO

O fenótipo da bactéria GRAM negativa deve ser verificado pela realização de uma coloração de GRAM. a partir das colónias identificadas O teste deve ser realizado apenas como sendo de Enterobactérias e excluindo, em especial, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.

Levar os reagentes à temperatura ambiente durante 10 min. Pré-incubar durante 10 min a 37°C o RP Medium.

Retirar o adesivo que cobre a parte inferior da galeria (poços 1, 2 e 3).

#### • Preparação do controlo negativo:

Distribuir no poço C- n.º 1:

-75 µL RP Medium não inoculado

-25 µL de RP NaCl não inoculado

#### • Preparação da suspensão bacteriana no frasco RP NaCl

Picar três ou quatro colónias isoladas idênticas usando um inoculador a µL ou uma pipeta Pasteur entupida. NaCl e homogeneizar completamente.

Descarregar para um frasco RP

#### • Padronização do inoculum:

Recomenda-se fazer a padronização do inoculum usando um densitómetro. Porém, um frasco RP TC é disponibilizado sob condições de boas práticas do utilizador (ver parágrafo *Frasco RP TC*).

#### - Com a ajuda de um densitómetro

Verifique com um densitómetro que a turbidez do meio é inoculada está entre 3 e 3,5 Mc Farland (Mc F). Deve demorar conta o menor valor obtido ao virar a garrafa em o dispositivo. Se o Mc F for inferior a 3 (inóculo insuficiente), volte a encher a garrafa até que um McF entre 3 e 3,5 seja obtido. Se o Mc F é superior a 3,5 (inóculo muito rico), diluído com uma nova garrafa RP NaCl até obter uma opacidade correta. 2 garrafas de NaCl RP itens adicionais são incluídos para este propósito na caixa e devem ser descartado após o uso. Em caso de incompatibilidade entre o frasco RP NaCl fornecido e o densitómetro,

Recomenda-se:

- transferir o conteúdo para um tubo compatível com o dispositivo,

- obter um valor em 0 Mc F,

- em seguida, adicione as colónias até obter um Mc F em 3-3,5.

#### - Em relação ao frasco RP TC

Este método de leitura visual pode ser subjetivo e requer boas práticas de laboratório para garantir a fiabilidade da obtenção de um 3-3,5 Mc F no frasco RP NaCl inoculado.

A fim de garantir a obtenção da densidade ótica esperada do frasco RP NaCl inoculado em comparação ao distúrbio do RP TC fornecido, é necessário validar o processo de realização do distúrbio do inoculum.

#### Metodologia:

Ajustar a opacidade do meio semeado à do controlo de turbidez

RP TC com a ajuda das linhas pretas da etiqueta do frasco. Se necessário ajustar o distúrbio, operar conforme indicado anteriormente.

### - Preparação do inoculum no RP Medium e distribuição na galeria:

- Transferir 500 µL de RP NaCl semeado no frasco RP Medium.

- Homogenizar e distribuir bem o RP Medium RP semeado:

- 100 µL no poço Teste n.º 2 (contendo a colistina)

- 100 µL no poço n.º 3 de controle de crescimento bacteriano C+ (sem colistina)

Tapar a galeria, fixando a tampa "closing system".

Identificar a galeria com as referências da amostra testada.

Incubar a galeria a +36 +/- 2°C durante 2 a 3 horas.

Uma primeira observação pode ser feita após 2 horas de incubação (ver

condição de leitura e interpretação do resultado final, parágrafo 10 - Leitura

e interpretação).

### 9.2 TESTE A PARTIR DO CALDO DE HEMOCULTURA POSITIVO

O teste deve ser realizado apenas a partir de uma hemocultura monomicrobiana positiva contendo uma Enterobactéria (excluindo, em particular, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*) identificada por MALDI TOF.

Trazer os reagentes à temperatura ambiente (+18 +25°C) durante 10 min.

Pré-incubar o RP Medium durante 10 min. a 37°C.

Retirar o adesivo que cobre a parte inferior da galeria (poços 1, 2 e 3).

#### Preparação do controlo negativo:

7

**Preparação da suspensão bacteriana no frasco RP NaCl:** transferir 300 µL de hemocultura positiva monomicrobiana para o frasco RP NaCl Misturar bem.

#### Preparação do inoculum no RP Medium e distribuição na galeria:

Transferir 500 µL de RP NaCl semeado no frasco de RP Medium Misturar

bem e distribuir o RP Medium semeado:

- 100 µL no poço Teste n.º 2 (incluindo a colistina)

- 100 µL no poço n.º 3 de controlo de crescimento bacteriano C+ (sem colistina)

Tapar a galeria, fixando a tampa "closing system". Identificar a galeria com a amostra testada.

Incubar a galeria a +36 +/- 2°C durante 2 a 4 horas. Uma primeira observação pode ser feita após 2 horas de incubação (ver condição de interpretação do resultado final, parágrafo 10 - Leitura e interpretação).

### 10 - LEITURA E INTERPRETAÇÃO

A leitura dos resultados baseia-se na identificação e comparação da cor do poço de teste com as dos poços C + e C-.

#### Controlo de leitura negativa (poço de controlo negativo bem C- n.º 1):

O poço de controlo negativo n.º 1 (C-) tem a cor inicial (laranja) do meio. A apreciação de uma mudança de cor do poço de teste é feita em relação a este controlo.

Se o poço C- tem uma cor amarela, é inválido. Neste caso, não interpretar o resultado e repetir o teste.

#### Validação (poço controlo positivo C + n.º 3):

Verificar se o meio correspondente ao controlo de crescimento bacteriano (C+) ficou amarelo.

#### Leitura e interpretação do poço Teste n.º 2:

Uma mudança na cor do meio, inicialmente laranja, para amarelo/laranja ou amarelo, indica a capacidade da estirpe de se desenvolver na concentração de 2 µg/mL de colistina.

Por outro lado, a ausência de mudança de cor do meio indica que o desenvolvimento da estirpe foi inibido na concentração de 2 µg/mL de colistina.

#### • Inoculum de colónias isoladas

Efetuar uma primeira observação após 2 horas de incubação.

Se o poço de controlo positivo C+ (poço n.º 3, controlo de crescimento bacteriano) mostrar passagem ao amarelo, então efetuar uma leitura do poço de teste (poço n.º 2):

1/se o poço de TESTE estiver amarelo (ou amarelo/laranja e de cor mais clara) do que o poço de controlo C- (poço n.º 1) então a estirpe é resistente à colistina

2/ se o poço de TESTE estiver laranja (com intensidade de cor laranja igual ao poço C- N.º 1) então reincubar a galeria por 1 hora para realizar uma nova leitura. O resultado definitivo é dado após 3 h de incubação.

#### • Inoculum de hemoculturas positivas

Efetuar uma primeira observação após 2 horas de incubação

Se o poço de controlo positivo C+ (poço n.º 3, controlo de crescimento bacteriano) mostrar passagem ao amarelo, então efetuar uma leitura do poço

Teste (poço n.º 2):

1/ Se o poço de TESTE estiver amarelo (ou amarelo/laranja) e de cor mais clara do que o poço de controlo negativo C-) (poço n.º 1) então a estirpe é resistente à colistina

2/ se o poço de TESTE estiver laranja (com intensidade de cor laranja igual ao poço C- N.º 1) então reincubar a galeria por 2 horas para realizar uma nova leitura. O resultado definitivo é dado após 4 h de incubação.

Nenhuma concentração crítica está atualmente disponível de acordo com o referencial CLSI (4-5) para enterobactérias. As estirpes são, portanto, descritas como sensíveis ou resistentes à colistina de acordo com os critérios de interpretação recomendados pelo padrão EUCAST (6):

-uma estirpe de enterobactéria de MIC com colistina ≤ 2 µg/mL é definida como sensível (crescimento bacteriano inibido, coloração laranja do meio).

-uma estirpe de enterobactéria de MIC com colistina MIC >2 µg/mL é categorizada como resistente (crescimento bacteriano não inibido; coloração amarela/laranja ou amarela do meio).

### 11 - CONTROLO DE QUALIDADE

Um controlo do teste pode ser realizado com estirpes de recolha:

- *Escherichia coli* ATCC 25922, estirpe **sensível** à colistina após 2h de incubação (poço C-laranja, **depois TESTE laranja**, depois C+ amarelo) - *Proteus mirabilis* ATCC 25933, estirpe **resistente** à colistina após 2h de incubação (poço C- laranja, **poço TESTE amarelo**, poço C+ amarelo)

- *Escherichia coli* NCTC 13846 (mcr1 positivo), estirpe **resistente** com colistina após 2h de incubação (poço C- laranja, **poço TESTE amarelo**, poço C+ amarelo).

### 12 - CAUSAS DE ERROS - CASOS ESPECIAIS

A inoculação dos poços deve ser feita dentro de 60 min. após a conclusão da suspensão bacteriana à turbidez de Mc F 3-3,5 no reagente RP NaCl.

A alteração da cor do controlo positivo (poço n.º 3) da galeria antes das 2 horas de incubação não significa que os resultados dos poços de teste sejam interpretáveis.

A leitura prematura, antes das 2 horas de incubação recomendadas, pode levar a um resultado erróneo: uma falsa sensibilidade à colistina para uma estirpe resistente.

Se o controlo positivo da galeria (poço n.º 3) não mostrar a passagem à cor esperada (amarelo), então nenhum poço pode ser interpretado. Um novo teste deve ser executado.

É imperativo não exceder os tempos de incubação para a leitura dos resultados finais: respetivamente **3 h para testes realizados a partir de inoculum de colónias isoladas e 4 h para aqueles feitos a partir de hemoculturas positivas..**

**Para as hemoculturas, é imperativo respeitar o tempo de incubação recomendado de 2h a 4h.**

A presença simultânea de uma estirpe suscetível e uma estirpe resistente de uma mesma espécie de enterobactéria no caldo de hemocultura não oculta a deteção da estirpe resistente.

A presença de uma estirpe enterobacteriana sensível à colistina pode mascarar a deteção da resistência de outra espécie de enterobactéria naturalmente resistente e simultaneamente presente no caldo da hemocultura.

As amostras de sangue devem ser testadas a partir de hemoculturas monomicrobianas.

### 13 - LIMITAÇÕES DO MÉTODO

As colónias bacterianas a testar não devem ter sido isoladas em geloses de agar, cujo princípio é a revelação da acidificação do meio (por exemplo, Drigalski, Bromocresol purple (BCP) e MacConkey), que não é adequada para a realização do teste Rapid Polymyxin NP. É essencial efetuar previamente um transplante num meio adequado (ver parágrafo 6 - Recolha de amostras).

No caso de inoculação a partir de hemoculturas positivas, a sedimentação dos glóbulos vermelhos no fundo dos poços não interfere com a leitura e interpretação da mudança de cor.

Para o teste a partir de colónias isoladas, o respeito por uma inoculação do teste a partir de um inoculum padronizado entre 3 e 3,5 McF garante o desempenho do teste.

O limite de deteção (ou sensibilidade analítica) é de 10<sup>7</sup> CFU/mL; isto corresponde à carga bacteriana mínima necessária para a deteção de estirpes resistentes à colistina numa amostra de sangue. Uma densidade bacteriana inferior a 10<sup>7</sup> CFU/mL no caldo da hemocultura pode apresentar resultados falsamente negativos.

### 14 - DESEMPENHOS

#### 14.1 DESEMPENHO DO TESTE DE COLÓNIAS ISOLADAS

A avaliação dos desempenhos do teste Rapid Polymyxin NP foi realizada na Unidade de Resistência Antibiótica Emergente (INSERM, Faculdade de Ciências da Universidade de Fribourg, Suíça), em relação ao método de determinação das concentrações mínimas inibidoras (MIC) em meio líquido (microdiluição em caldo Mueller-Hinton, ajustada usada conforme descrito na diretriz Clinical Laboratory Standard Institute (4-5), referida como o método de referência.

As bactérias do estudo vêm de várias amostras clínicas de origem internacional e são divididas de acordo com as seguintes espécies:

Espécie	Número testado	Espécie	Número testado	Espécie	Número testado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	113	<i>Enterobacter absuriae</i>	2	<i>Proteus stuartii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	40	<i>Morganella morganii</i>	2	<i>Proteus vulgaris</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	<i>Proteus mirabilis</i>	2	<i>Salmonella concord</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	8	<i>Proteus rettgeri</i>	2	<i>Salmonella isangi</i>	1
<i>Citrobacter koseri</i>	8	<i>Salmonella enterica</i>	2		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	<i>Serratia marcescens</i>	2		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	<i>Salmonella sp.</i>	2		

219 estirpes de Enterobactérias foram selecionadas a partir das espécies mais representativas de enterobactérias, compreendendo 78 estirpes sensíveis e 141 estirpes resistentes à colistina.

Entre as estirpes resistentes, vários mecanismos moleculares de resistência às polimixinas são observados (cromossômicos, plasmídicos, intrínsecos ou não determinados).

Os MIC das estirpes à colistina e o seu mecanismo de resistência repartem-se como se segue:

MIC (µg/mL)	0,125	0,25	0,5	<1	1	2	4	8	16	>16	32	64	128	>128
Número de estirpe	9	1	1	60	3	4	8	18	19	10	21	33	20	12

Mecanismos de resistência			Número de estirpe
<b>Resistência intrínseca (natural)</b>			10
<b>Resistência adquirida</b>	cromossômica	heterorresistência	2
		mutação do gene MgrB	70
		Mutação do gene PhoP ou Q	2
		mutação do gene PmrA ou B	10
	plasmídico	mutação do gene mcr -1	30
<b>Mecanismo desconhecido</b>			17

As estirpes bacterianas foram re-isoladas em agar (Luria Bertani, Mueller Hinton, Columbia 5% de sangue) durante 18-24h para testar o Rapid Polymyxin NP em paralelo com a determinação dos MIC pela técnica de microdiluição líquida do CLSI.

O teste Rapid Polymyxin NP foi interpretado após 2h e 3h de incubação. A percentagem de concordância clínica do teste Rapid Polymyxin NP é de 97,7% em comparação com o método de MIC em meio líquido. A sensibilidade do teste é de 99,3% e a especificidade é de 94,9%.

Notam-se 4 Principais Discordâncias (DM) (MIC entre 1 e 2 mg/L) e uma Discordância Muito Grande (DTM) (estirpe *Klebsiella pneumoniae* de MIC 8 mg/L cujo mecanismo de resistência não é conhecido). A percentagem de concordância clínica, a perto de 1 diluição, é de 99,1%. Persiste 1 DM e 1 DTM.

Em relação ao tempo de incubação, todas as estirpes apresentaram resultado interpretável em 2h. Além disso, o perfil das estirpes sensíveis é estável mesmo após 3 horas de incubação.

## 14.2 DESEMPENHO DO TESTE A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS

Desempenhos globais obtidos combinando os dois tipos de protocolos de hemocultura:

Desempenhos	Hemocultura clínicas	Hemoculturas enriquecidas*	Global
<b>Sensibilidade</b>	66,7%	98%	<b>96,3%</b>
<b>Especificidade</b>	100%	100%	<b>100%</b>

\*enriquecidas: hemoculturas suplementadas com estirpes de enterobactérias sensíveis ou resistentes à colistina

## • Desempenhos dos testes realizados a partir das hemoculturas clínicas positivas

27 hemoculturas clínicas positivas contidas em frascos de culturas aeróbicas e anaeróbicas (BD BACTEC™ Plus Aerobic/F e Plus Anaeróbico/F) a partir de amostra de paciente não duplicada, foram detetadas pelo automático Becton Dickinson FX e analisadas pelo CHUV Lausanne, Suíça, Pr. G. Greub.

A distribuição das espécies testadas é de 19 *Escherichia coli*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Proteus mirabilis* e 1 *Serratia marcescens*.

Duas estirpes de resistência natural à colistina (*Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*) deram resultados positivos consistentes nas 4 horas de incubação para cada condição de cultura aeróbica e anaeróbica.

Uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* resistente à colistina (MIC = 8 mg/L) não foi detetada (resultado falso negativo) dentro de 4 horas da incubação do teste.

Para hemoculturas clínicas, a sensibilidade do teste é de 66,7% e a especificidade é de 100%.

A densidade bacteriana de todos os caldos de hemoculturas testados neste estudo foi  $\geq 10^7$  CFU/mL, com a exceção de dois frascos anaeróbicos a  $10^6$  CFU/mL.

## • Desempenhos dos testes realizados a partir de hemoculturas enriquecidas:

Para testar estirpes mais resistentes, um protocolo de hemocultura enriquecida foi estabelecido pelo CHUV.

Nas 72 estirpes testadas, 51 estirpes resistentes continham diferentes genótipos de resistência à colistina e 21 estirpes eram sensíveis. Para cada estirpe, frascos aeróbicos e anaeróbicos foram testados.

Das 51 estirpes resistentes, uma única discordância foi observada com uma estirpe *E. coli* MCR-1 (resultado falso negativo).

Para hemoculturas enriquecidas, a sensibilidade do teste é de 98% e a especificidade é de 100%.

## 15 - ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Os resíduos devem ser eliminados de acordo com as normas e regulamentos de higiene em vigor para este tipo de reagentes no país de utilização.

## 16 - BIBLIOGRAFIA

1 - Nordmann P, Jayol A, Poirel L . 2016. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 22:1038-1043

2 - Nordmann P, Jayol A, Poirel LI, EP15305409.3: «Test for determining susceptibility to resistance to polymyxins in Enterobacteriaceae», 20th March 2015

3 - Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. 2016 Rapid detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures. J Clin Microbiol 54:2273-2277.

4 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 10th ed. Document M07–A10. Wayne (PA): The Institute; January 2015.

5 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th edition. Document M100–28. Wayne (PA): The Institute; 2018.

6 - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, V1.0 mars 2017.

As alterações em relação à versão anterior são destacadas em cinzento.

**ELITech MICROBIO**  
Parc d'activités du Plateau  
allée d'Athènes  
83870 SIGNES  
FRANCE  
☎: 33 (0)4 94 88 55 00  
Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61  
<http://www.elitechgroup.com>

