

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Residência Uniprofissional em Análises Clínicas
Serviço de Diagnóstico Laboratorial
Unidade de Microbiologia

Identificação bacteriana rápida por MALDI-TOF VITEK MS[®] e teste de suscetibilidade rápido: reduzindo o tempo de liberação dos laudos de hemoculturas.

Patricia Orlandi Barth

Porto Alegre
2020

Patricia Orlandi Barth

Identificação bacteriana rápida por MALDI-TOF VITEK MS® e teste de suscetibilidade rápido: reduzindo o tempo de liberação dos laudos de hemoculturas.

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Análises Clínicas como requisito parcial para conclusão da Residência em Área Profissional da Saúde – Análises Clínicas: Microbiologia.

Orientadora: Dariane Castro Pereira

Co-orientadora: Eliane Wurdig Roesch

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Barth, Patricia Orlandi
Identificação bacteriana rápida por MALDI-TOF VITEK
MS® e teste de suscetibilidade rápido: reduzindo o
tempo de liberação dos laudos de hemoculturas. /
Patricia Orlandi Barth. -- 2021.
41 f.
Orientadora: Dariane Castro Pereira.

Coorientadora: Eliane Wurdig Roesch.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre, Residência Uniprofissional
em Saúde - Programa de Análises
Clínicas/Microbiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Teste Rápido. 2. Enterobactérias produtoras de
carbapenemases. 3. Sepses. 4. MALDI-TOF. 5. RAST. I.
Pereira, Dariane Castro, orient. II. Roesch, Eliane
Wurdig, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	4
JUSTIFICATIVA	6
REFERENCIAL TEÓRICO	7
3.1 Sepses	7
3.2 Enterobacterales Resistentes aos Carbapenêmicos	8
3.3 Diagnóstico Laboratorial de Hemoculturas	9
3.4 Identificação Rápida Associada ao TSA Rápido	10
OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo Geral.....	11
4.2 Objetivos Específicos	11
RESULTADOS	13
CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma falta de homeostase do corpo humano em resposta a uma infecção na corrente sanguínea (ICS) associada a um alto risco de letalidade (SINGER et al., 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a sepse é um dos eventos adversos mais frequentes em instituições de saúde, o que afeta aproximadamente 30 milhões de pessoas no mundo, e 6 milhões delas vão a óbito (OMS, 2019). Isso fez com que a OMS recentemente classificasse a sepse como prioridade de saúde mundial (REINHART et al., 2017).

Entre as ICS, as causadas por Enterobacterales produtoras de carbapenemases (EPC) são as que apresentam uma maior taxa de mortalidade em 30 dias, quando comparadas com ICS causadas por outras bactérias. Em um estudo realizado por Sabino e colaboradores em 2019, foi constatado que pacientes com ICS por EPC tiveram uma mortalidade em 30 dias de 63,8% enquanto que em pacientes com ICS por outras bactérias a mortalidade em 30 dias foi de 33,4%. Estima-se que até 2050 a resistência aos antibióticos causará aproximadamente 300 milhões de mortes precoces, com uma perda média de \$100 trilhões para a economia global (O'NEILL, 2014).

As EPC mais frequentemente relatadas são a *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli* (ORSI, G.B. et al., 2011), o que está de acordo com a epidemiologia do Brasil e da nossa instituição, na qual a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC é a responsável por mais de 90% dos casos de EPC em hemoculturas (SABINO et al., 2019).

A identificação rápida do patógeno causador da infecção pode ser determinante para a eficácia do tratamento. Estudos sugerem que a administração de antibióticos nas primeiras 3 horas da constatação da sepse implica em uma mortalidade até 14% menor quando comparada com aqueles que recebem antibiótico após 3 horas (SEYMOUR et al., 2017). Entretanto, as técnicas convencionais costumam levar de 48 à 72 horas para a liberação do laudo com a identificação e a susceptibilidade do microrganismo desde o momento que as hemoculturas se tornam positivas (VLEK; BONTEN; BOEL, 2012).

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS) é uma técnica usada para a identificação de microrganismos

através da detecção de um espectro de proteínas (MURRAY, 2010). A utilização do MALDI-TOF na rotina laboratorial contribui com a identificação mais rápida dos microrganismos em comparação aos métodos convencionais e assim pode contribuir com a diminuição do tempo para intervenção terapêutica mais efetiva (HUANG et al., 2013).

Com o auxílio deste equipamento, o desenvolvimento de novos métodos ainda mais rápidos de identificação de microrganismos já está sendo descrito na literatura (KOK et al., 2011; TANNER et al., 2017; SIMON et al., 2018). Porém, são métodos laboriosos e dispendiosos, com diversas etapas de processamento da amostra e com reagentes químicos que trazem riscos para o meio ambiente e a saúde dos trabalhadores de laboratório. Desta forma, é importante que continuem sendo pesquisadas novas técnicas de identificação rápida que sejam de fácil execução e gerem menos contaminantes ao ambiente, menos riscos ao operador e menos custos ao laboratório.

Além da identificação rápida de microrganismos auxiliar na antecipação do diagnóstico laboratorial de bacteremias, a associação deste método com um teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) direto da hemocultura e de incubação por tempo reduzido tem demonstrado vantagens (TIMBROOK et al., 2017). Neste sentido, este trabalho objetivou desenvolver um método rápido de identificação de bactérias direto do frasco de hemocultura e associá-lo a um TSA rápido para otimizar a rotina de liberação dos laudos das hemoculturas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2. JUSTIFICATIVA

A diminuição do tempo para liberação dos resultados de hemoculturas positivas pela identificação do microrganismo e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos é essencial para a otimização do diagnóstico e para o adequado tratamento de pacientes com infecções de corrente sanguínea. O aumento global das infecções por Enterobacterales produtoras de carbapenemases é alarmante e representa uma ameaça crescente à prestação de cuidados de saúde e à segurança do paciente. Atualmente, o método de identificação de bactérias e o resultado do TSA levam em média 48 a 72 horas. Devido à gravidade das ICS, se faz necessário o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápido que consigam realizar a identificação bacteriana e determinar seu perfil de suscetibilidade ainda no primeiro dia de positividade do frasco de hemocultura. Sendo assim, o laboratório clínico pode informar mais rapidamente o resultado à equipe médica e com isto auxiliar na escolha do tratamento mais eficaz e adequado para o paciente e, desta forma, contribuir significativamente para o diagnóstico e tratamento precoces de infecções de corrente sanguínea por Enterobacterales produtoras de carbapenemases.

Diferentemente da maioria dos estudos realizados no âmbito da pesquisa, nosso estudo foi realizado com amostras clínicas enviadas para exames de rotina e analisadas em tempo real no mesmo dia da positividade do frasco, com a inclusão de amostras de pacientes tanto adultos quanto pediátricos. A maioria dos estudos disponíveis que realizam a identificação bacteriana rápida com MALDI-TOF utilizaram o equipamento Byotiper® (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), enquanto em nosso trabalho utilizamos o equipamento Vitek MS® (Biomérieux, França). Além disso, poucos estudos trazem a identificação rápida acompanhada do TSA rápido.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Sepses

O sistema circulatório é estéril, porém, pode ser invadido por bactérias e, normalmente, o próprio organismo se encarrega de destruí-las sem provocar qualquer manifestação clínica ao indivíduo, o que caracteriza o termo bacteremia. Entretanto, quando o sistema imune encontra-se debilitado ou quando há um foco infeccioso com presença de bactérias virulentas, essas podem invadir a corrente sanguínea e se proliferar gerando sinais e sintomas de infecção ao paciente, que costumam ser graves, e o termo usado é septicemia ou sepse (TRABULSI, 2015; TORTORA, FUNKE, CASE, 2003).

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

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

Os principais afetados pela sepse são pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), atingindo cerca de 30% desses pacientes em todo o mundo. A taxa de mortalidade em pacientes com sepse é maior do que em pacientes livres desta condição, variando de até 20% em países da Oceania, podendo chegar até os 50% em países africanos (SAKR, 2018).

Além dos riscos de vida que cercam pacientes com sepse, mesmo aqueles que sobrevivem ao episódio levam consigo danos irreparáveis. Um estudo realizado por Iwashyna e colaboradores em 2012 mostrou uma relação em pacientes idosos que sobreviveram à sepse com novos comprometimentos cognitivos que levam à essa população a perda de independência para a realização de suas funções diárias.

Embora os critérios para suspeitar de sepse e iniciar um tratamento rápido sejam imprescindíveis para aumentar as chances de vida do paciente, somente os resultados laboratoriais definem o patógeno e conduzem à terapia mais apropriada.

3.2 Enterobacterales Resistentes aos Carbapenêmicos

Nas últimas décadas, infecções hospitalares causadas por microrganismos multirresistentes têm causado um significativo aumento na morbidade e mortalidade em pacientes, assim como um importante impacto nos custos das internações.

O sucessivo aumento de genes de resistência contra antibióticos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e fluorquinolonas restringiu as opções de medicamentos de escolha aos carbapenêmicos para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos (TZOUVELEKIS, 2012). Contudo, seu extenso uso nos últimos anos fez com que surgissem cada vez mais casos de bactérias resistentes a todas essas classes de antibióticos, incluindo os carbapenêmicos, através do mecanismo de produção de enzimas chamadas de carbapenemases, o que se tornou um problema de saúde pública em todo o mundo devido à escassez de opções para tratar essas infecções (MIRIAGOU, 2010). Como tratamento de escolha restaram as polimixinas, porém, não há uma dose padronizada para sua utilização, além de apresentarem grandes propriedades nefrotóxicas e neurotóxicas (VAN DUIN et al., 2013),

Embora existam diversas enzimas carbapenemases, a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) tem sido associada com surtos de infecções por bactérias resistentes a múltiplos medicamentos em vários países, e é considerada a carbapenemase mais prevalente e clinicamente importante no Brasil (PEREIRA, 2013) encontrada principalmente em cepas de *Klebsiella pneumoniae* (SABINO et al., 2019).

A resistência aos antibióticos é considerada uma das principais ameaças globais na atualidade, a qual impacta diretamente na saúde e na economia das nações, afetando toda a sociedade. Por isso, se faz necessário o controle e uso racional de antibióticos, a elaboração de novos medicamentos e métodos diagnósticos mais rápidos para a identificação do patógeno para que se possa controlar o aumento da resistência bacteriana e aumentar as chances de vida de pacientes que venham a adquirir estas infecções (PEREZ, BONOMO, 2019).

3.3 Diagnóstico Laboratorial de Hemoculturas

Em pacientes com suspeita de sepse, deve-se coletar pelo menos 40 ml de sangue e inocular em frascos de hemocultura a serem incubados em estufas à 37°C à atmosfera ambiente ou em equipamentos automatizados, como o BacT/ALERT® 3D (BioMérieux, França) ou o BACTEC® (BD Diagnostic Systems, USA). Esses equipamentos detectam por análises colorimétricas a presença de bactérias através da liberação de CO₂ produzido ao consumir os nutrientes do meio de cultura presente nos frascos. Após cinco dias de incubação, os frascos que não positivaram devem ser reportados como negativos (JORGENSEN et al., 1997).

Quando as hemoculturas são detectadas como positivas, em um primeiro momento a identificação dos microrganismos é feita tradicionalmente através de métodos de coloração do material clínico que permitem a classificação morfológica por microscopia. Em seguida, são realizadas provas bioquímicas de identificação por métodos manuais ou automatizados que dependem do crescimento dos microrganismos em meios de cultura específicos, o que leva no mínimo 24 horas de incubação para a interpretação final.

Técnicas moleculares têm sido aplicadas para acelerar a identificação de hemoculturas positivas, como hibridização *in situ* e tecnologia microarray. Entretanto, essas técnicas são limitadas ao número de patógenos que conseguem detectar, e requerem um custo muito elevado para uma rotina laboratorial (BHATTI et al., 2014; MULDREW, K.L., 2009).

Outros métodos automatizados que independem de crescimento bacteriano têm ganhado espaço nos laboratórios por fornecerem um resultado mais preciso em

menos tempo (MALDONADO, ROBLEDO, 2017). Entre estes, destaca-se o Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry (MALDI-TOF). O MALDI-TOF tem sido usado na identificação de fungos e bactérias de forma que após o subcultivo primário, uma colônia é preparada em uma lâmina do equipamento e através da ionização das moléculas e do tempo de voo, é feita a detecção das proteínas do microrganismo, este espectro de proteínas é comparado com um banco de amostras e o patógeno é identificado em poucos minutos (SENG, 2009).

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

3.4 Identificação Rápida Associada ao TSA Rápido

Além da identificação padronizada pelos fabricantes do MALDI-TOF (identificação a partir da colônia de 24 horas), diversas outras técnicas têm sido desenvolvidas para adiantar o resultado da identificação. Como exemplo podemos citar a subcultura em tempo curto (4-6 horas de incubação), técnicas moleculares e a identificação direta de frascos de hemocultura. (CALDERARO et al., 2019; VERROKEN et al., 2019; FARON, BUCHAN, LEDEBOER, 2017). As técnicas de identificação rápida permitem reduzir o tempo de liberação do exame em média em 24 horas, o que permite adiantar a prescrição da terapia antimicrobiana baseada na espécie e, conseqüentemente, diminuir o tempo de terapia inadequada, de permanência hospitalar, bem como reduzir os custos das internações (LAGACE-WIENS et al, 2012).

As duas marcas fabricantes do MALDI-TOF padronizaram kits comerciais para realizar a identificação direto do frasco de hemoculturas: MALDI Sepsityper, desenvolvido pela Bruker Daltonics, e VITEK MS blood culture, desenvolvido pela Biomèrieux. Porém, até o momento, estes kits estão validados apenas para uso em pesquisa, não aceitos para o uso na clínica laboratorial. Além da não validação dos

kits na clínica, outro problema se encontra nos custos para aquisição destes itens. Por este motivo e para aumentar a sensibilidade dos testes, os laboratórios têm buscado desenvolver novos métodos “in house” de identificação direto do frasco de hemocultura (LUETHY, JOHNSON, 2019)

A identificação rápida de microrganismos é uma alternativa importante para auxiliar no diagnóstico e antecipar o tratamento de pacientes com sepse. Entretanto, somente a identificação rápida sem o teste de sensibilidade rápido pode não ser tão impactante para o desfecho quanto a união dos dois testes (BEGANOVIC et al, 2019).

Foi o que Timbrook e colaboradores relataram em 2017 em um estudo que avaliou o efeito do diagnóstico rápido em resultados clínicos. Neste estudo, os autores avaliaram a identificação bacteriana rápida com a presença e com a ausência do TSA rápido e chegaram à conclusão de que o risco de mortalidade reduziu significativamente na presença do TSA rápido, mas não na ausência. Além disso, o tempo de permanência hospitalar também foi avaliado e demonstrou ser reduzido nestas condições.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método rápido para identificação de bactérias Gram-negativas e associar à determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos diretamente dos frascos de hemocultura comparando com os métodos vigentes.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho do Vitek MS® (Biomèrieux) para identificação bacteriana a partir de frascos de hemoculturas positivas em comparação ao método padrão na rotina assistencial;

- Determinar o perfil de suscetibilidade ao meropenem realizando o TSA diretamente dos frascos de hemocultura, pelo método de disco difusão, e comparar com o método padrão;
- Avaliar o desempenho da concentração inibitória mínima (CIM) rápida para polimixina B em isolados que demonstrarem resistência ao meropenem, em comparação à CIM pelo método padrão de microdiluição em caldo, de acordo com EUCAST.

5. RESULTADOS

Rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS® and rapid susceptibility test: a simple approach to reduce the turnaround time of blood cultures.

Patricia Orlandi Barth¹, Eliane Wurdig Roesch¹ and Dariane Castro Pereira¹

¹Unidade de Microbiologia, Serviço de Diagnóstico Laboratorial – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil

Address for correspondence:

Dariane Castro Pereira, PhD MD

Unidade de Microbiologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre –RS 90035003

Brasil

E-mail: darianepereira@hcpa.edu.br

Keywords MALDI-TOF - Blood cultures - Sepsis - Rapid identification - RAST

Abstract

The antimicrobial aspect of the management of patients with bloodstream infections (BSI) is time-critical. In an era of increasing antimicrobial resistance, rapid detection and identification of bacteria with antimicrobial susceptibility is crucial to direct therapy earlier in the course of illness. This study describes the performance of a rapid method for identification and antimicrobial susceptibility test for Gram-negative bacteria directly from blood cultures flasks in a routine Clinical Microbiology Laboratory.

A total of 284, 120, and 24 samples were analyzed for rapid identification (RId), rapid susceptibility testing (RAST), and rapid broth microdilution for Polymyxin B (RMIC), respectively, compared to the standard methods. Our protocol was capable of identifying 93% of the isolates on species level using the MALDI-TOF MS system. We obtained 100% agreement for RAST compared to the standard method, and for rapid broth microdilution, we obtained 96% of essential agreement.

Our protocol demonstrates to be an excellent tool for rapid bacteria identification of Gram-negative bacilli causing BSI. It can also be used in a microbiology routine with a rapid susceptibility test and a faster polymyxin B microdilution, especially for those with carbapenemases producing bacteria, to a rapidly, simply, accurately, and cost-effectively diagnostic.

INTRODUCTION

Sepsis is a lack of homeostasis in the human body in response to bloodstream infection (BSI) associated with a high risk of lethality (1). According to the World Health Organization (WHO), sepsis is one of the most frequent adverse events in health care institutions, affecting approximately 30 million people worldwide, and 6 million of them evolve to death (2). Then, timely detection of antimicrobial resistance determinants is crucial to the clinical management of bloodstream infections caused by Gram-negative bacteria. For a suspected BSI, the time between blood culture collection and microorganism identification and antimicrobial susceptibility results represents a diagnostic window of uncertainty in which patients are typically given broad empirical therapy.

Among the BSI, those caused by carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) have the highest mortality rate in 30 days compared with BSI caused by other bacteria. Also, CPE cases have increased in our institution in the last few years (3). The rapid identification of the pathogen can be decisive for the effectiveness of the treatment. Studies suggest that antibiotics administration in the first 3 hours after sepsis results in up to 14% lower mortality in patients than those who receive antibiotics after 3 hours (4). However, conventional techniques usually take at least 48 hours to report microorganism's identification and antimicrobial susceptibility since the blood cultures become positive (5).

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS) is a technique used for the identification of microorganisms through the detection of proteins (6). MALDI-TOF in the routine clinical microbiology laboratory contributes to faster identification of microorganisms than conventional methods and can lead to a better and quicker therapeutic intervention (7).

With the aid of this technology, the development of new, even faster methods to identifying microorganisms are already being described in the literature (8, 9, 10). However, they are laborious, expensive, with chemical reagents that pose risks to the environment and laboratory workers' health. In addition to the rapid identification of microorganisms, this method's combination with a rapid antimicrobial susceptibility

test (RAST) demonstrates a more significant advantage than just rapid bacteria identification (11). The aim of this study was to propose a new flowchart for processing positive blood cultures in the routine clinical microbiology laboratory evaluating the performance of a rapid method for identification and antimicrobial susceptibility test for Gram-negative bacteria directly from blood cultures flasks.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Study Population

This study included positive blood cultures from patients treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre between January and September 2020. The samples were incubated in an automated BacT/ALERT® 3D system (bioMérieux, France). Blood cultures with Gram-negative bacteria growth between 7 am to 2 pm were included in the study, polymicrobial blood cultures were excluded, and we considered only one series of blood cultures per patient in the analysis. In addition, the test included only blood cultures from the microbiology laboratory: no artificially inoculated bottles were used in this study. The routine microbiology laboratory is located in an 840-bed University Hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), in Porto Alegre, Southern Brazil.

Standard Method for Identification (sID) and Antimicrobial Sensitivity Testing (sAST)

Blood culture flasks were analyzed after bacT/ALERT®3D system flagged as positive. The blood culture flasks were analyzed by Gram staining followed by subculture on an appropriate solid agar medium (Chocolate agar, MacConkey agar - bioMérieux) following 18–24 h incubation at 35°C. The colonies grown on overnight

agar plate incubation were spotted onto a target slide and prepared according to the manufacturer's instructions for analysis using VITEK MS[®] system software version 3.0 (bioMérieux). Correct identification was considered when confidence scores ranged from 60 to 99.9, according to the manufacturer. This system was termed the standard identification method (sID). The colonies grown on overnight agar plates were also used for the preparation of the inoculum disk diffusion test (Kirby–Bauer disk diffusion susceptibility test protocol), according to EUCAST v. 10. This test was termed the standard disk diffusion method (sAST). The bacterial identification and antimicrobial resistance detection results obtained using this conventional workflow were used for comparison in the data analyses. As a quality control, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used.

Polymyxin B Minimum Inhibitory Concentration (MIC) - the standard method (sMIC)

Polymyxin B (test range 64 – 0.125 µg/mL) susceptibility was performed by broth microdilution (BMD) in Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CA-MHB-BD[™]). The results were analyzed after 18 – 24 hours and interpreted according to EUCAST proposed Clinical breakpoints v 10.0 criteria. Isolates with polymyxin B MIC ≤ 2 µg/mL were considered susceptible, and with MIC > 2µg/mL were deemed to be resistant. As a quality control *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 strains were used.

Rapid Method for Identification (rID) and Antimicrobial Sensitivity Testing (RAST)

Rapid Identification Method (rID)

For bacterial identification, the test was performed as follows: 3 mL of positive blood culture broth was aspirated from positive blood culture bottles using a

sterile syringe and transferred to a 10 mL serum separator tube. The aspirate was centrifuged for 5 min at 3,000 rpm, the supernatant was discarded, 3 mL of saline was added and centrifuged for 5 minutes at 3000 RPM. The supernatant was discarded, and then 1 µl of the pellet was added on the slide spot in duplicate. After drying at room temperature, 1 µL of the matrix was added. The bacterial identification was performed by the VITEK MS® system.

Rapid Antimicrobial Susceptibility Test (RAST)

The RAST method is currently validated for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and Complexo *Acinetobacter baumannii* by the RAST EUCAST version 2.1 of April 2020. RAST method was performed for positive blood cultures with these bacteria, according to the RAST EUCAST document. Briefly, approximately 125 µL of the blood culture was sown directly from the flask on a Mueller-Hinton 90 mm agar plate (bioMérieux), and a meropenem antimicrobial disc (10 µg) was added and incubated at 35°C for 4h - 6h. The interpretation was according to RAST EUCAST, as follows: *Escherichia coli* with meropenem zone diameter <15 mm and *Klebsiella pneumoniae* meropenem zone diameter <13 mm, in 4 hours of incubation, were resistant. *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii* were considered resistant if meropenem inhibition zone <14 mm and <15 mm, in 6 hours of incubation, respectively.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Polymyxin B - a rapid method (rMIC)

Broth microdilution susceptibility assays were performed as described in EUCAST, with some modifications. The isolates meropenem resistant by RAST method were selected to perform the rapid broth microdilution method (rMIC). The inoculum was prepared from the rapid culture grown (4–6 h agar plate incubation) on Mueller Hinton Agar (bioMérieux) and then plates incubated at 35°C ±1°C overnight.

The MIC were analyzed, and the results were interpreted according to breakpoints proposed by EUCAST (12).

The comparison of the turnaround time of the standard and rapid protocols are described in Figure 1.

Data Analysis

Bacterial identification and antimicrobial resistance detection results obtained by the rapid modified methods were compared with those obtained by standard methods. Bacterial identification results were classified as correct identification at species or genus levels, and non-reliable identification and the success rate were calculated.

Sensitive (S), intermediate (I), and resistant (R) interpretative results were evaluated for each antimicrobial agent tested by both disk diffusion and by broth microdilution susceptibility methods and categorical agreement (CA) and essential agreement (EA) were determined. The essential agreement levels (results within ± 1 doubling dilution of the MIC) were determined by the reference method according to ISO 20776-1. Categorical discrepancies levels were classified as a very major error (VME), or a false-susceptible result; a major error (ME), or a false-resistant result; and a minor error (mE) when one method yielding an intermediate result and the other delivering a susceptible or resistant result. The acceptable inter-method categorical discrepancies rates of VME, ME, and mE are $\leq 1.5\%$, $\leq 3\%$, and $\leq 10\%$, respectively, according to the Food and Drug Administration (FDA).

RESULTS

After excluding 20 samples that were polymicrobial blood culture, 284 samples were analyzed for rapid bacterial identification, with nineteen different bacteria species. The overall bacterial concordance rate by rID method for the

species level was 93% (264/284 samples). The highest concordance rate was observed among Enterobacterales species (92%), *K. pneumoniae* and *E. coli* presented of 97% and 100% of concordance, respectively. *P. aeruginosa* and *A. baumannii* Complex showed a 95% and 86% of bacterial identification concordance, respectively. Nineteen isolates (6,69%) were not identified by rID method (no organism detected), and only two isolates (0,7%) were incorrectly identified: 1 *Enterobacter cloacae* Complex was identified as a *Serratia marcescens*, and 1 *Salmonella* group was identified as a *Chronobacter manolaticus* (Table 1).

For the RAST method, 120 isolates were analyzed: 48 *Escherichia coli*, 47 *Klebsiella pneumoniae*, 18 *Pseudomonas aeruginosa*, and 7 *Acinetobacter baumannii* Complex. All RAST results agreed with the standard protocol (sAST). All 120 isolates tested had 100% of CA when the RAST and the sAST protocols were compared. For that reason, no VME, ME or mE were found (Table 2).

All isolates resistant to meropenem (n=24) were tested by rMIC method for polymyxin B: 16 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, and 5 *Acinetobacter baumannii* Complex. For *Klebsiella pneumoniae*, rMIC_{50/90} were 0,5/16 mg/L. For *Pseudomonas aeruginosa*, rMIC_{50/90} were 0,5/0,5 mg/L, for *Acinetobacter baumannii* Complex rMIC_{50/90} were 0,5/0,5 mg/L. Considering all the species, rMIC_{50/90} were 0,5/16 mg/L. Essential agreement and categorical agreement were 96%. No VME or mE were found. One ME (0,24%) occurred in one isolate of *Klebsiella pneumoniae* when the standard method detected a MIC = 2 (susceptible), and our technique detected a MIC=4 (resistant). The results are listed in Figures 2 to 5.

DISCUSSION

During our 9-month study at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary care hospital in southern Brazil with 840 beds and 165 Intensive Care Unit, we validated a 15 minutes protocol capable of identifying at the species level 93% of the Gram-negative bacteria in blood cultures associating with a RAST for

meropenem on day 0 and having results for MIC of Polymyxin on day 1, reducing the turnaround time in about two days.

Our study was carried out over a long period and included many samples of patients from routine care. We replaced the use of reagents, common in most of the studies (10,13,14,15), for saline, a non-damage solution that is present in every microbiology laboratory and brings no harm to the environment and the laboratory workers. The technique was inexpensive, easy to perform, and identification results could be obtained within 15 minutes of the blood culture flagging positive. It is essential to highlight here that our study was conducted with MALDI TOF VITEK® MS manufactured by bioMèriuex, in contrast with most studies published that were conducted with MALDI TOF by Bruker Daltonics (10, 13, 16, 17). MALDI-TOF MS is an efficient and cost-effective method for bacteria identification compared to routine biochemical panels (18). The use of MALDI-TOF for rapid identification of pathogens causing sepsis is essential to provide information to clinicians to make decisions about appropriate therapy (19). Direct identification from blood cultures can reduce the time to result in approximately 24 hours compared to identification using sub-cultured colonies (20). However, the blood cells can affect the detection of bacterial protein; for that reason, it is usually necessary to remove them with lysis buffers (21).

As the identification technique was performed in parallel with the routine, we tested the spots in duplicate just one time; for that reason, if the spot was not suitable enough for the MALDI TOF analysis, it could explain why some organisms were not detected since we did not repeat the test with the same sample. If the samples were repeated, we could have obtained even better performance results in the identification. Besides that, our results were similar to other studies that performed rapid identification directly from blood culture bottles with Gram-negative bacilli (10, 16, 17, 22), showing to be a feasible technique to reduce the turnaround time of blood cultures.

This study found a 100% agreement when compared RAST to the standard AST in 120 samples. It demonstrates that in cases of bloodstream infections caused by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and

Acinetobacter baumannii Complex there is no need to wait 24 hours to grow a colony and more than 24 hours to read the AST, like occur in most the clinical microbiology laboratories, even because numerous studies reinforce RAST reliability (23). Besides, RAST is equally easy to perform and needs no more inputs than we already use for standard AST.

According to the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance developed by the World Health Organization (24), the development of new diagnostics tools for antimicrobial susceptibility contemplates one of this plan's goals, aimed at decreasing bacterial resistance. A study conducted in 2020 by Baltas *et al.* (25) demonstrated a survival advantage for patients who received early effective antibiotic treatment compared with those who did not, who ended up having a higher risk of mortality. This study also demonstrated that the most common reason for ineffective treatment was antimicrobial resistance, which reaffirms the need for faster antimicrobial susceptibility tests.

Lastly, we used short incubation colonies to execute broth microdilution for polymyxin B on the same day that the blood cultures flagged positive, reaching 97% of essential agreement and obtaining the final results in less than 24 hours. It is important to notice that the single isolate that changed the susceptibility category had a MIC = 2, which is borderline between susceptible and resistant strains, and considering the ± 1 dilution, this isolate agreed with the standard method.

Bringing these 3 techniques together to the laboratory routine, we are capable of identifying the bacteria and determining its susceptibility profile in approximately 4 to 6 h after the positivity. If the bacteria is susceptible to the carbapenems, we can prevent the overuse of broad-spectrum antibiotics. Furthermore, if the bacteria is resistant to the carbapenems, we can inform the clinicians of the MIC for polymyxin B in less than 24 hours of positivity and facilitate the most appropriate antimicrobial therapy.

To the best of our knowledge, this is the first study that united 3 different techniques: rapid identification, rapid susceptibility test, and faster broth microdilution for polymyxin B. Our results demonstrate that our protocol can be used in the routine

clinical microbiology laboratory and substitute the standard protocols, saving at least 40 hours to the final result, compared to the reference methods.

Our study's limitations include the low number of carbapenem-resistant bacterias to execute the broth microdilution technique and the no evaluation of the impact of this technique on improving patients. However, according to others' works in this context (14, 25), our protocol demonstrates a great future in this perspective.

In conclusion, our protocol is an excellent tool for rapid bacteria identification of Gram-negative bacilli causing bloodstream infections with the aid of MALDI-TOF MS. It can also be used in a clinical microbiology laboratory routine with a rapid susceptibility test and a faster polymyxin B microdilution to a rapidly, simply, accurately, and cost-effectively diagnostic. It is worth mentioning that after our study, we implemented this workflow in our laboratory routine, and soon we can evaluate the impact of this change on our institution.

References

1. Singer M et al. (2016) The third international consensus definitions for Sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 315(8):801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287
2. World Health Organization (2019). Sepsis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>. Accessed 25 September 2020
3. Sabino S, Soares S, Ramos F, Moretti M, Zavascki AP, Rigatto MH (2019) Cohort Study of the Impact of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections on Mortality of Patients Presenting with Sepsis. *mSphere* 8:e00052-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00052-19>
4. Seymour CW et al. (2017) Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Eng J Med*. 376:2235–2244
5. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE (2012) Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*. 7:e32589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032589>

6. Murray PR (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 16(11):1626–1630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x>
7. Huang AM et al. (2013) Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis.* 57(9):1237-1245. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x>
8. Kok J et al. (2011) Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 6(8):e23285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023285>
9. Tanner H, Evans JT, Gossain S, Hussain A (2017) Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. *BMC Res Notes.* 10:48. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2366-y>
10. Simon L, Ughetto E, Gaudart A, Degand N, Lotte R, Ruimy R (2019) Direct identification of 80% of bacteria from blood culture bottles by MALDI -TOF MS using a 10-minute extraction protocol. *J Clin Microbiol.* 57:e01278-18
11. Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL (2017) The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 64:15-23. <https://doi:10.1093/cid/ciw649>
12. EUCAST (2019) Screening for ESBL and carbapenemases in *E. coli* and *K. pneumoniae* for epidemiological purposes as part of the RAST procedure. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/RAST_detect_ion_of_resistance_mechanisms_Final.pdf>. Accessed 17 august 2019
13. Ceballos-Garzón A et al (2020) In-house protocol and performance of MALDI-TOF MS in the early diagnosis of bloodstream infectious in a fourth-level hospital in Colombia: Jumping to full use of this technology. *Int J Infect Dis.* 101:85-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1469>
14. Samaranayake WAMP et al. (2020) Rapid direct identification of positive pediatric blood cultures by MALDI-TOF MS technology and its clinical impact in the pediatric hospital setting. *BMC Res Notes* 13:12. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4861-4>
15. Ferreira L et al (2011) Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 17(4):546-551. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x>
16. Yuan y et al (2020) Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Clin Lab Anal.* 34(4):e23119. <https://doi.org/10.1002/jcla.23119>

17. Hu YL, Hsueh SC, Ding GS, Chuang PC, Chen JM, Lu CY, Chang LY, Huang LM, Lee PI, Hsueh PR (2020) Applicability of an in-house saponin-based extraction method in Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identifying bacterial and fungal species in positively flagged pediatric VersaTREK blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.01.004>
18. Seng P et al. (2009) Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Infect Dis* 9:543-551. <https://doi.org/10.1086/600885>
19. Luethy PM, Johnson JK (2019) The use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) for the Identification of Pathogens Causing Sepsis. *J Appl Lab Med.* 3(4):675-685. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027318>
20. Buchan BW, Riebe KM, Ledebor NA (2012) Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 50:346-352
21. Nomura F et al. (2020) Mass spectrometry-based microbiological testing for bloodstream infection. *Clin Proteom.* 17:14. <https://doi.org/10.1186/s12014-020-09278-7>
22. Quiles MG et al. (2019) Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and real-time PCR in a combined protocol for diagnosis of bloodstream infectious: a turnaround time approach. *Braz J Infect Dis.* 23(3):164-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2019.05.005>
23. Akerlund A, Jonasson E, Matuschek E, Serrander L, Sundqvist M, Kahlmeter G (2020) EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *J Antimicrob Chemother.* 75: 3230–3238
24. World Health Organization (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1. Accessed 30 November 2020
25. Baltas I et al (2020) Impact of antibiotic timing on mortality from Gram-negative bacteremia in an English district general hospital: the importance of getting it right every time. *J Antimicrob Chemother.* dkaa478

Annex 1

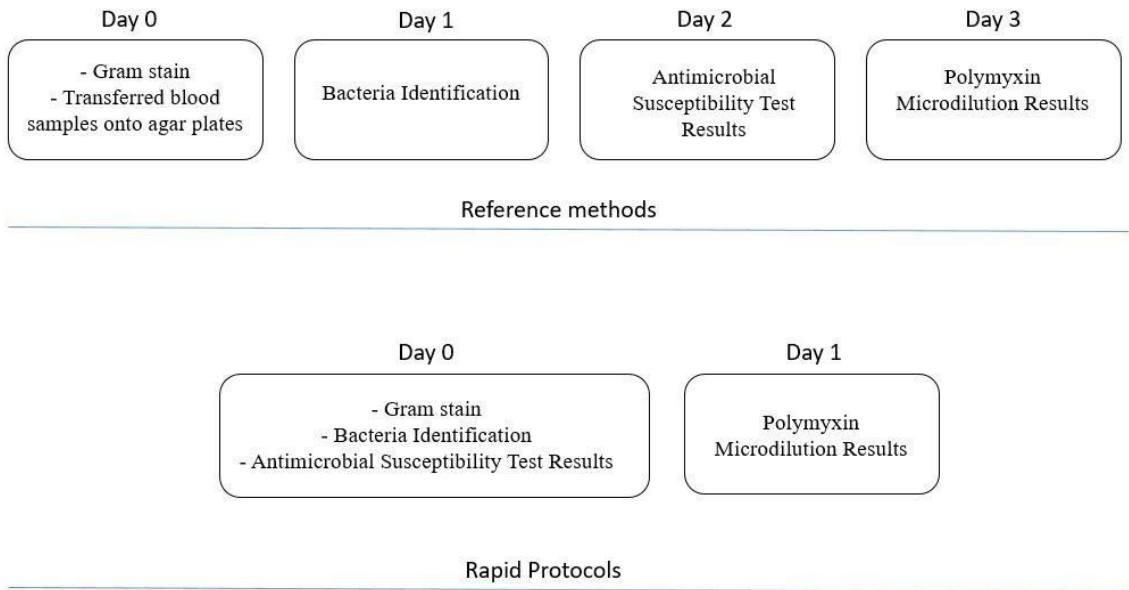
Table 1: Comparison between rapid and reference identification.

Microorganism	Total	Agree	Disagree	No organism detected	% Correct Identification
<u>Enterobacterales</u>					
<i>E. coli</i>	85	85	0	0	100%
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	15	10	1	4	66,60%
<i>K. aerogenes</i>	8	8	0	0	100%
<i>K. oxytoca</i>	5	5	0	0	100%
<i>K. pneumoniae</i>	74	72	0	2	97,30%
<i>M. morgani</i>	8	7	0	1	87,50%
<i>P. mirabilis</i>	9	7	0	2	77,70%
<i>Raoultella planticola</i>	2	1	0	1	50%
<i>S. marcescens</i>	12	11	0	1	91,66%
<i>Salmonella</i> group	3	1	1	1	33,30%
<u>Non-fermenters</u>					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	14	12	0	2	85,70%
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	1	1	0	1	100%
<i>P. aeruginosa</i>	37	35	0	2	94,6%
<i>P. putida</i>	1	1	0	0	100%
<i>P. stutzeri</i>	1	1	0	0	100%
<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	1	1	0	0	100%
<i>Ralstonia picketti</i>	4	3	0	1	75%
<i>S. paucimobilis</i>	1	1	0	0	100%
<i>S. maltophilia</i>	3	2	0	1	66,60%
Total	284	264	2	19	92,9%

Table 2: Comparison of rapid and standard antimicrobial susceptibility test.

Microorganism	Total	Resistant	Susceptible	Agree	Disagree	% Agreement
<i>E. coli</i>	48	0	48	48	0	100%
<i>K. pneumoniae</i>	47	16	31	47	0	100%
<i>P. aeruginosa</i>	18	3	15	18	0	100%
<i>A. baumannii</i>	7	5	2	7	0	100%
Total	120	24	96	120	0	100%

Figure 1. Flowchart methodology of blood cultures with Gram-negative bacilli



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação e a determinação do teste de sensibilidade de forma rápida em hemoculturas positivas possui um grande impacto no tratamento do paciente, e portanto, é necessário que estas técnicas possam ser reprodutíveis e de fácil execução para que o laboratório clínico possa implantá-las na rotina assistencial. No nosso estudo, foi possível criar um fluxograma rápido no manejo de hemoculturas positivas a fim de obtermos a identificação e o perfil de sensibilidade destas bactérias no mesmo dia da positividade do frasco, reduzindo em média em dois dias o tempo de liberação do exame e auxiliando assim a equipe médica na escolha terapêutica mais adequada para o paciente.

Nosso trabalho obteve resultados muito satisfatórios na concordância entre os métodos rápidos com os de referência, com protocolos que além de rápidos foram de baixo custo, de simples performance e com alta acurácia. Além do mais, depois da finalização deste estudo, nosso fluxograma foi implantado na rotina assistencial dos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, trazendo benefícios à nossa Instituição.

REFERÊNCIAS

AKERLUND, A. et al. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 75, p. 3230–3238, 2020.

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

Biomèriuex. VITEK® MS User Manual Workflows, 2015.

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

BHATTII, M.M et al. Rapid identification of positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using prewarmed agar plates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n. 12, p. 4334-4338, 2014.

BUCHAN, B.W, RIEBE, K.M., LEDEBOER N.A. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, p. 346-352, 2012.

CALDERARO, A. et al. Rapid microbial identification and phenotypic antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures: a new platform compared to routine laboratory methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 96, n. 3, p. 114955, 2019.

CEBALLOS-GARZÓN, A. et al. In-house protocol and performance of MALDI-TOF MS in the early diagnosis of bloodstream infectious in a fourth-level hospital in Colombia: Jumping to full use of this technology. **International Journal of Infectious Disease**. v. 101, p. 85-89, 2020.

EUCAST. Screening for ESBL and carbapenemases in *E. coli* and *K. pneumoniae* for epidemiological purposes as part of the RAST procedure. Version 1.0, 2019.

Disponível em:

<http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/RAST_detect_ion_of_resistance_mechanisms_Final.pdf>. Acesso em agosto 17 de 2019.

FARON, M.L., BUCHAN, B.W., LEDEBOER, N.A. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures methodology, performance, and optimization. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 55, p. 3328 - 3338.

FERREIRA, L. et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n. 4, p. 546-551, 2011.

HU, Y.L. et al. Applicability of an in-house saponin-based extraction method in Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identifying bacterial and fungal species in positively flagged pediatric VersaTREK blood cultures. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection** 2020.

HUANG, A. M. et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. **Clinical Infectious Diseases**. v. 57, n. 9, p.1237-1245, 2013.

JANG, K.S, KIM, Y.H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**. v. 56, n. 4, p. 209-216, 2018.

JORGENSEN, J.H. et al. Controlled clinical laboratory comparison of BACTEC plus aerobic/F resin medium with Bact/Alert aerobic FAN medium for detection of bacteremia and fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.1, p.53-58, 1997.

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

KOK, J. et al. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. **PLoS One**. v. 6, p. e23285, 2011.

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

LUETHY, P.M., JOHNSON, J.K. The use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) for the Identification of Pathogens Causing Sepsis. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**. v. 3, n. 4, p. 675-685, 2019.

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

- MIRIAGOU, V. et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n. 2, p. 112-22, 2010.
- MULDREW K.L. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Current Opinion in Pediatrics**. v. 21, n. 1, p. 102-111, 2009.
- MURRAY, P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, p. 1626–1630, 2010.
- NOMURA, F. et al. Mass spectrometry-based microbiological testing for bloodstream infection. **Clinical Proteomics**. v. 17, n. 14, 2020.
- O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Future Health and Wealth of Nations, 2014. Disponível em <<http://amr-review.org/>> Acesso em 18 agosto de 2019.
- Organização Mundial da Saúde. Sepsis, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>>. Acesso em 18 de agosto de 2019.
- Organização Mundial da Saúde. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em 30 de novembro de 2020.
- ORSI, G.B, FALCONE M., VENDITTI, M. Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 9, p. 653-679, 2011.
- PEREIRA, P.S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 68, n. 2, p. 312-316, 2013.
- PEREZ, F., BONOMO, R.A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: global action required. **The Lancet Infectious Disease**. v. 9, n. 6, p. 561-562, 2019.
- QUILE, M.G. et al. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and real-time PCR in a combined protocol for diagnosis of bloodstream infectious: a turnaround time approach. **Brazilian Journal of Infectious Disease**. v. 23, n. 3, p. 164-172, 2019.
- REINHART, K. et al. Recognizing sepsis as a global health priority - a WHO resolution. **The New England Journal of Medicine**. v. 377, p. 414-417, 2017.

SABINO, S. et al. Cohort Study of the Impact of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections on Mortality of Patients Presenting with Sepsis. **American Society for Microbiology**. v. 8, p. e00052-19, 2019.

SAKR, Y. et al. Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data From the Intensive Care over Nations Audit. **Open Forum Infectious Diseases**. v. 5, n. 2, p. ofy313, 2018.

SAMARANAYAKE, W.A.M.P. et al. Rapid direct identification of positive pediatric blood cultures by MALDI-TOF MS technology and its clinical impact in the pediatric hospital setting. **BMC Research Notes**. v. 13, n. 12, 2020.

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

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

SIMON, L. et al. Direct identification of 80% of bacteria from blood culture bottles by MALDI -TOF MS using a 10 minute extraction protocol. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 57, p.e01278-18, 2019.

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

TANNER, H. et al. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. **BMC Research Notes**. v. 10 (48), 2017.

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

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. Microbiologia 6ª edição. Editora Artmed. 2003.

TRABULSI, L.R. Microbiologia 6ª edição. Editora Atheneu. 2015.

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

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

VAN DUIN, D. et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 75, n. 2, p. 115-120, 2013.

VERROKEN, A. et al. The impact of a rapid molecular identification test on positive blood cultures from critically ill with bacteremia: A pre-post intervention study. **PLoS One**. v. 14, n. 9, p. e0223122, 2019.

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

YUAN, Y. et al. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 34, n. 4, p. e23119, 2020.

ZAMPIERI, F.G. et al. The Epimed Monitor ICU Database®: a cloud-based national registry for adult intensive care unit patients in Brazil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 29, p. 418-426, 2017.

Anexo 1

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Titulo da Pesquisa: Integração da identificação bacteriana por MALDI-TOF VITEK MS® e teste de sensibilidade: Uma abordagem simples e rápida para reduzir o tempo de liberação de hemoculturas.

Pesquisador: Dariane Castro Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23747219.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.782.760

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um trabalho de conclusão da residência em análises clínicas que visa avaliar a concordância entre o método convencional e um método de identificação rápida para análise microbiológica de hemoculturas. As amostras serão as que entrarem na rotina do laboratório e atenderem os critérios para inclusão no projeto; Não haverá contato com os pacientes, nem acesso ao prontuário para consulta de informações. O delineamento proposto é de um estudo analítico transversal experimental.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Desenvolver método rápido para identificação bacteriana diretamente dos frascos de hemocultura comparando com o método convencional, e determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos no mesmo dia da positividade.

Objetivos Específicos

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.035-903

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



Continuação do Parecer: 3.782.760

Avaliar o desempenho do Vitek MS® para identificação bacteriana a partir de frascos de hemoculturas positivas após rápido processo de centrifugação em comparação ao método padrão (incubação por 24h em meio sólido) utilizado na rotina assistencial;

Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos diretamente dos frascos de hemocultura após incubação de 4-6h, de acordo com método rápido proposto pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST);

Realizar a triagem para carbapenemases em *E.coli* e *K.pneumoniae* através do método RAST proposto pelo EUCAST;

Avaliar o desempenho da concentração inibitória mínima (CIM) para meropenem, amicacina, ceftazidima e polimixina B em isolados de *E.coli* e *K.pneumoniae* positivos no teste de triagem para carbapenemases em comparação a CIM pelo método padrão pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com CLSI.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Este projeto envolve riscos mínimos, pois o estudo envolverá o uso de amostras biológicas no laboratório de microbiologia, não havendo a participação direta de pacientes. Haverá o risco de quebra de confidencialidade dos dados. Os pesquisadores assumem a responsabilidade de mantê-los e guardá-los sob sigilo e em anonimato.

Benefícios: A diminuição do tempo para liberação dos resultados de hemoculturas positivas pela identificação do germe e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos é essencial para otimização do diagnóstico e tratamento de pacientes com infecções de corrente sanguínea. O aumento global das infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemases é alarmante e representa uma ameaça crescente à prestação de cuidados de saúde e à segurança do paciente. Atualmente, o método de identificação de bactérias se faz através do crescimento em placa, cujo tempo para o crescimento e identificação do microorganismo é de 24 horas, o que leva o resultado do teste de sensibilidade demorar até 48 horas para a liberação. Devido à gravidade das ICS, se faz necessário o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos que consigam realizar a identificação

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

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



Continuação do Parecer: 3.782.760

bacteriana e determinar seu perfil de sensibilidade ainda no primeiro dia de positividade. Sendo assim, o laboratório clínico pode informar mais rapidamente o resultado à equipe médica e com isto auxiliar na escolha do tratamento mais eficaz e adequado para o paciente e desta forma contribuir significativamente para o diagnóstico e tratamento precoces de infecções de corrente sanguínea por enterobactérias produtoras de carbapenemases.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A realização dos testes para esta pesquisa se dará em paralelo com a rotina laboratorial. Será retirado uma alíquota da amostra após a realização do exame de rotina, não havendo riscos de extravio de material.

A quantidade de sangue é suficiente para ambas as metodologias. A amostra contém meio de cultura líquido (10mL) acrescido da amostra de sangue do paciente (é preconizado 10 ml de sangue para cada frasco) e são coletados set de duas amostras por paciente de acordo com critério de sensibilidade do teste. Para os exames da rotina o volume de alíquota necessária é de aproximadamente 1mL. Os frasco de hemoculturas ficam armazenados por no máximo 5 dias pela rotina e depois são descartados. Para o projeto será utilizado 3 mL da amostra restante nos frascos. Para os exames microbiológicos de rotina o que é importante é o crescimento bacteriano nos meios de cultura, sendo assim, o volume utilizado para isto não será prejudicado pelo presente projeto apresentado. Desta forma, não há risco de extravio de material que prejudique a realização do exame de rotina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita dispensada de TCLE e apresenta TCUMBIA.

As amostras utilizadas no estudo serão solicitadas e encaminhadas para o serviço de diagnóstico laboratorial como parte da rotina assistencial pela equipe médica. Não será solicitado ao paciente nenhum exame adicional, bem como não será solicitado aos pacientes a coleta de hemoculturas, quando não houver pedido pela equipe médica. Como o método em estudo não está padronizado, os possíveis resultados discordantes não serão relatados à equipe médica, permanecendo os dados em sigilo com os pesquisadores. Além disso, o laboratório de análises clínicas não possui contato direto com os pacientes, que estão distribuídos em todos os setores do hospital, inviabilizando a aplicação do TCLE.

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

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



Continuação do Parecer: 3.782.760

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.706.879 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 03/12/2019. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão de 03/12/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- Este projeto está aprovado para inclusão de 71 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1432203.pdf	03/12/2019 15:58:24		Aceito
Outros	RESPOSTASPENDENCIASPLATAFORMABRASIL.docx	03/12/2019 15:56:43	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOTCRCORRIGIDO.docx	03/12/2019 15:54:53	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

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



Continuação do Parecer: 3.782.760

Outros	IMG_4552.JPG	03/12/2019 15:53:35	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Outros	IMG_4551.jpg	03/12/2019 15:53:07	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	VALERIOTERMODECOMPROMISSOD ADOSINSTITUCIONAIS.pdf	03/12/2019 15:51:04	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	VALERIOTERMOUTILIZACAOEDADO S.pdf	03/12/2019 15:50:52	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PATRICIATERMOUTILIZACAOEDAD OS.pdf	03/12/2019 15:50:40	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PATRICIATERMODECOMPROMISSOD ADOSINSTITUCIONAIS.pdf	03/12/2019 15:50:27	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	LARISSATERMOUTILIZACAOEDADO S.pdf	03/12/2019 15:49:49	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	LARISSATERMODECOMPROMISSOD ADOSINSTITUCIONAIS.pdf	03/12/2019 15:49:38	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ELIANETERMODECOMPROMISSODA DOSINSTITUCIONAIS.pdf	03/12/2019 15:49:29	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ELIANETERMOUTILIZACAOEDADOS .pdf	03/12/2019 15:49:20	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DARIANETERMOUTILIZACAOEDAD OS.pdf	03/12/2019 15:48:37	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	VALERIOTERMODECOMPROMISSOM ATERIALBIOLOGICO.pdf	03/12/2019 15:46:47	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	PATRICIATERMODECOMPROMISSOM ATERIALBIOLOGICO.pdf	03/12/2019 15:46:33	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	LARISSATERMODECOMPROMISSOM ATERIALBIOLOGICO.pdf	03/12/2019 15:46:23	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ELIANETERMODECOMPROMISSOMA TERIALBIOLOGICO.pdf	03/12/2019 15:46:15	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	DARIANETERMODECOMPROMISSOM ATERIALBIOLOGICO.pdf	03/12/2019 15:46:01	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

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



Continuação do Parecer: 3.782.760

Biorepositório / Biobanco	DARIANETERMODECOMPROMISSOM ATERIALBIOLOGICO.pdf	03/12/2019 15:46:01	PATRICIA ORLANDI BARTH	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVA.docx	21/11/2019 16:27:23	Dariane Castro Pereira	Aceito
Cronograma	Cronogramav2.docx	21/11/2019 16:24:33	Dariane Castro Pereira	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	14/10/2019 19:21:40	Dariane Castro Pereira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	14/10/2019 11:38:40	Dariane Castro Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 19 de Dezembro de 2019

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

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE