

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

**Teste rápido de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão
direto do frasco de hemocultura, usando os pontos de corte estabelecidos pelo
EUCAST**

Amanda Silva Martins

Porto Alegre

2019

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

**Teste rápido de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão
direto do frasco de hemocultura, usando os pontos de corte estabelecidos
pelo EUCAST.**

Amanda Silva Martins

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas pela Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Porto Alegre

2019

BANCA EXAMINADORA

Professora Dr^a. Juliana Caierão

Professor Dr^a. Maria Helena Rigatto

Professor Dr. Diego Rodrigues Falci

Professor Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu querido orientador Afonso Barth pelo carinho, ensinamentos e por todo auxílio. Um exemplo de professor e orientador, que tive o orgulho de poder aprender com ele durante este tempo.

A Priscila Lamb Wink, que além de ser minha coorientadora é uma grande amiga esteve presente comigo desde o início do projeto. Quero agradecer teus conselhos, as brincadeiras para descontrair quando eu estava em alguma situação difícil, pelo apoio, paciência e pelas forças em muitos momentos.

A todo o grupo de pesquisa LABRESIS, que faço parte desde quando iniciei a iniciação científica e tenho muito carinho, agradeço a Franciéli Rozales, foi quem me indicou para fazer parte dessa equipe e a todos que passaram por esse grupo de pesquisa, tenho muito carinho e saudades. Em especial a Cibele Magagnin que foi um exemplo de pesquisadora para mim e me ajudou em muitos momentos da minha trajetória.

Não poderia deixar de agradecer a amizade da Fabiana Volpato, que conheci há pouco tempo, obrigada pelo apoio, conselhos e palavras de incentivo quando precisei.

Agradecer as companhias especiais da Evelyn, Helena e Giovanna, que estiveram comigo e me ajudaram a descontrair em vários momentos.

Quero agradecer ao setor de Microbiologia do HCPA, a Larissa, Dariane, Ândrea e toda equipe, por me ajudarem a selecionar os isolados e me auxiliarem durante meu mestrado e a amizade que criei com vocês.

Quero agradecer o apoio e carinho da minha família, ao meu pai Marcelo, minha mãe Carla e Nonno. Sempre me incentivaram, se preocuparam comigo e são minha base. Ao Nonno que muitas vezes me buscava e levava pro Clínicas.

Ao meu namorado Maurício, que esteve do meu lado todos os dias, escutando meus desabafos, quando algo não dava certo, me aconselhando e me ajudando a vencer meus medos e desafios. Eu amo muito vocês.

E por fim, minhas colegas de mestrado, a Janice e a Patrícia pela caminhada juntas e a amizade que fizemos. Desejo muito sucesso pra vocês, ambas merecem o título de Mestre!

RESUMO

O Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST) propôs um teste rápido de suscetibilidade antimicrobiana (RAST) por disco-difusão diretamente de frascos de hemoculturas positivas usando menor tempo de incubação e pontos de corte específicos para a interpretação dos halos de inibição. O objetivo deste estudo foi avaliar essa técnica após 4 e 6 h de incubação para isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* usando os pontos de corte “RAST breakpoints” estabelecidos pelo EUCAST. Um total de 61 isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. oriundos de frascos de hemocultura (BacT/Alert FA Plus) incubadas no sistema BacT/Alert foram avaliados. Os resultados foram interpretados usando os pontos de corte RAST (4-6 h), bem como os pontos de corte convencionais do EUCAST. Foram avaliados os resultados de concordância categórica (CA), erros menores (mE), erros maiores (EM) e erros muito maiores (VME). O índice de PABAK foi utilizado para avaliar a correlação entre a leitura rápida e a leitura convencional. Embora tenha sido possível observar a formação de halos de inibição de *E.coli* e *Klebsiella* spp. após 4 h de incubação, uma observação mais nítida só foi possível após 6 h de incubação. O RAST em 6 h apresentou melhores resultados de concordância e erros categóricos (CA = 94,4%, mE = 4,3%, EM = 0,8% e VME = 0,4%) comparado ao RAST em 4 h (CA = 84,3%, mE = 13,0%, ME = 3,2% e VME = 0,4%). Em 4h, usando pontos de corte convencionais, renderam uma CA, mE e ME de 43,3%, 34,6% e 22,2%, respectivamente. As leituras em 6h, utilizando pontos de corte de referência, indicaram CA, mE e ME de 54,9%, 36,9% e 8,1%, respectivamente. Não foi observado VME em ambos os horários. A interpretação da leitura rápida (4 h ou 6 h) feita com os pontos de corte convencionais apresentaram resultados insatisfatórios. Esses dados indicam que as leituras em 6 h, usando os pontos de corte proposto pelo EUCAST (RAST breakpoints) para todos os antibióticos testados neste estudo (com exceção da amicacina), podem ser usadas no laboratório de microbiologia clínica para antecipar os resultados do TSA das hemoculturas. As leituras realizadas em 4h (RAST breakpoints) também podem ser usadas, mas não para todos os antibióticos.

Palavras-chave: Hemocultura; EUCAST, Disco difusão; Teste rápido de susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

The European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) has proposed a rapid antimicrobial susceptibility test (RAST) by disk diffusion test directly from positive blood culture bottles using specific breakpoints interpretation for a short incubation time. The aim of this study was to evaluate the disk diffusion technique after 4 and 6 h directly from positive blood culture bottles of *Enterobacteriaceae* using the RAST breakpoints established by EUCAST. A total of 61 isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. were selected after the blood culture bottles (containing BacT/Alert FA Plus) flagged positive. The results were assessed using the RAST breakpoints (4–6 h) as well as the standard breakpoints (18 h) from EUCAST. Results of categorical agreement (CA), minor errors (mE), major errors (ME) and very major errors (VME) were evaluated. The PABAK index was used to evaluate the correlation between early and standard readings. The vast majority of the zone diameters of *E. coli* and *Klebsiella* spp. were optimally readable after 6 h of incubation. RAST in 6 h presented best results of categorical concordance and errors (CA = 94.4%, mE = 4.3%, ME = 0.8%, and VME = 0.4%) compared to RAST in 4 h (CA = 84.3%, mE = 13.0%, ME = 3.2%, and VME = 0.4%). Readings at 4h using reference breakpoints rendered CA, mE, and ME of 43.3%, 34.6%, and 22.2%, respectively. No VME were observed. Readings at 6h using reference breakpoints indicated CA, mE, and ME of 54.9%, 36.9%, and 8.1%, respectively. No VME were observed. The interpretation of rapid readings (4–6 h) with the conventional breakpoints presented unsatisfactory results. These data indicate that the early readings in 6 h using the RAST breakpoints for all antibiotics tested in this study (except amikacin) may be used in the clinical microbiology laboratory to anticipate the AST results of blood cultures. Early readings at 4 h (RAST breakpoints) may also be used, but not for all antibiotics.

Keywords: Blood culture; EUCAST, Disk Diffusion; Rapid antimicrobial susceptibility test

LISTA DE ABREVIATURAS

TSA: Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (*Antimicrobial Susceptibility test - AST*)

AIT: Área de Incerteza Técnica (*Area of Technical Uncertainty - ATU*)

BrCAST: *Brazilian Committee on antimicrobial Susceptibility Testing*

CA: Concordância de Categoria (*Categorical agreement - CA*)

CLSI: *The Clinical & Laboratory Standards Institute*

DD: Teste de Disco Difusão

dRAST: *Direct and Rapid Antimicrobial Susceptibility Test*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

ESCMID: *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

EUCAST: *European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA: *Food and Drug Administration*

mE: Erro Menor (*Minor Error*)

ME: Erro Maior (*Major Error*)

MH: Ágar Mueller-Hinton

NACs: National AST Committees

PABAK: *Prevalence-Adjusted and Bias-Adjusted- Kappa*

CQ: Controle de Qualidade (*Quality Control-QC*)

RAST: *Rapid Antimicrobial Susceptibility Test*

VME: Erro Muito Maior (*Very Major Error*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
	2.1 Sepsis	10
	2.2 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	12
	2.2.1 Pontos de corte e interpretação.....	14
	2.2.2 Critérios de exatidão do TSA.....	15
	2.3 Instituições internacionais de padronização do TSA.....	16
	2.4 Leitura rápida do TSA.....	18
	2.5 Teste direto de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	18
	2.6 TSA rápido direto de frascos de hemoculturas.....	20
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVO.....	21
	4.1 Objetivos específicos.....	21
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
6	ARTIGO.....	27
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos principais desafios para os laboratórios de microbiologia é obter resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) de forma mais ágil e rápida que o convencional (16-20 h). Embora existam equipamentos que auxiliam no processo de identificação e no perfil de suscetibilidade bacteriana, ainda há muitos procedimentos que são realizados manualmente e precisam de testes complementares que requerem tempo.

Nos laboratórios de microbiologia de rotina existem diversos métodos *in vitro* para a determinação da suscetibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos. Estes métodos incluem disco difusão (antibiograma ou Kirby-Bauer), fita de gradiente (Etest[®], MICE[®] etc.), microdiluição em caldo e sistemas automatizados para teste de suscetibilidade (1). O teste de disco difusão (DD), descrito por Bauer e colaboradores em 1966, é considerado o método mais utilizado para a determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos (2). O DD tem como vantagem seu baixo custo, a simplicidade da técnica e a fácil visualização fenotípica do crescimento bacteriano (3,4). Contudo, como o DD somente pode ser realizado após o crescimento bacteriano, um resultado de identificação da bactéria e de sua suscetibilidade aos antimicrobianos necessita, pelo menos, dois dias após a cultura primária do material clínico.

No passado, estudos foram realizados propondo a leitura rápida do teste de DD, indicando que seria possível observar crescimento bacteriano em períodos mais curtos de incubação, no entanto, estes estudos não propuseram pontos de cortes específicos para leituras mais rápidas que fossem padronizados (5,6). Com a necessidade de liberar um pré-resultado para o clínico, muitos laboratórios acabam realizando leituras em tempos mais curtos, quando a visualização do crescimento bacteriano é possível, e utilizam os pontos de corte convencionais (16-20 h) para as interpretações. Assim, o revés para realização das leituras mais rápidas dos halos de inibição do teste de DD é não haver padronização de pontos de corte específicos para esta metodologia.

O resultado do TSA bem como da detecção de eventuais mecanismos de resistência da bactéria são importantes para a escolha do tratamento adequado ao paciente. Atualmente, há dois grupos internacionais responsáveis pela definição de padrões e normas do teste de suscetibilidade que possuem diretrizes publicadas e pontos de corte estabelecidos, o *The Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (7,8).

Infelizmente, os pontos de corte para leituras convencionais do TSA, propostos por estas organizações, podem diferir entre eles, podendo estorvar microbiologistas, clínicos e fabricantes de dispositivos para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (9). No Brasil, a interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos deve ser realizada de acordo com os documentos do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), a versão brasileira do EUCAST, conforme estabelecido pela Portaria 64 de 11/12/2018 do Ministério da Saúde (10).

Em 2014, o CLSI formou um grupo de trabalho para tratar da padronização do TSA direto de hemocultura e leitura em menor tempo do teste de DD, porém não obtiveram bons resultados (11). Em 2018, o EUCAST oficializou uma nova padronização de TSA direto de hemocultura e pontos de corte para leituras em 4, 6 e 8 horas. O método foi validado para as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e para *Acinetobacter baumannii* (12).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o TSA pela técnica de DD após 4 e 6 h de incubação direto de hemoculturas positivas de duas espécies da família *Enterobacteriaceae* usando os pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST para a leitura rápida (RAST - *Rapid Antimicrobial Susceptibility Test breakpoints*).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sepsis

A sepsis, é compreendida como uma inflamação sistêmica grave. Caracteriza-se por um desbalanceamento hemodinâmico frente a agentes infecciosos e liberação exacerbada de mediadores inflamatórios na circulação sanguínea. A sintomatologia da resposta séptica é decorrente da resposta imune, porém há uma complexa interação entre processos inflamatórios, coagulantes e fibrinolíticos, que ocorre em resposta a infecção bacteriana. O início desses três processos simultaneamente pode desencadear disfunção endotelial, falência múltipla dos órgãos culminando e se não houver tratamento, com o óbito (13-15).

O primeiro estudo brasileiro de grande porte abordando este tema foi o *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES), que traçou o perfil de pacientes admitidos nas

UTI das regiões Sul e Sudeste, foi observada uma incidência de 30,5% de pacientes internados com sepse, e foi estabelecido que a diferença da taxa de sobrevivência entre os pacientes sépticos e não sépticos após 28 dias de internação foi de 66% e 88%, respectivamente (16).

Em 2017, dados epidemiológicos da sepse em unidades de terapia intensiva brasileira mostraram que a incidência, prevalência e mortalidade de sepse tratada em UTI são altas no Brasil, resultando em uma estimativa de mais de 200 mil mortes em pacientes adultos com sepse tratada por ano. Os dados sobre sepse dos países de renda média, como o Brasil são poucos documentados e é de extrema importância identificar o efeito da sepse nesses locais. É necessária a atenção em ambientes com recursos limitados para estabelecer medidas preventivas para reduzir esse ônus e estabelecer iniciativas de melhoria da qualidade que visam reconhecer a sepse mais cedo e sugerir tratamento adequado (17).

Dados do Instituto Latino Americano da Sepse mostram que a taxa de mortalidade relacionada à sepse, nos hospitais privados e públicos brasileiros, variam de 30% a 70%, respectivamente (17,18). Fatores relacionados à mortalidade incluem o tratamento antimicrobiano inadequado ao agente infeccioso e a demora em iniciar a antibioticoterapia. Há, portanto, a clara necessidade de identificação rápida do agente infeccioso bem como a determinação do seu perfil de suscetibilidade *in vitro*, visto que a rapidez da emissão desses resultados para o clínico está diretamente relacionada ao prognóstico do paciente (19,20).

A hemocultura é o padrão-ouro para o diagnóstico microbiológico de bacteremia, sua importância é inquestionável quando obtemos, através delas, o microrganismo causal e a sua susceptibilidade aos antimicrobianos (21). A hemocultura depende da multiplicação de bactérias nos frascos, detectada quando um determinado valor de corte relacionado ao metabolismo e o número de microrganismos é alcançado e da necessidade de um tempo mais prolongado para a obtenção dos resultados. Porém é o método que está disponível na grande maioria dos laboratórios de rotina dos hospitais (21-23).

As diretrizes para tratamento da sepse indicam que os pacientes devem iniciar tratamento empírico o mais breve possível conforme os dados epidemiológicos locais (normalmente disponibilizados pelas Comissões de Controle de Infecção Hospitalar da instituição). Quando identificado o agente infeccioso, o tratamento deve ser ajustado utilizando-se o antimicrobiano mais adequado, de menor espectro, conforme o perfil de

suscetibilidade *in vitro*. O risco desta estratégia é o emprego excessivo de antimicrobianos. Além disso, o aumento da utilização de antibióticos de amplo espectro no tratamento empírico pode acarretar na elevação de custos e no aumento de resistência bacteriana (24,25).

Assim, para a obtenção de melhores resultados no tratamento de pacientes sépticos, bem como para diminuição de custos, é necessário otimizar o uso de antimicrobianos. Nesse aspecto, merece destaque a estratégia de descalonamento e a monitorização da adequabilidade antibiótica. O descalonamento antibiótico é definido como estreitamento do espectro antimicrobiano orientado pela suscetibilidade *in vitro* do patógeno, diminuindo as possibilidades de gerar resistência bacteriana. Assim que possível, portanto, deve-se limitar o espectro antibiótico, levando em conta a condição clínica do paciente, a suscetibilidade aos antimicrobianos não somente do patógeno causador da sepse, mas também de eventuais outros patógenos identificados nos resultados das culturas bacteriológicas do paciente. Outro aspecto importante a ser considerado é a suspensão total do uso de antibiótico quando não houver confirmação de infecção bacteriana (26).

Em termos dos agentes etiológicos, tanto bactérias Gram-negativas como Gram-positivas estão implicadas. No maior estudo brasileiro já publicado, contando com 75 UTIs, os bacilos Gram-negativos representaram a maior parte dos casos (cerca de 70%), em que o agente foi identificado, seguidos dos cocos Gram-positivos (cerca de 30%), especificamente *Staphylococcus aureus* (27).

2.2 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

A escolha do antibiótico mais adequado deve levar em conta a informação obtida nos testes de sensibilidade após o isolamento e caracterização do agente etiológico. O TSA determina o perfil de sensibilidade de uma determinada bactéria frente aos antimicrobianos de escolha e é indicado para microrganismos que podem desenvolver resistência adquirida aos agentes antimicrobianos geralmente utilizados no tratamento de infecções por aquela determinada bactéria (1,7).

Diversos métodos podem ser empregados para a avaliação da suscetibilidade *in vitro* do microrganismo aos antimicrobianos. Os principais testes de suscetibilidade convencionais podem ser divididos em testes qualitativos, sendo o método de DD

(Kirby-Bauer) o mais amplamente difundido e utilizado nos laboratórios de microbiologia; e os testes quantitativos como o teste com fita de gradiente de concentração e os testes de diluição em caldo (macrodiluição ou microdiluição). Embora os métodos quantitativos sejam técnicas que geram informações mais precisas (determinam a concentração inibitória mínima – CIM – do antibiótico), a diluição em caldo e a fita de gradiente são de maior custo e muito trabalhosos, respectivamente.

O método de DD foi idealizado por Bauer *et al* em 1966 e é um método prático, eficiente e os materiais de consumo apresentam baixo custo, além de apresentar boa flexibilidade para a escolha dos antimicrobianos (2). O teste de DD é o mais utilizado nos laboratórios de microbiologia mundialmente e, por ser um método é qualitativo, permite classificar a bactéria como “sensível (S)”, “sensível aumentando a exposição (I)” ou “resistente (R)” ao antimicrobiano. O princípio do teste por DD baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano, com determinada concentração, impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano pode levar à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM). Um dos aspectos que influencia o tempo (e a precisão) do antibiograma através da técnica de DD é a leitura, a qual normalmente é feita de forma manual com auxílio de uma régua ou paquímetro, e interpretação dos halos de inibição (7).

Um aspecto negativo bastante importante em relação aos testes de suscetibilidade convencionais (DD, testes de diluição e fita de gradiente) é que esses testes necessitam de 16 a 24 horas, após o isolamento bacteriano em cultura pura, para que possam ser lidos e interpretados. Isso faz com que o resultado do TSA convencional somente esteja disponível para ser avaliado pelo clínico após o início da antibioticoterapia no paciente com o processo infeccioso.

Existem métodos automatizados disponíveis no Brasil - sistemas MicroScan Walkaway[®] (Siemens), Phoenix[®] (BD) e o VITEK[®] (bioMérieux) – os quais tem a capacidade de fornecer o resultado do TSA em menos tempo (3 a 7 horas) que os testes convencionais. O resultado rápido é possível porque os métodos automatizados mencionados acima não utilizam técnicas de difusão do antibiótico, mas sim concentrações pré-definidas do mesmo em um sistema fechado (poços em cartões de acrílico, por exemplo). O crescimento (ou ausência de) bacteriano no poço com antimicrobiano é monitorado através da avaliação de densidade ótica por fotometria. Como a medida por fotometria é mais sensível que a avaliação pelo olho humano o

resultado da suscetibilidade ao antibiótico é agilizado. Os sistemas automatizados acima citados, no entanto, apresentam alto custo seja para a aquisição do equipamento ou mesmo para os reagentes de consumo o que inviabiliza sua utilização em laboratórios de pequeno porte (28,29).

Existem equipamentos semi-automatizados os quais facilitam e agilizam a leitura do teste de DD (sistemas Osiris[®] e Adágio[®] - Bio-Rad; sistema Biomic[®] - Liofilchem). Estes equipamentos normalmente se baseiam na utilização de um sistema de digitalização da placa do teste de suscetibilidade por DD. A imagem da placa de antibiograma com os discos de antibióticos é processada em software o qual permite estimar, de forma quase instantânea, as zonas de inibição em milímetros. Conforme estudos já realizados com o sistema Osiris[®] em relação à leitura manual do teste de DD, foi demonstrado que esse equipamento é uma ferramenta rápida, de fácil manuseio e confiável para medir os halos em torno dos discos na placa de antibiograma (30,31).

Outros métodos que têm a capacidade de avaliar se não a suscetibilidade, mas sim a resistência aos antimicrobianos são os testes genotípicos, os quais têm a vantagem de liberar os resultados em poucas horas após o crescimento bacteriano. A desvantagem destes métodos é seu alto custo, sua baixa flexibilidade e, como mencionado, o fato que não avaliam a suscetibilidade, mas apenas a presença de genes de resistência bacteriana (32).

Uma forma de tentar diminuir o tempo do TSA seria realizá-lo diretamente do material biológico, mas esse tipo de metodologia não é padronizado principalmente por ser influenciada por interferentes extrínsecos da amostra clínica. Outra forma de diminuir o tempo do TSA por DD seria ler os resultados dos halos de inibição assim que os mesmos se tornassem visíveis e não somente após a incubação por tempo padronizado (16-20 h). Em ambos os casos acima, seria necessária a padronização tanto da técnica de confecção do teste por DD bem como de eventual ajuste dos pontos de corte dos halos de inibição formados na leitura rápida.

2.2.1 Pontos de corte e interpretação

Os pontos de corte são medidas numéricas usadas para definir a suscetibilidade e a resistência dos antibióticos a partir da medida do diâmetro do halo de inibição dos

discos de papel de filtro impregnados com antimicrobianos no teste de DD ou a partir da CIM nos testes quantitativos (33).

Conforme o EUCAST/BrCAST, um microrganismo é categorizado como “Sensível” quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dosagem padrão do agente antimicrobiano. Um microrganismo é categorizado como “Sensível aumentando a exposição” quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição foi aumentada ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção. Um microrganismo é categorizado como “Resistente” quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo com o aumento da exposição (7,12,34). Além destas interpretações, recentemente foi estabelecido o conceito de “Área de Incerteza Técnica” (AIT) que indica intervalos (tanto no teste de DD como nos testes quantitativos) os quais não podem ser interpretados de forma confiável. A AIT serve para advertir o laboratório sobre a incerteza do resultado do TSA onde a interpretação é duvidosa sendo que o laboratório deve repetir o teste, realizar um teste alternativo e reportar como resultado duvidoso, ou mesmo como “Resistente” (no caso de existir outras alternativas de antibióticos classificados como “Sensíveis”). O EUCAST estabeleceu para a ordem *Enterobacterales* que a faixa de AIT seja idêntica a faixa que classifica o isolado como “Sensível aumentando a exposição” e somente para os antibióticos Amoxicilina, Ácido Clavulânico, Piperacilina-tazobactam, Ceftarolina e Ciprofloxacino. Os demais antibióticos não apresentam valores para a AIT para *Enterobacterales* (12).

2.2.2 Critérios de exatidão do TSA

Food and Drug Administration (FDA) é um órgão Estadunidense que estabelece critérios de exatidão (desempenho, reprodutibilidade e controle de qualidade) para testes laboratoriais, o que inclui o TSA. Nos dados comparativos de desempenho de uma nova metodologia de TSA, por exemplo, devem ser considerados diversos parâmetros como a Concordância de Categoria (*Categorical Agreement*, CA), o Erro Menor (*Minor Error*, mE), Erro Maior (*Major Error*, ME) e o Erro Muito Maior (*Very Major Error*, VME). A CA é a comparação do método teste com o método de referencia em relação à classificação da categoria de interpretação (“Resistente”, “Sensível aumentando a exposição” ou “Sensível”). Quando os resultados do método teste forem divergentes em

relação às categorias de suscetibilidade do método referência, os mesmos são classificados conforme abaixo:

- mE: quando o resultado de suscetibilidade do método teste for categorizado como “I” e o método padrão for categorizado como “S” ou “R” e vice-versa.
- ME: indica falsa resistência, ou seja, quando o método teste for categorizado como “R” e o método padrão for “S”.
- VME: indica falsa sensibilidade, ou seja, quando o resultado produzido pelo método teste for categorizado como “S” mas no método padrão for “R”.

O FDA considera como desempenho aceitável para os dados clínicos quando os resultados apresentarem $CA \geq 90\%$, $mE \leq 10\%$, $ME \leq 3\%$ e $VME \leq 1,5\%$ (34).

2.3 Instituições internacionais de padronização do TSA

A adoção de diretrizes para o TSA nos EUA é sempre regulamentada pelo FDA, sendo o CLSI aceito como padronização para todo o território Norte Americano. De fato, o CLSI é a instituição de padronização do antibiograma que sempre teve a maior abrangência mundial. Porém, o instituto americano possui como principal problema ser utilizado em laboratórios de microbiologia com menores recursos econômicos, os custos de acesso aos documentos das padronizações. Para ter acesso às padronizações que são atualizadas anualmente há a necessidade de pagamento de US \$350 para membros do CLSI em torno de US \$500 para não-membros, sendo um problema para muitos laboratórios de microbiologia. Além disso, existe a possibilidade de influência direta da indústria farmacêutica no estabelecimento das diretrizes bem como na determinação dos pontos de corte visto que membros da indústria fazem parte do CLSI (9).

Alguns países europeus criaram seus próprios institutos de padronização sendo que em muitas situações os pontos de corte para interpretação do TSA eram diferentes devido a variações de metodologias utilizadas nesses países (35).

Em 1997 foi criado, a partir da união de vários comitês nacionais europeus, o “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” com o objetivo de unificar a padronização europeia do TSA. O EUCAST é um comitê referendado pela “*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*” (ESCMID) e pelo

“*European Centre for Disease Prevention and Control*” (ECDC) e tem como um dos principais objetivos estabelecer e revisar os pontos de corte de interpretação do TSA os quais se baseiam em estudos de farmacocinética e farmacodinâmica bem como em dados epidemiológicos. Assim como o CLSI, o EUCAST faz atualizações anualmente, porém as normas e documentos com as tabelas de porte de corte, interpretações e dados para interpretações do TSA estão disponíveis gratuitamente no site da instituição (eucast.org). Além disso, a indústria farmacêutica não tem permissão de participação direta nas decisões, tendo apenas a função consultiva. Por serem dados construtivos e confiáveis para executar e interpretar os testes de suscetibilidade antimicrobiana, as normas do EUCAST vêm sendo implementadas por toda a Europa e em muitos outros países fora do continente europeu (9,35).

Em meados de 2010, o EUCAST incentivou os países a formarem os “*National AST Committees*” (NACs), que são comitês específicos dos países que utilizam as normativas do EUCAST para o TSA. Os NACs têm como objetivo auxiliar na formação de estratégias sobre TSA coerentes com as características dos seus países, bem como na implementação de pontos de corte e métodos de avaliação da qualidade.

Os NACs têm como finalidade determinar e rever periodicamente pontos de corte para interpretação dos TSA para uso clínico e com finalidade epidemiológica de acordo com a realidade de cada país, liderar e promover o desenvolvimento e padronização dos testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, liderar e promover o desenvolvimento da garantia e controle da qualidade e da educação e treinamento TSA (36).

O Brasil foi um dos países fora do continente europeu que criou um “NAC”: Devido a necessidade de uma padronização brasileira do TSA foi criado o BrCAST (“*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*”) – Comitê Brasileiro de Teste de Suscetibilidade. O BrCAST foi constituído pelas 4 principais sociedades brasileiras relacionadas a microbiologia, doenças infecciosas e diagnóstico laboratorial: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial) e tem como finalidade padronizar a nível nacional as normas do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos adaptando os conceitos do EUCAST à realidade dos laboratórios de microbiologia no Brasil (36). O BrCAST foi oficialmente estabelecido como a padronização a ser seguida no território nacional a partir da Portaria 64 publicada no Diário Oficial da União em 11 de dezembro de 2018 (10).

2.4 Leitura rápida do TSA

A metodologia padrão utilizada no TSA prevê a leitura do teste de DD, no geral, em 16-20 h o que é um período bastante longo e que poderia afetar as primeiras decisões de tratamento nos estágios iniciais do processo infeccioso (como a sepse, por exemplo). Muitas situações clínicas que necessitam de urgência os resultados laboratoriais se beneficiam se os resultados do TSA estiverem disponíveis mais cedo (6, 37, 38). Alguns estudos avaliaram metodologias de leitura rápida (6 a 8 h) do teste de DD (5,39-42). Entretanto, foi observado que a leitura rápida seria precisa apenas para certos grupos de organismos (39). Em 2018, Weme e colaboradores realizaram um estudo validando o teste de DD direto do frasco de hemocultura e realizando leituras das zonas de inibição do disco em 3 e 4 h. Em 3 h foi possível realizar a leitura somente para 70% das *Enterobacterales*, onde a maioria dos isolados do estudo pôde ser interpretado a partir de 3,5 h. O melhores resultados obtidos de leitura rápida foram para o microrganismo *E. coli*, já para as Gram-positivas, os resultados obtidos foram bons somente após 4 h. Apesar de o estudo ter apresentado bons resultados de uma forma geral, o autor reiterou a necessidade de haver pontos de corte específicos para leituras rápidas, que pudessem ser equivalentes a leituras no horário padronizado de 18 h (43).

2.5 TSA direto de frascos de hemocultura

O teste de DD pode ser realizado diretamente do frasco de hemocultura que indica presença de crescimento bacteriano, pois nesses casos já deve existir dentro do frasco uma quantidade de células bacterianas suficientes para serem semeadas no meio de cultura para realização do teste. Assim, seria evitada a etapa de repique do frasco de hemocultura para meio de cultura sólido para isolamento das colônias bacterianas, o que abreviaria o tempo de liberação do TSA em 16-20 h. Portanto, o teste direto do frasco de hemocultura permitiriam a emissão do resultado da suscetibilidade in vitro em tempo significativamente mais curto (44). Esse tipo de metodologia já foi avaliada em diversos estudos e apesar de apresentar altos índices de concordância de categoria, tem apresentado muitos mE e ME, devido, muito provavelmente, à falta de padronização do inóculo bacteriano (44-50).

Em 1979, Fay *et al* relatou que o uso de um volume de 0,03 mL do frasco de hemocultura com crescimento bacteriano para fazer TSA direto produziu resultados de CA 94,6% aos resultados obtidos pelo método padrão (50). Por outro lado, Menon e colaboradores em 2016, o teste direto de hemocultura, retirando uma gota de sangue e adicionando em 1,8 mL de solução salina a 0,45% (45). Embora o estudo de Menon e colaboradores não tenha avaliado a CA, os autores informaram que os resultados foram satisfatórios em comparação com o método padrão. Outros estudos com teste direto do frasco de hemocultura também descreveram boas taxas de concordância e erros baixos. Deve ser considerado, no entanto, que os estudos utilizaram diferentes técnicas referentes ao preparo do inóculo bacteriano a partir do frasco de hemocultura (44-46).

Em 2012 o EUCAST afirmou que não existem métodos validados com a quantidade correta de inóculo para a realização do teste direto de suscetibilidade de frascos de hemocultura. Seria necessário desenvolver estudos para estabelecer uma técnica padronizada que fosse confiável e reprodutível (45,51).

Em 2018, Chandrasekaran e colaboradores (11) publicaram um trabalho utilizando a metodologia de DD direto do frasco de hemocultura. Os isolados selecionados para este estudo foram Gram-negativos, como *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Serratia marcescens*. Estes microrganismos possuíam resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, também se incluíam bactérias produtoras de ESBL e AmpC, obtendo CA = 87,8%, e apenas 3% de ME. O grupo, em parceria com o CLSI, também tentou realizar leituras mais cedo (6 h), porém obteve resultados não satisfatórios e não aceitáveis de acordo com as recomendações do FDA (CA = 58,9%, VME = 2,2% e ME = 25,4%).

2.6 TSA rápido direto de frascos de hemoculturas

De acordo com os estudos citados acima, ficou demonstrado que seria possível realizar o TSA direto dos frascos de hemocultura tanto para a identificação quanto para determinação do perfil de sensibilidade do microrganismo. No entanto, havia a necessidade de se estabelecer normativas de padronização do TSA direto de hemocultura para que o método pudesse ser considerado reprodutível e ser indicado para realização em laboratórios de microbiologia de rotina.

No final de 2018, o EUCAST publicou uma metodologia padronizando pontos de corte para leituras rápidas de TSA por DD direto de frascos de hemoculturas positivas, o “RAST breakpoints” (*direct and rapid antimicrobial susceptibility test from blood cultures*). Utilizando essa metodologia, o TSA poderia ser realizado direto (e com leituras em 4, 6 e 8 h) de frascos de hemocultura na forma de técnica padronizada (12).

Em 2019, Kahlmeter e colaboradores (ESCMID eLibrary 2019 Multi-laboratory evaluation in southern Europe of the EUCAST method for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures) realizou um estudo entre 40 laboratórios dos países Nórdicos (Dinamarca, Finlândia, Islândia, Noruega e Suécia) utilizando a metodologia RAST para *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (8). Em 6 h todos os halos puderam ser lidos tanto para as amostras Gram-positivas quanto Gram-negativas, porém em 4 h a leitura não foi satisfatória para os bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose e Gram-positivos. Além disso, a leitura em 4 h foi a que mais apresentou AIT. Os “RAST breakpoints” apresentaram-se apropriados para amostras que possuíam um alto grau de resistência.

3 JUSTIFICATIVA

Mundialmente, a sepse é uma das doenças com maior mortalidade. É cada vez mais frequente o protagonismo de microrganismos multirresistentes, ao mesmo tempo em que se esgotam as possibilidades de desenvolvimento de novos antimicrobianos. Dessa forma, otimizar o uso dos antibióticos é extremamente relevante.

O tratamento da sepse seria mais adequado se a escolha inicial do antimicrobiano não fosse baseada apenas em dados epidemiológicos locais, mas também no perfil de susceptibilidade *in vitro* da bactéria, em particular dos bacilos Gram-negativos da Ordem *Enterobacterales*, mais prevalentes em infecções generalizadas e no descalonamento, estreitamento do espectro antimicrobiano orientado pela suscetibilidade do patógeno, diminuindo as possibilidades de gerar resistência bacteriana (18).

O TSA por DD padrão requer entre 16 às 22 h de incubação para ser realizada a leitura dos halos de inibição e esse tempo inviabiliza a informação em tempo hábil para o clínico. Há a necessidade de se obter resultados mais rápidos, mas também confiáveis do TSA direto de frascos de hemocultura positiva, mas seguindo uma metodologia

padrão como o RAST (EUCAST). Além disso, é importante que uma nova metodologia (no caso o RAST) seja testada e validada em comparação com a metodologia padrão e utilizando amostras bacterianas com perfil regional, por tratar-se de estudo unicêntrico, realizado em hospital público, terciário, acadêmico do sul do Brasil.

4 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados do TSA de *Enterobacteriaceae* por DD após 4 e 6 h diretamente de frascos positivos de hemocultura usando os pontos de corte RAST estabelecidos pelo EUCAST.

4.1 Objetivos específicos

- Comparar os pontos de corte para leituras do teste de DD de hemoculturas positivas em 18 h a partir de colônias isoladas com os novos pontos de corte para leitura em tempos mais curtos (4 e 6 h) pelo EUCAST;
- Determinar qual o menor tempo de leitura mais adequado e seguro para o TSA por de DD;
- Validar a nova metodologia (no caso o RAST) em comparação com a metodologia padrão utilizando amostras bacterianas (isolados *E.coli* e *Klebsiella* spp.) de perfil regional, realizado em hospital público, terciário, acadêmico do sul do Brasil.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49:1749–55.
2. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Microbiol.Centen.Perspect.Wash.DC USA: ASM Press.* 1966: 40-45.
3. Stéphanie LP, Gregory D and Jean-Marc R. Evaluation of the Scan®1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique. *J.Antimicrob. Chemother.* 2016; 71:3424-3431.
4. Hombach M, Jetter M, Blöchliger N, Kolesnik-Goldmann N, Böttger EC. Fully automated disc diffusion for rapid antibiotic susceptibility test results: a proof-of-principle study. *J Antimicrob Chemother.*2017; 72:1659-1668.
5. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, Modified Kirby-Bauer Susceptibility Test with Single, High-Concentration Antimicrobial Disks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1973; 3: 418-424.
6. Barry, AL, Joyce LJ, Adams AP, Benner EJ. Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 59: 639-699.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed. CLSI document M23-A2. CLSI, Wayne, PA.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST clinical breakpoints. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ [Acesso 12 de Ago de 2019].
9. Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2016 11; 15:21.
10. Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018. Diário oficial da união. Órgão: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Publicado em: 14/12/2018 | Edição: 240 | Seção: 1 | Página: 59.
11. Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, Hejna J, Walker L, Ammann T, Kirn T, Patel R, Humphries RM. 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.* 2018; 56: e01678-17.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. V 1.1. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_methodology_v1.1_Final.pdf./ May 2019 [Accesso 06 Set 2019].
 13. Clark E, Kumar A, Langote A, Lapinsky S, Dodek P, Kramer A, Wood G, Bagshaw SM, Wood K, Gurka D, Sood MM. Septic shock in chronic dialysis patients: clinical characteristics, antimicrobial therapy and mortality. *Intensive Care Medicine* 42: 222-232, 2016.
 14. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med.* 22(2): 63-72, 2007.
 15. Kourilsky P, Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends in Immunology*, 22: 502-509, 2001.
 16. Silva E, Sogayar AC, Mohovic, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 8(4): 251-60, 2004.
 17. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, Caixeta N, Salomao R, Angus DC, Pontes Azevedo LC; SPREAD Investigators; Latin American Sepsis Institute Network. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (The Sepsis Prevalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(11):1180-9.
 18. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E; Costs StudyGroup - Latin American Sepsis Institute. A multicenter, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics.* 2008; 26(5):425-34.
 19. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006; 34:1589-96.

20. Valles J, Rello J, Ochagavia A, Garnacho J, Alcalá MA. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*. 2003; 123: 1615-24.
21. SPENCER, RC. Blood cultures: where do we stand? *J. Clin. Pathol.*. London, v. 41, p. 668-670, Mar. 1988.
22. BLOOD CULTURE: A key investigation for diagnosis of bloodstream infections. bioMérieux, USA. 2007.
23. Wayne PA. Principles and procedures for Blood Cultures; Approved Guideline, CLSI document M47-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2007.
24. Sepsis: um problema de saúde pública / Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepsis. Brasília: CFM, 2015. 90 p.
25. Bernhard M, Lichtenstern C, Eckmann C and Weigand M. The early antibiotic therapy in septic patients-milestone or sticking point?. *Critical Care* 2014, 18:671.
26. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013; 41 (2):580-637.
27. Sales Jr HR, Souza PC, Japiassu A. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidade de terapia intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2006; 18:9-17.
28. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19: 141-160.
29. Rosselló GAM, Pérez MAB. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016; 34:61-68.
30. Sánchez MA, Sánchez del Saz B, Loza E, Baquero F, Cantón R. Evaluation of the OSIRIS video reader system for disk diffusion susceptibility test reading. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 352-357.
31. Kolbert M, Chegrani F and Shah P M. Evaluation of the OSIRIS video reader as an automated measurement system for the agar disk diffusion technique. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 416-420.

32. Maurer FP, Christner M, Hentschke M. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infectious Disease Reports*. 2017; 30; 9:6839.
33. Turnidge J, Paterson DL. Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20: 391–408.
34. US FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; Guidance for Industry and FDA. Rockville, MD: US FDA, 2008.
35. Kahlmeter G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST—are we heading towards international agreement? *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70:2427–2439.
36. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), 2019. <http://brcast.org.br/> Acesso [05 Dez 2019].
37. Doern, G., R. Vautour, M. Gaudet, and B. Levy. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:1757–1762.
38. Inglis TJ, Ekelund O. Rapid antimicrobial susceptibility tests for sepsis; the road ahead. *Journal of Medical Microbiology*. 2019; 68: 973–977.
39. Barry AL, Fay GD, Atchison FW. Quality Control of Antimicrobial Disc Susceptibility Testing with a Rapid Method Compared to the Standard Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1972; 2: 419-422.
40. Kim JH, Kim TS, Song SH, Choi J, Han S, Kim DY, Kwon S, Lee E, Song KH, Choe PG, Bang JH, Kim ES, Park SH, Kim HB, Kim NJ, Park HB, Oh, MD. Direct rapid antibiotic susceptibility test (dRAST) for blood culture and its potential usefulness in clinical practice *Journal of Medical Microbiology* 2018;67:325–331.
41. Périllaud C, Pilmis B, Diep J, Péan de Ponfilly G, Vidal B, Couzigou C, Mizrahi A, Lourtet-Hascoët J, Le Monnier A, Van JCN. Prospective evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on Mueller-Hinton rapid-SIR directly on blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018.
42. Stokkou S, Geginat G, Schlüter D and Tammer I. Direct disk diffusion test using European Clinical Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints provides reliable results compared with the standard method. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2015.

43. Weme ET. Rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by direct inoculation and reading of disc diffusion tests after 3-4 hours. *APMIS*. 2018; 126: 870-876.
44. Edelmann A, Pietzcker T and Wellinghausen N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 202–207.
45. Menon V, Lahanas S, Janto C and Lee A. Utility of direct susceptibility testing on blood cultures: is it still worthwhile? *Journal of Medical Microbiology*. 2016; 65:501–509.
46. Mahrer S, Reinbott R, Bell S. Blood cultures- A retrospective evaluation of direct antibiotic susceptibility testing using positive broth cultures detected by the Bact-Alert system. Australian Society for Microbiology. Annual Conference, Adelaide, Australia.
47. Tan TY, Ng LS, Kwang LL. Evaluation of disc susceptibility tests performed directly from positive blood cultures. *J Clin Pathol*. 2008; 61: 343–346.
48. Yu F, Lin M, Lee J, Lian Y, Lin C, Chen C, Wang G. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation method and PHOENIX. *Journal of Biomed Lab Science*. 2011; 23: 23–28.
49. Nelovkov A, Pirozkova L, Ivanova M, Kolesnikova V. (2012). Direct blood culture antimicrobial susceptibility testing in an East Tallinn central hospital, Estonia. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID).
50. Fay D, Oldfather JE. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1979; 9:347–350.
51. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2012). Direct antimicrobial susceptibility testing guidelines. <http://www.eucast.org/> Acesso [01 Dez 2019].

ARTIGO

Artigo submetido à revista *International Journal of Antimicrobial Agents*. Número do manuscrito: IJAA-S-19-01451. Impact Factor: 4.615.

Rapid antimicrobial susceptibility by disk diffusion directly from blood culture bottles using the EUCAST “dRAST” breakpoints: evaluation of Brazilian isolates

MARTINS, A. S.;^{a,c} WINK, P. L.;^{b,c} PEREIRA, D. C.;^d SOUZA, A. C.;^d AQUINO, V. R.;^d BARTH, A. L.^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Unidade de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

***Corresponding Author:** Afonso Luís Barth, LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: albarth@hcpa.edu.br; Phone: +555133598607.

Abstract

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) has proposed a rapid antimicrobial susceptibility test (RAST) using a short incubation time directly from positive blood culture bottles. The aim of this study was to evaluate the disk diffusion technique after 4 and 6 h directly from positive blood culture bottles of *Enterobacteriaceae* using the RAST breakpoints established by EUCAST. A total of 61 isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. were selected after the blood culture bottles (containing BacT/Alert FA Plus) flagged positive. The results were assessed using the RAST breakpoints (4–6 h) as well as the standard breakpoints (18 h) from EUCAST. Results of categorical agreement (CA), minor errors (mE), major errors (ME) and very major errors (VME) were evaluated. The PABAK index was used to evaluate the correlation between early and standard readings. The vast majority of the zone diameters of *E. coli* and *Klebsiella* spp. were optimally readable after 6 h of incubation. RAST in 6 h presented the best results for categorical agreement and errors (CA = 94.4%, mE = 4.3%, ME = 0.8% and VME = 0.4%) compared to RAST in 4 h (CA = 84.3%, mE = 13.0%, ME = 3.2% and VME = 0.4%). These data indicate that the early readings in 6 h using the RAST breakpoints for all antibiotics tested in this study (except amikacin) may be used in the clinical microbiology laboratory to anticipate the AST results of blood cultures. Early readings at 4 h (RAST breakpoints) may also be used, but not for all antibiotics.

Keywords: blood culture; EUCAST; disk diffusion; rapid antimicrobial susceptibility test.

1 Introduction

In clinical microbiology laboratories, the most frequently used method for the antimicrobial susceptibility test (AST) is disk diffusion (DD), originally described by Bauer et al. in 1966 [1]. This method is simple, low cost, reproducible, accurate and allows a variety of antibiotics to be tested at the same time. It also allows the detection of atypical phenotypes and the visualization of heteroresistance, representing a good choice for microbiologists [2, 3]. The AST provides *in vitro* data, which is paramount for the management of patients with serious infections, including sepsis [4]. In routine clinical practice, the AST by DD needs at least 2 days to produce results after the blood culture becomes positive, during which time empirical therapy is selected based on the suspected causative organism and local epidemiology.

The use of methodology that is able to rapidly detect the susceptibility in bacterial isolates has the potential to reduce the time of empirical therapy and facilitate the early initiation of specific treatment with antibiotics that are susceptible *in vitro*. Furthermore, early therapy plays an important role in reducing the emergence and transmission of resistant strains, reducing healthcare costs and decreasing patient mortality [5–8].

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) has recently proposed a direct and rapid antimicrobial susceptibility test (dRAST) using a short incubation time from positive blood culture bottles for the most important antimicrobial agents to be used for the treatment of sepsis. The method is based on the EUCAST standard DD methodology, but with modified inoculum (direct from positive blood cultures bottles) and incubation time (4, 6 or 8 h instead of 16–20 h). The antimicrobials included have been chosen to cover the most important agents for the

treatment of sepsis in Europe [9]. The method is currently validated for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Acinetobacter baumannii*, as these are the bacteria that most frequently cause sepsis [10]. Timely and accurate detection and reporting of bloodstream infection are two of the most important functions of a clinical microbiology laboratory [11, 12]. Thus, the aim of the present study was to evaluate the AST by DD after 4 and 6 h from positive blood culture bottles of *Enterobacteriaceae* from Brazil using RAST breakpoints established by EUCAST.

2 Methods

2.1 Clinical isolates

This study was carried out in a routine clinical microbiology laboratory at ‘Hospital de Clínicas de Porto Alegre’ between January and August 2019. Isolates of *E. coli* ($n = 36$) and *Klebsiella* spp. ($n = 25$) were obtained from blood culture bottles (Bact/Alert FA Plus) incubated in the BacT/ALERT[®] system. The bottles were removed from the equipment within 8 h after being flagged positive and then used until 4 ± 1 h. Bacterial identification was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Vitek, bioMérieux, France).

2.2 dRAST

Rapid DD direct from blood culture was performed based on EUCAST for the RAST, but instead of inoculating 150 µL directly from positive blood cultures on Mueller-Hinton (MH) agar 90-mm plates, we inoculated 250 µL on MH agar 150-mm plates (bioMérieux[®], Brazil) [9]. This slight variation of technique was validated with the use of *E. coli* ATCC 25922 as a quality control.

Eight antibiotic disks (OXOID[®], United Kingdom; DME[®], Brazil) were tested (amikacin, 30 µg; ciprofloxacin, 5 µg; gentamicin, 10 µg; meropenem, 10 µg; tobramycin, 10 µg; ceftazidime, 10 µg; piperacillin/tazobactam 30/6 µg; and cefotaxime, 5 µg) and the agar plates were incubated in aerobic conditions at 35 ± 1°C.

2.3 Measurement of zone diameters and interpretation of susceptibility

Results were interpreted based on the EUCAST RAST breakpoints for 4- and 6-h readings as well as the standard breakpoints for 18-h AST readings from pure colonies [9]. Bacterial colonies from overnight subcultures on agar plates were used to perform the standard AST (18 h) using automated reading equipment (Osiris[®], Bio-Rad, France) to confirm the results from the conventional AST. The zone diameters of the bacterial colonies were read by two blinded operators.

2.4 Quality control (QC) strains

In order to evaluate the culture media and the disks used during the susceptibility tests, quality control (QC) was performed according to standard recommendations of

EUCAST (0.5 McFarland and 16–20 h of incubation at $35 \pm 1^\circ\text{C}$). The dRAST QC was performed by inoculating 1 mL of bacterial suspension containing 100–200 CFU (0.5 McFarland diluted 1:1000000) of the QC strain (*E. coli* ATCC 25922) into a bottle of blood culture (Bact/Alert FA Plus) with approximately 5 mL of sterile blood. The inoculated bottles were incubated in a BacT/ALERT[®] system and, when flagged positive, processed as described above.

2.5 Statistical analysis and software

Results were evaluated by comparing the readings in 4 and 6 h (using RAST breakpoints) to those of the reference method (18 h) from pure colonies in order to establish the rates of categorical agreement (CA), minor errors (mE: susceptible/resistant to intermediate, or vice versa), major errors (ME: false resistance of the dRAST) and very major errors (VME: false susceptibility of the dRAST). All statistical analysis was carried out using SPSS for Windows, Version 18.0.

Kappa and prevalence-adjusted/bias-adjusted kappa (PABAK) were calculated to evaluate the correlation between the 4-h and 18-h readings as well as between the 6-h and 18-h readings. The PABAK index was interpreted as follows: < 0.0, poor correlation; 0.0–0.20, slight correlation; 0.21–0.40, fair correlation; 0.41–0.60, moderate correlation; 0.61–0.80, substantial correlation; 0.81–1.0, almost perfect correlation [9, 13].

3 Results

A total of 61 clinical isolates and 8 antimicrobials resulted in 482 antibiotic–bacteria combinations for *E. coli* ($n = 283$) and *Klebsiella* spp. ($n = 199$), which produced 1446 inhibition zone diameters because the AST of each isolate was read three times (at 4, 6 and 18 h). It was possible to observe only a thin, but visible, growth after 4 h of incubation. However, after 6 h the growth was comparable to 18 h of incubation (Figure 1).

Piperacillin/tazobactam was the antimicrobial presenting the highest mE (35%) and ME (5%) at the 4-h reading, whereas amikacin presented the highest mE at the 6-h reading (9.8%). The highest VME was observed with gentamicin and tobramycin at 4 and 6 h. The best CA based on the RAST breakpoints at 4 h was for ciprofloxacin (94.6%). However, gentamicin presented the best CA at 6 h (98.4%) with only one error (1 VME) (Table 1). On the other hand, results based on conventional breakpoints presented an increased number of mE and ME for all antimicrobials tested at both 4 and 6 h (Table 2).

In general (for all antibiotics), comparisons between 4-h (using RAST breakpoints) and 18-h (using conventional breakpoints) readings presented 84.3%, 13%, 3.2% and 0.4% for CA, mE, ME and VME, respectively (Table 1), and comparisons between 6 h (using RAST breakpoints) and 18 h (using conventional breakpoints) readings presented 94.4%, 4.3%, 0.6% and 0.4% for CA, mE, ME and VME, respectively (Table 1 and Figure 2).

In order to evaluate whether it is necessary to use RAST breakpoints for early readings, we also determined the CA and errors using the reference breakpoints (18-h incubation from pure colonies) for readings at 4 and 6 h. Readings at 4 h using reference

breakpoints rendered CA, mE and ME values of 43.3%, 34.6% and 22.2%, respectively, with no VME observed. Readings at 6 h using reference breakpoints indicated CA, mE and ME values of 54.9%, 36.9% and 8.1%, respectively, again with no VME observed (Table 2).

For statistical analysis, we used a specific correlation coefficient (PABAK) for all antibiotics tested for all species. There was an almost perfect correlation between the readings after 4 h (PABAK = 0.82) and after 6 h (PABAK = 0.93) with the RAST breakpoints (Table 1). At the 4-h reading using RAST breakpoints, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, meropenem, tobramycin and cefotaxime presented an ‘almost perfect’ PABAK classification; ceftazidime presented a ‘substantial correlation’ and piperacillin/tazobactam presented a ‘moderate’ PABAK classification. In 6 h, using RAST breakpoints, all antimicrobials obtained an ‘almost perfect’ PABAK classification.

4 Discussion

The traditional AST by the DD technique requires around 2 working days after the blood culture becomes positive for any results to be produced. This is an important drawback because the results are needed quickly in order to guide antimicrobial treatment of patients with bloodstream infections [14, 15]. The concept of an AST directly from blood culture bottles was explored as early as 1970 [16] but few studies were published at that time. However, there are numerous recent studies of an AST directly from positive blood culture [4, 17–19]. Among all the relevant studies, Chandrasekaran and colleagues [4], from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group, presented very

satisfactory results for the DD test direct from blood cultures in comparison to the standard AST (CA values ranged from 94.7% to 96.2%) but only for the standard incubation time (18 h). In fact, Chandrasekaran et al., using early readings of the AST directly from blood culture, found a low CA (58.9%) and high VME (2.2%) and ME (25.4%) [4]. Weme et al. evaluated a dRAST with readings after only 3–4 h. The zone diameters presented insufficient growth at the 3-h reading, with the bacteria frequently needing at least 4 h before the zones were readable, and they found CA = 77.4%, mE = 3.7% and 5.5% ATU [17]. Weme et al. [17] and Chandrasekaran et al [4]. performed their study using only conventional breakpoints established by EUCAST for 18-h readings.

In 2019, Kahlmeter et al. (ESCMID eLibrary 2019 Multi-laboratory evaluation in southern Europe of the EUCAST method for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures) reported promising results of a dRAST by DD at 40 clinical laboratories in Nordic countries, evaluating readings after 4, 6 and 8 h of incubation in comparison to the standard AST. It has to be considered that Kahlmeter et al. used special breakpoints to interpret the zone diameters for the early readings, which are usually smaller than the traditional breakpoints for the 18-h readings.

In the present study, we evaluated the RAST directly from positive blood culture as proposed by Kahlmeter et al., but only for *Enterobacteriaceae* and readings at 4 and 6 h. Our results were evaluated based on the breakpoints for early readings compared to the standard breakpoints of EUCAST. The methodology we used was based on EUCAST for the RAST, but we inoculated 250 µL directly from positive blood cultures on MH agar 150-mm plates because this variation was considered equivalent to that standardized by EUCAST (data not shown).

A common feature of the studies of Chandrasekaran et al. and Weme et al. is that early readings using standard breakpoints for 18 h of the AST directly from blood culture bottles did not present satisfactory CA with the conventional AST from pure colonies. Indeed, we also found in this study that the use of standard breakpoints of EUCAST is not reliable for early readings, reinforcing the need for specific early breakpoints for proper interpretation of early readings of the dRAST by DD.

In contrast to Weme et al. [17], we found that the vast majority of zone diameters of *E. coli* and *Klebsiella* spp. were optimally readable only after 6 h of incubation, which was observed also in other studies [20, 21]. Moreover, the reading at 6 h presented a lower number of errors (Figure 2) in comparison to the 4-h reading.

We have used Food and Drug Administration (FDA) recommendations to approve a commercial AST system ($CA \geq 90\%$, $VME \leq 1.5\%$, $ME \leq 3.0\%$ and $mE < 10\%$) to evaluate the results of early readings [22, 23]. For the 4-h reading using the RAST breakpoints, FDA acceptance criteria were not fully met as amikacin, meropenem, ceftazidime and piperacillin/tazobactam exceeded 10% of mE and CA was $< 90\%$. On the other hand, all the parameters met the FDA acceptance criteria at the 6-h reading (except amikacin), with $CA > 90\%$ when using the RAST breakpoints. For statistical analysis, the use of PABAK in the present study was an indication of the likely effects of prevalence and bias alongside the true value of kappa [24]. At 4 and 6 h, based on the breakpoints for rapid readings, there was an almost perfect correlation for both readings (PABAK values of 0.82 and 0.93 for 4 and 6 h, respectively). It is important to mention that in the 6-h reading, an almost perfect PABAK classification was seen for all the antimicrobials tested, whereas at the 4-h reading the same classification was observed only for amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, meropenem, tobramycin and cefotaxime. On the other hand, none of the antimicrobials presented

excellent results at the 4-h and 6-h readings using the standard AST breakpoints, resulting in a slight correlation (PABAK = 0.2) and a moderate correlation (PABAK = 0.46), respectively.

The AST performed directly from the blood culture bottle may be subjected to technical problems, such as high thymidine concentrations and lack of a controlled inoculum in blood culture media [25]. The results obtained in this study indicate that, despite the fact that there are aspects that may influence the results of the AST directly from blood culture, the RAST performed according to EUCAST recommendations is comparable to the standard technique [9].

5 Conclusions

The data in this study indicate that the early readings, especially the 6-h reading, using the RAST breakpoints proposed by EUCAST can be used in clinical microbiology laboratories to anticipate the results of antimicrobial susceptibility of blood cultures. To the best of our knowledge there are only a few studies evaluating the dRAST methodology using specific breakpoints for rapid readings worldwide. Moreover, due to the fact that EUCAST was established as the official standard methodology to be used for AST in Brazil by the Ministry of Health in December 2018, it is important to validate the RAST methodology with bacterial isolates from Brazil [26, 27].

Acknowledgements

This work has been funded by INPRA - Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana - Brazil (INCT/CNPq: 465718/2014-0 and INCT/FAPERGS: 17/2551-

0000514-7) and by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) (Project no. 18-0525).

Competing Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Microbiol Centen Perspect Wash DC USA: ASM Press. 1966, p.40-5.
2. Stéphanie LP, Gregory D and Jean-Marc R. Evaluation of the Scan[®]1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique. J Antimicrob Chemother. 2016; 71:3424-3431.
3. Fröding I, Vondracek M, Giske CG. Rapid EUCAST disc diffusion testing of MDR *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: inhibition zones for extended-spectrum cephalosporins can be reliably read after 6 h of incubation. J Antimicrob Chemother. 2017; 72:1094–1102.
4. Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, Hejna J, Walker L, Ammann T, Kirn T, Patel R, Humphries RM. 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. 2018; 56: e01678-17.
5. K.K. Perez, R.J. Olsen, W.L. Musick, P.L. Cernoch, J.R. Davis, G.A. Land, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. Arch Pathol Lab Med.2013; 137: 1247-1254.

6. Meritxell MR, Quintanilla G, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68 (12): 2710–2717.
7. Beuving J , Wolffs PF, Hansen WL *et al.* . Impact of same-day antibiotic susceptibility testing on time to appropriate antibiotic treatment of patients with bacteraemia: a randomised controlled trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*2015; 34: 831–8.
8. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C. What is antimicrobial stewardship?. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Nov;23(11):793-798.
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. V 1.1. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_methodology_v1.1_Final.pdf/ May 2019 [Accessed 06 September 2019].
10. De Angelis, G., Grossi, A., Menchinelli, G., Boccia, S., Sanguinetti, M., & Posteraro, B. (2019). Rapid molecular tests for detection of antimicrobial resistance determinants in Gram-negative organisms from positive blood cultures: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. doi:10.1016/j.cmi.2019.11.009.
11. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1984; 20:473-477.

12. Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, Hejna J, Walker L, Ammann T, Kirn T, Patel R, Humphries RM. 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.* 2018; 56: e01678-17.
13. Barry AL, Joyce LJ, Adams AP, Benner EJ . Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations. *Am J Clin Pathol.* 1973; 59:693-699.
14. Maurer FP, Christner M, Hentschke M. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infectious Disease Reports.* 2017; 30; 9:6839.
15. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *Eur. J. Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34:1207-12.
16. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. *J Clin Microbiol.* 1984; 20:473-477.
17. Weme ET. Rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by direct inoculation and reading of disc diffusion tests after 3–4 hours. *J Pathol Microbiol and Immuno.* 2018; 126:870-876.
18. Kim JH, Kim TS, Song SH, Choi J, Han S, Kim DY, Kwon S, Lee E, Song KH, Choe PG, Bang JH, Kim ES, Park SW, Kim HB, Kim NJ, Park WB Oh MD. Direct rapid

- antibiotic susceptibility test (dRAST) for bloodculture and its potential usefulness in clinical practice. *Journal of Medical Microbiology* 2018;67:325–331.
19. Choi J, Jeong HY, Lee GY, Han S, Han S et al. Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis. *Sci Rep* 2017;7:1148.
 20. Fröding I, Vondracek M, Giske CG. Rapid EUCAST disc diffusion testing of MDR *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: inhibition zones for extended-spectrum cephalosporins can be reliably read after 6 h of incubation. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:1094–1102.
 21. Périllaud C, Pilmis B, Diep J, Péan de Ponfilly G, Vidal B, Couzigou C, Mizrahi A, Lourtet-Hascoët J, Le Monnier A, Nguyen Van JC . Prospective evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on Mueller-Hinton rapid-SIR directly on blood cultures. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2019 Jan; 93:14-21.
 22. US FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; Guidance for Industry and FDA. Rockville, MD: US FDA, 2009.
 23. John RL and Gary GK. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977; 33:159-174.
 24. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005; 85:257–268.
 25. Acar JF, Goldstein FW. Disk susceptibility testing. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996:1–51.

26. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST clinical breakpoints. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ [Accessed 12 Aug 2019].
27. Brazilian Committee on antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Clinical breakpoints. <http://brcast.org.br/documentos/> [Accessed 12 Aug 2019].

Table 1. Comparisons between readings at 4 and 6 h using RAST breakpoints direct from blood culture DD method with 18 h from pure colonies DD method using conventional breakpoints.

Antimicrobial	Time	No. of isolates in early readings using RAST breakpoints							<i>Pabak index</i>
		Susceptibility agreement (n)			%CA	No. (%) of:			
		S	I	R		VME	ME	mE	
Amikacin <i>n</i> =61	4h	42	6	3	83.6	0	2 (3.2)	8 (13.1)	0.8
	6h	48	5	1	88.5	0	1 (1.3)	6 (9.8)	0.87
Ceftazidime <i>n</i> =61	4h	22	0	26	78.6	0	1 (1.3)	12 (19.6)	0.77
	6h	30	1	27	95.1	0	0	3 (4.9)	0.95
Ciprofloxacin <i>n</i> =56	4h	25	0	28	94.6	0	0	3 (5.3)	0.95
	6h	24	0	28	92.8	0	1 (1.7)	3 (5.3)	0.91
Gentamicin <i>n</i> =61	4h	45	0	13	95.1	1 (1.3)	0	2 (3.2)	0.93
	6h	46	0	14	98.4	1 (1.3)	0	0	0.97
Meropenem <i>n</i> =61	4h	29	2	17	78.7	0	2 (3.2)	11 (18)	0.75
	6h	39	3	18	98.4	0	0	1 (1.3)	0.98
Piperacillin-tazobactam <i>n</i> =60	4h	12	0	24	60.0	0	3 (5)	21 (35)	0.58
	6h	30	0	25	91.7	0	0	4 (6.6)	0.93
Tobramycin <i>n</i> =61	4h	34	1	21	91.8	1 (1.3)	0	4 (6.5)	0.9
	6h	34	0	22	91.8	1 (1.3)	0	4 (6.5)	0.9
Cefotaxime <i>n</i> =61	4h	26	1	29	91.8	0	2 (3.2)	3 (4.9)	0.89
	6h	30	1	29	98.4	0	1 (1.3)	0	0.97

Table 2. Comparisons between readings at 4 and 6 h direct from blood culture DD method with 18 h from pure colonies DD method using conventional breakpoints.

Antimicrobial	Time	No. of isolates in early readings using conventional breakpoints					No. (%) of:			<i>Pabak index</i>
		Susceptibility agreement (n)			%CA	VME	ME	mE		
		S	I	R						
Amikacin <i>n</i> =61	4h	2	2	4	13.1	0	7 (11.4)	46 (75.4)	0.02	
	6h	9	3	4	26.2	0	1 (1.6)	44 (72.1)	0.25	
Ceftazidime <i>n</i> =61	4h	0	0	28	45.9	0	30 (49.1)	3 (4.9)	(-)0.05	
	6h	0	0	28	45.9	0	16 (26.2)	16(26.2)	0.18	
Ciprofloxacin <i>n</i> =56	4h	0	0	28	45.9	0	25 (44.6)	4 (7.1)	0.07	
	6h	4	0	28	57.1	0	14 (25)	10 (17.8)	0.32	
Gentamicin <i>n</i> =61	4h	7	9	13	47.5	0	2 (3.2)	30 (49.1)	0.44	
	6h	18	6	14	62.2	0	0	23 (37.7)	0.62	
Meropenem <i>n</i> =61	4h	10	1	18	47.5	0	5 (8.1)	27 (44.2)	0.39	
	6h	24	1	18	70.4	0	0	18 (29.5)	0.7	
Piperacillin-tazobactam <i>n</i> =60	4h	0	0	27	45.0	0	26 (43.3)	7 (11.6)	0.02	
	6h	4	0	27	51.6	0	6 (10)	23 (38.3)	0.42	
Tobramycin <i>n</i> =61	4h	3	0	24	44.2	0	1 (1.6)	33 (54)	0.43	
	6h	7	0	25	52.4	0	0	29 (47.5)	0.52	
Cefotaxime <i>n</i> =61	4h	6	0	29	57.3	0	11 (18)	18 (29.5)	0.34	
	6h	16	0	29	73.7	0	1 (1.6)	15 (24.5)	0.72	

Figure 1. Direct from blood bottle disk diffusion testing at 4 (A), 6 (B) and 18 h (C) readings.

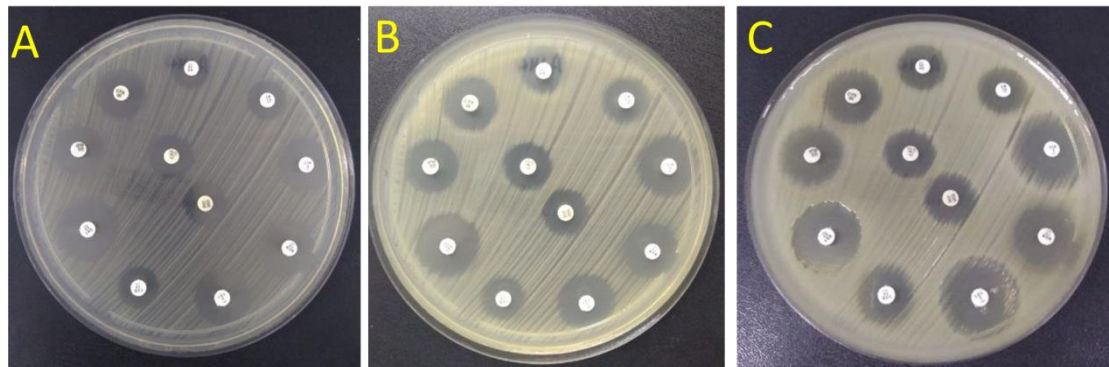
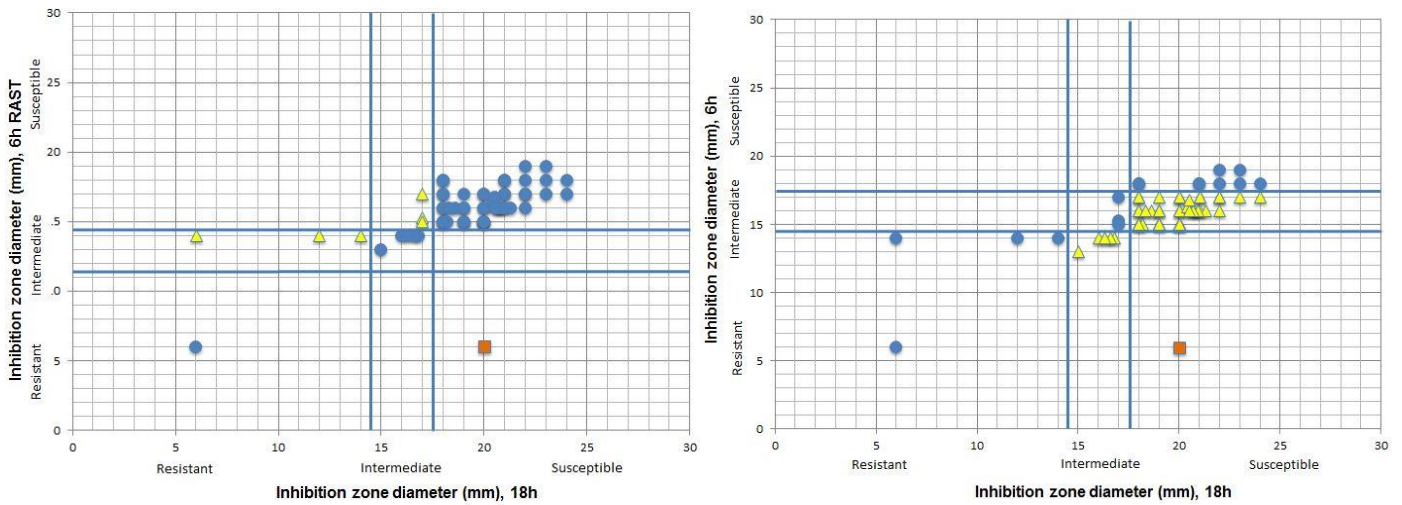
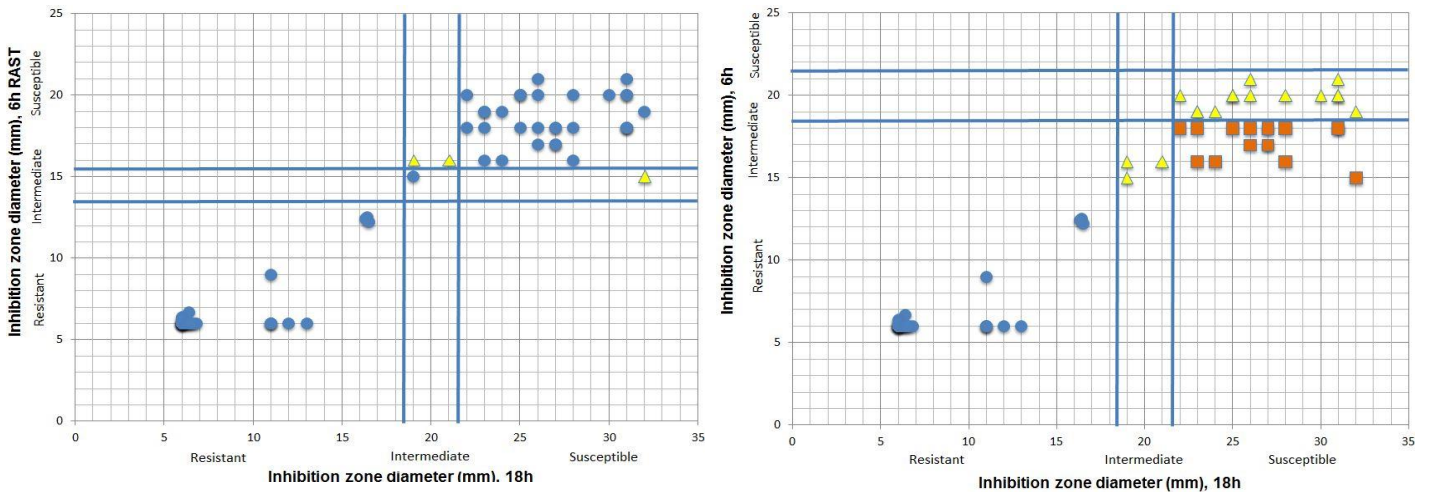


Figure 2. Correlation between RAST breakpoints and the conventional breakpoints in 6 h readings with 18 h readings for amikacin (A), ceftazidime (B), ciprofloxacin (C), gentamicin (D), meropenem (E), piperacillin-tazobactam (F), tobramycin (G) and cefotaxime (H) for *Enterobacterales*. Full lines represent the R/I/S breakpoints (EUCAST, 2019). The symbols represent as follow: triangle = mE (minor error), square = ME (major error) and rhombus = VME (very major error).

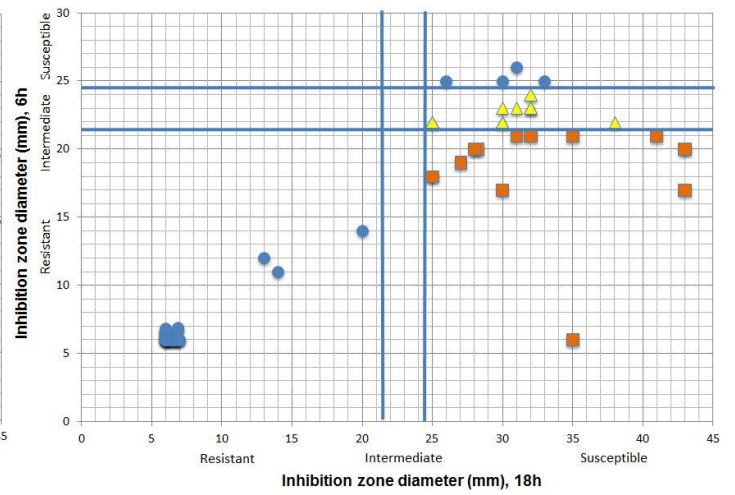
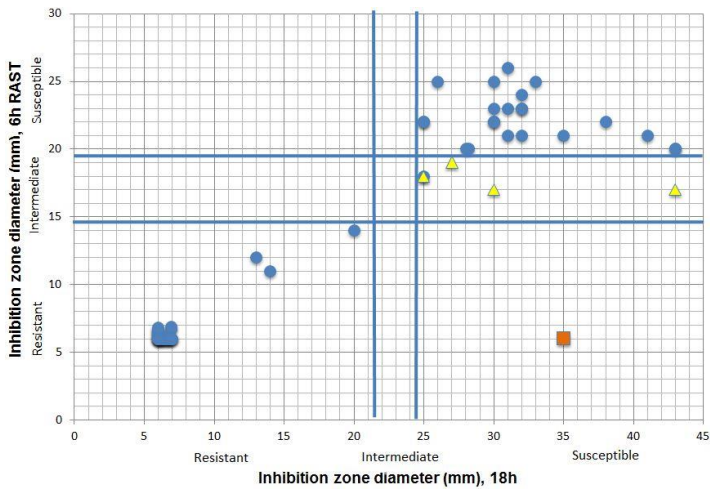
(A) Amikacin 30 μ g



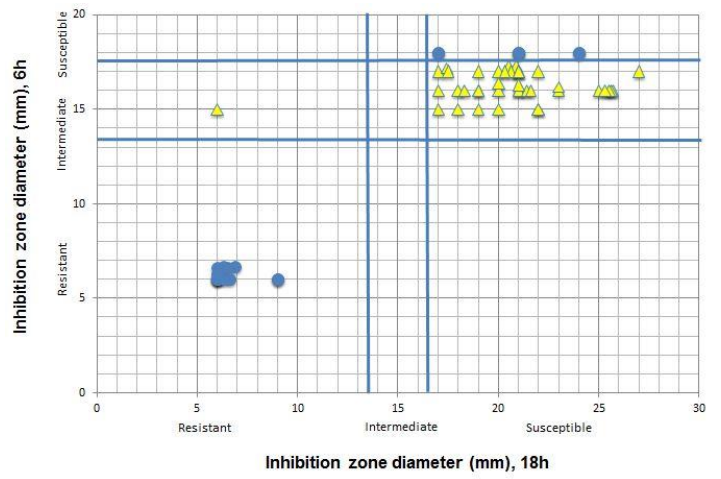
(B) Ceftazidime 10 μ g



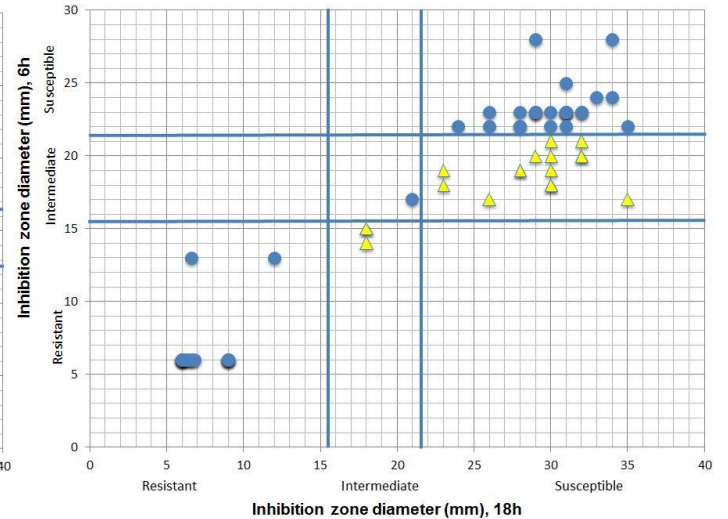
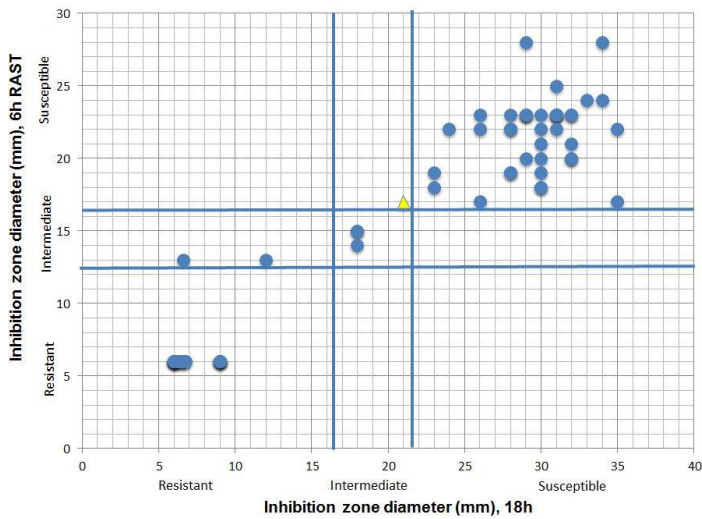
(C) Ciprofloxacin 5 μ



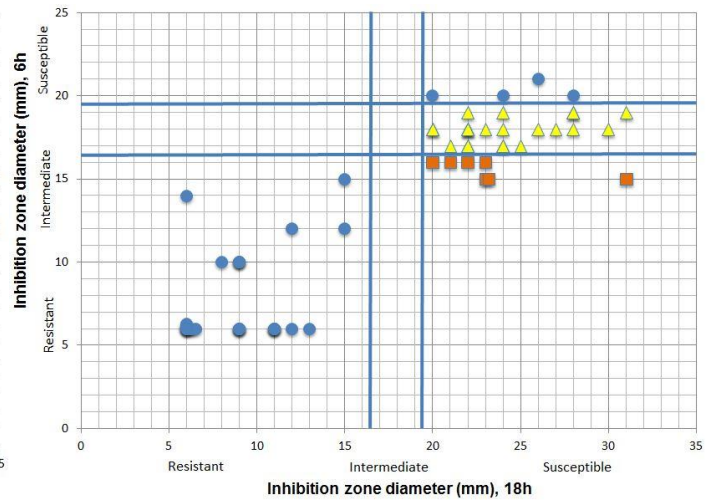
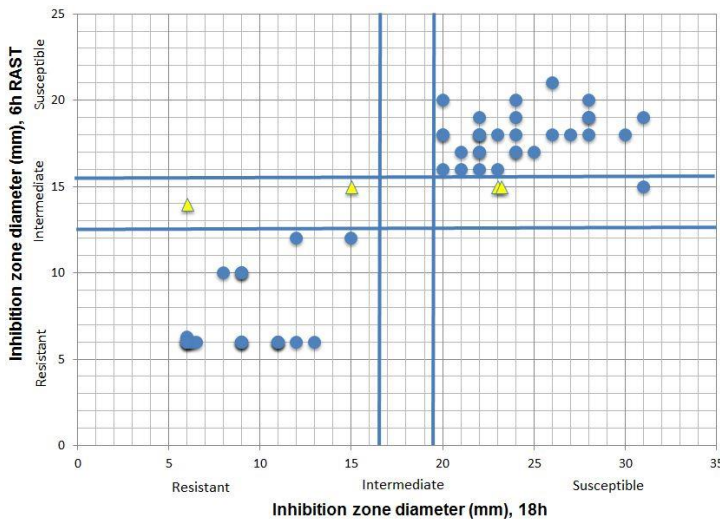
(D) Gentamicin 10 μ



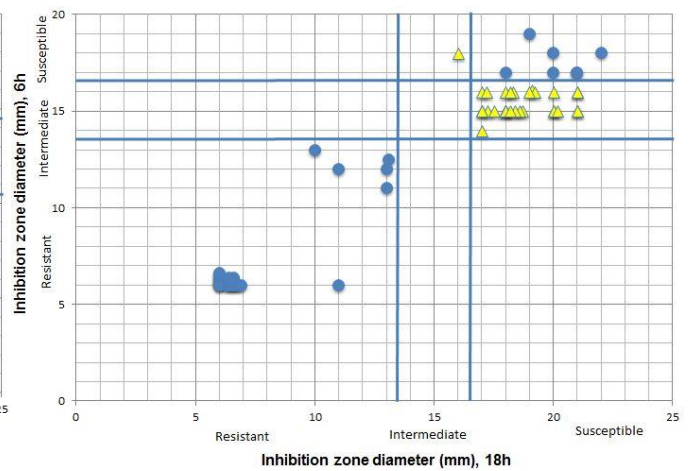
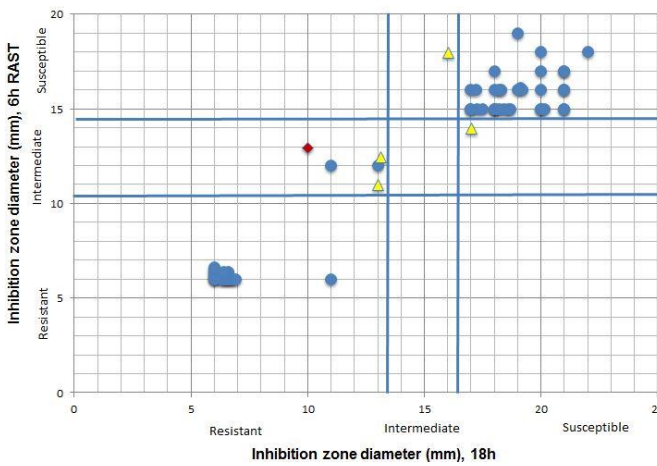
(E) Meropenem 10 μ



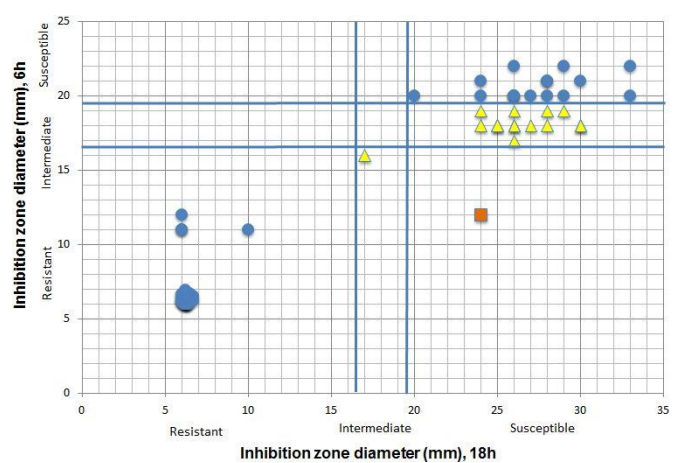
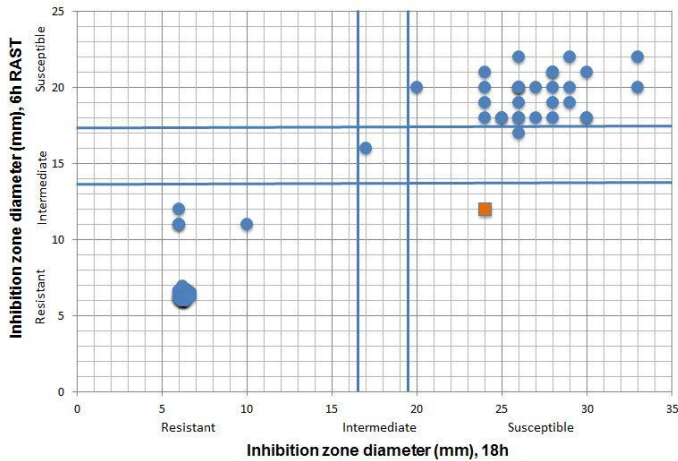
(F) Piperacillin-tazobactam 30-6 μ g



(G) Tobramycin 10 μ g



(H) Cefotaxime 5 μ g



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados deste estudo indicaram que as leituras mais rápidas, em especial a leitura em 6 h, usando os pontos de corte “RAST breakpoints” propostos pelo EUCAST, podem ser usadas em laboratórios de microbiologia clínica para antecipar os resultados de suscetibilidade antimicrobiana a partir de hemocultura. Desta maneira, com a antecipação do resultado do TSA, o clínico poderá selecionar a terapia mais apropriada para a infecção ou, se for o caso, realizar um descalonamento imediato o que diminuirá as chances do microrganismo adquirir resistência bem como diminuirá os custos da instituição.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A perspectiva deste projeto é ampliar a aplicabilidade do teste rápido utilizando o “RAST breakpoints” nos laboratórios de rotina para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana

- Utilizar os pontos de corte do TSA rápido direto da hemocultura, com a finalidade de analisar o teste de DD, com colônias puras de outros materiais biológicos, como urina, secreções, abscesso, dentre outros.
- Realizar o TSA rápido direto da hemocultura, utilizando outras espécies de microrganismos padronizados, incluindo Gram-positivos e Gram-negativos não fermentadores.

STARD checklist_2015

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
TITLE OR ABSTRACT			
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	5
ABSTRACT			
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	5
INTRODUCTION			
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	9
	4	Study objectives and hypotheses	10
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)	NA
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	30
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	30
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	30
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	NA
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication	NA
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	13
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	NA
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	31
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	32
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	32
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	30
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	32
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	NA
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	NA
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	32
	18	Intended sample size and how it was determined	NA
RESULTS			
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	NA
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	32
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition	NA
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	NA
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	34
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution)	43

		by the results of the reference standard	
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	39
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	NA
DISCUSSION			
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	35
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	34
OTHER INFORMATION			
	28	Registration number and name of registry	NA
	29	Where the full study protocol can be accessed	NA
	30	Sources of funding and other support; role of funders	36