

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Rick Shandler Rodrigues da Cunha

**IMPACTO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA SOBRE O TEMPO DE LIBERAÇÃO
DE LAUDO**

Porto Alegre

2020

Rick Shandler Rodrigues da Cunha

**IMPACTO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA SOBRE O TEMPO DE LIBERAÇÃO
DE LAUDO**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Reus Rodrigues Perez

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues da Cunha, Rick Shandler
Impacto da Resistência Bacteriana Sobre o Tempo de
Liberação de Laudo / Rick Shandler Rodrigues da
Cunha. -- 2020.
26 f.
Orientador: Leandro Reus Rodrigues Perez.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Especialização
em Microbiologia Clínica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Microbiologia. 2. Microbiologia Clínica. 3.
Resistência bacteriana. 4. Pseudomonas aeruginosa. 5.
Análises Clínicas. I. Reus Rodrigues Perez, Leandro,
orient. II. Título.

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

RESUMO

Introdução: A detecção precoce de resistência a carbapenêmicos é de grande importância para uma escolha terapêutica rápida e acurada. O objetivo do estudo foi avaliar o impacto da detecção precoce de carbapenemase na administração de antimicrobianos em isolados nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa*. **Método:** Isolados de *P. aeruginosa*, recuperados de pacientes hospitalizados em Porto Alegre, foram testados através do teste Blue-Carba. O tempo necessário para o resultado do Blue-Carba, a partir do processamento da amostra, foi comparado com o tempo necessário para a liberação do antibiograma final. Isolados positivos para Blue-Carba foram testados fenotipicamente e geneticamente para os genes *bla_{KPC}* e metalo- β -lactamases. **Resultados:** Um total de 199 isolados foram analisados, sendo que destes 23 (11.6%) eram positivos para Blue-Carba e abrigavam o gene *bla_{SPM-1-like}*. Cinquenta e dois (26.1%) isolados tiveram resultado negativo para Blue-Carba, porém apresentaram resistência a meropenem e/ou imipenem. Polimixina B e ceftolozana/tazobactam (este exceto para os isolados produtores de SPM-1) foram 100% ativos para todos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. O teste Blue-Carba permitiu a intervenção precoce ou a adequação da terapia. **Conclusão:** A adequação precoce da terapia pode ser obtida pelo Blue-Carba para 11,6% dos isolados de *P. aeruginosa*, os quais eram produtores de SPM-1. Para estes, polimixina B poderia ser associada precocemente e ceftolozana/tazobactam retirado da terapia. Para os demais isolados, a terapia empírica com ceftolozana/tazobactam poderia ser mantida, havendo uma maior chance de sucesso terapêutico. Uma comunicação ativa entre laboratório e o corpo clínico é necessária para que os resultados precoces de dados pelo Blue-Carba sejam explorados de forma melhor, diminuindo significativamente o tempo para uma primeira intervenção.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, blue-carba, carbapenemase, antimicrobial stewardship.

ABSTRACT

Background: Early recognizing of carbapenem-resistance is crucially important to a fast and accurate therapy. We aimed to evaluate the impact of an early carbapenemase detection among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates on antimicrobial stewardship. **Methods:** *Pseudomonas aeruginosa* isolates were recovered from hospitalized patients from Porto Alegre, Brazil, and tested by Blue-Carba test. Time required for a Blue-Carba result, right after the sample processing, was compared with those required to obtain final antibiogram. Positive Blue-Carba isolates were tested phenotypically and genotypically for KPC and MBL genes. **Results:** A total of 199 isolates were analyzed and 23 (11.6%) were Blue-Carba positive and harboring the *bla*_{SPM-1-like} gene. Fifty-two (26.1%) isolates were Blue-Carba negative, however, resistant to meropenem and/or imipenem. Polymyxin B and ceftolozane/tazobactam (except for SPM-1 producers) were 100% active for all *P. aeruginosa* isolates. The Blue-Carba test allowed an earlier intervention or adequacy of therapy. **Conclusion:** Early adequacy can be promoted by Blue-Carba: for 11.6% of *P. aeruginosa* isolates, which were SPM-1 producing, polymyxin B could be prior associated and ceftolozane/tazobactam withdrawn from therapy. For the remaining isolates, empirical therapy involving ceftolozane/tazobactam can be maintained with greater likelihood of adequacy. An active communication between laboratory and clinical services is necessary to better explore this earlier Blue-Carba results, significantly reducing the time for a first intervention.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, blue-carba, carbapenemase, antimicrobial stewardship.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	6
1.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	7
1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES	8
CLÍNICAS.....	8
1.4 TEMPO DE LIBERAÇÃO DO LAUDO DO TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	9
1.5 OBJETIVOS	11
1.5.1 OBJETIVO GERAL	11
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana emerge como um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. Sua escalada nas últimas décadas consiste em um processo natural, o qual, todavia, vem sendo acelerado pelo extensivo uso inadequado de antimicrobianos (1). A persistência desse uso indiscriminado de agentes antimicrobianos tem levado a uma crise global de grandes proporções, a ponto de a resistência bacteriana ser prevista como a principal causa de morte em 2050, sendo responsável pela morte de cerca de 10 milhões de pessoas (2).

Os efeitos da resistência antimicrobiana já são perceptíveis ao redor do mundo. Infecções causadas por microrganismos resistentes a antimicrobianos são responsáveis pela morte de aproximadamente 50 mil pessoas por ano, somente na Europa e Estado Unidos (2). Dezenas de milhares de mortes também estão associadas a essas infecções em outras áreas do mundo, entretanto há uma escassez de dados e estimativas confiáveis. De forma a combater esse problema, uma série de medidas passaram a ser tomadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), levando a criação do plano de ação global em resistência antimicrobiana (3).

O plano de ação global em resistência antimicrobiana propõe cinco objetivos (4):

1. Melhorar a atenção e a compreensão a respeito da resistência antimicrobiana através de comunicação, educação e treinamento efetivos;
2. Fortalecer o conhecimento e a base de evidências através de pesquisa e vigilância;
3. Reduzir a incidência de infecções através de saneamento, higiene e medidas de prevenção de infecção efetivas;
4. Otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal;
5. Desenvolver uma situação econômica para o investimento sustentável que leve em conta as necessidades de todos os países e aumente o investimento em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções.

1.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A resistência a carbapenêmicos em isolados de *P. aeruginosa* é um dos principais desafios enfrentados pela comunidade médica a nível global. Esse tipo de resistência caracteriza-se por uma importante limitação nas opções de tratamento, bem como por uma rápida disseminação, levando ao surgimento de surtos (5,6). Surtos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos vêm sendo registrados no sul do Brasil desde 2005, atingindo uma preocupante mortalidade de 48,1% (7,8). Esta alta taxa de mortalidade demonstra a gravidade do problema, além de deixar claro a necessidade de uma melhora na abordagem clínico-laboratorial.

Os carbapenêmicos fazem parte do grupo de antimicrobianos beta-lactâmicos. Esse grupo é caracterizado pela presença de um anel beta-lactâmico em sua estrutura e por ter como mecanismo de ação a inativação das proteínas ligadoras de penicilina (PBP), importantes para formação da parede celular bacteriana. Entre os beta-lactâmicos, os carbapenêmicos são os antimicrobianos mais efetivos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo, portanto, considerados um dos mais importantes recursos para o tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes. Ademais, apresentam raros efeitos adversos, tendo um uso muito mais seguro do que outras drogas de última escolha, como as polimixinas (6). A soma desses fatores demonstra o quão imprescindível é o uso destes antimicrobianos na prática clínica, sendo a resistência aos carbapenêmicos um importante problema de saúde pública.

Um dos grandes desafios do combate a *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos reside na diversidade e complexidade de mecanismos que esse microrganismo é capaz de apresentar. Entre o vasto arsenal de mecanismos estão por exemplo as alterações na permeabilidade da membrana. Estes microrganismos podem apresentar alterações na expressão de porinas de membrana, as quais estão diretamente relacionadas com a entrada dos carbapenêmicos no espaço periplasmático, onde se ligam as PBPs. Ao diminuir a expressão dessas porinas, diminui-se a permeabilidade da membrana e dificulta-se o acesso do carbapenêmico ao seu local de ação. Outro mecanismo utilizado é a bomba de efluxo. Certas cepas de *P. aeruginosa* produzem grandes quantidades de bombas de efluxo, as quais são capazes de expulsar os carbapenêmicos do espaço periplasmático logo após sua entrada. Entretanto, o mecanismo mais importante é o enzimático. A resistência aos carbapenêmicos

mediada por enzimas se dá através das carbapenemases. Estas enzimas são capazes de hidrolisar todo tipo de beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, inutilizando-os (5,9,10). A presença desses mecanismos faz com que as opções terapêuticas sejam limitadas.

Com o aumento da prevalência de isolados de *P. aeruginosa* apresentando estes mecanismos de resistência, a polimixina B e mais recentemente ceftolozana/tazobactam vêm se tornando importantes alternativas terapêuticas. No entanto, ceftozolana/tazobactam não tem efeito em isolados produtores de carbapenemase, sendo neste caso extremamente importante a identificação precoce da produção de carbapenemase para uma melhor escolha terapêutica (11).

1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES

CLÍNICAS

O laboratório de análises clínicas possui um importante papel no combate a resistência antimicrobiana visto que está diretamente ligado ao diagnóstico microbiológico. A atuação do laboratório se relaciona a cada um dos objetivos propostos pelo plano de ação global em resistência antimicrobiana (4). Desde a melhora na atenção e compreensão a respeito da resistência antimicrobiana obtidas através de um adequada comunicação entre os analistas e a equipe médica/assistencial, até o aprimoramento das medidas de prevenção de infecção através do contato direto entre os analistas e a comissão de controle de infecção hospitalar. Entretanto, entre todos os objetivos do plano de ação global em resistência antimicrobiana, o quarto ponto é o que está mais diretamente relacionado a atividade laboratorial.

O diagnóstico laboratorial preciso e ágil de infecções é a base para o uso racional de medicamentos antimicrobianos. A relação vai desde a identificação do patógeno até o reporte e liberação do laudo, passando pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Devido ao aumento das taxas de microrganismos multirresistentes, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos tem ganho cada vez mais protagonismo no tratamento de infecções hospitalares (12–15).

O melhor dos cenários seria ter o perfil de suscetibilidade do patógeno no momento de início da terapia, possibilitando a escolha do tratamento adequado desde o começo. Entretanto, atualmente essa não é a realidade na prática clínica e as infecções agudas acabam tendo seu tratamento antimicrobiano iniciado de forma empírica. É importante ressaltar que apesar de ter

o seu início empírico é de suma importância que o tratamento seja ajustado o mais cedo possível e de forma específica ao seu patógeno (16).

1.4 TEMPO DE LIBERAÇÃO DO LAUDO DO TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Tradicionalmente, métodos não automatizados são utilizados para se avaliar a suscetibilidade antimicrobiana, sendo estes considerados como metodologia de referência (13). Disco difusão e microdiluição em caldo, por exemplo, são largamente utilizados na prática clínica. Apesar de serem testes bem estabelecidos e relativamente baratos, eles são realizados de forma manual e levam de 18 a 20 horas para produzirem resultados. Soma-se a esse tempo a incubação inicial da placa para isolamento do microrganismo, bem como uma série de possíveis atrasos que podem ocorrer, como a demora em incubar frascos de hemocultura em equipamentos de automação, o não processamento de amostras no turno da noite ou aos domingos e a repetição ou adição de testes. Como resultado temos um teste de suscetibilidade aos antimicrobianos levando dias para ser liberado (12).

O tempo de liberação do laudo do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é primordial no manejo do paciente com infecção. Cada hora de atraso no uso do agente antimicrobiano adequado leva a um aumento da mortalidade de pacientes com sepse. Ademais, o uso de antimicrobianos inadequados e o atraso no ajuste da terapia estão associados ao prolongamento do tempo de internação, à emergência de resistência bacteriana e ao aumento dos custos hospitalares (17,18).

A OMS, em seu plano de ação global em resistência antimicrobiana, destaca que a prescrição de antibióticos está raramente baseada em um diagnóstico definitivo, havendo a necessidade do desenvolvimento de estratégias para um diagnóstico mais rápido, barato e efetivo (4). Em resposta a essa necessidade, diversas alternativas vêm surgindo de forma a agilizar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Dessa forma surgem os testes rápidos de suscetibilidade aos antimicrobianos, capazes de apresentar resultados dentro de poucas horas.

Esses testes podem ser divididos basicamente em dois grupos, testes de suscetibilidade fenotípica universais e testes de detecção de mecanismos de resistências específicos (12). Testes de detecção de mecanismos de resistência específicos são baseados em biologia molecular, imunocromatografia e ensaios de degradação de antibióticos. Os resultados são extremamente rápidos, sendo obtidos em um intervalo de poucas horas e confirmam a presença de mecanismos

de resistência. Porém, resultados negativos não indicam necessariamente suscetibilidade, bem como resultados positivos não indicam necessariamente resistência (12).

Um dos métodos que já está sendo utilizado na prática clínica é o do blue-carba. Esse método barato e de simples execução permite o rastreamento de carbapenemases com alta sensibilidade e especificidade dentro de apenas 2 horas. O método tem como princípio a detecção da hidrólise do anel beta-lactâmico através da mudança de cor de um indicador de pH, no caso azul de bromotimol. Para realização da técnica, incuba-se o microrganismo a ser investigado em uma solução contendo o indicador bem como um carbapenêmico (Imipenem) por 2 horas a 37°C com agitação. Após o período de incubação é feita a leitura comparando-se com um controle negativo. Havendo a troca de coloração de azul para verde ou amarelo o teste é interpretado como positivo, diagnosticando a presença de carbapenemase no microrganismo investigado (19). Apesar das limitações do teste, sua rapidez permite que o microbiologista tome atitudes de forma a agilizar a liberação do laudo, como, por exemplo, adicionar antimicrobianos não testados comumente no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Além disso, a detecção precoce da expressão de carbapenemase pelo isolado também serve para auxiliar na escolha terapêutica, dando a possibilidade de o clínico escalonar o mais breve possível a terapia escolhida de forma empírica (11).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a resistência antimicrobiana exerce impacto sobre a divulgação do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Avaliar o uso do teste Blue-Carba para detecção precoce de carbapenemases.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o tempo de liberação de um teste de suscetibilidade aos antimicrobianos para isolados de *Pseudomonas aeruginosa*;
- b) Comparar o tempo de reporte de um teste de suscetibilidade de um isolado multirresistente versus um não multirresistente;
- c) Avaliar o uso do teste blue-carba para detecção de carbapenemases em isolados de *P. aeruginosa*;
- d) Comparar o tempo de reporte do resultado do teste blue-carba com o tempo de reporte do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Journal Pre-proof

Impact of the Blue-Carba Rapid Test for Carbapenemase Detection on Turnaround Time for an Early Therapy Against *Pseudomonas aeruginosa*

Rick Shandler Rodrigues da Cunha , Eliana Carniel ,
Gabriel Azambuja Narvaez , Cícero Gomes Dias ,
Leandro Reus Rodrigues Perez

PII: S0196-6553(20)30802-6
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.08.018>
Reference: YMIC 5697

To appear in: *AJIC: American Journal of Infection Control*

Please cite this article as: Rick Shandler Rodrigues da Cunha , Eliana Carniel , Gabriel Azambuja Narvaez , Cícero Gomes Dias , Leandro Reus Rodrigues Perez , Impact of the Blue-Carba Rapid Test for Carbapenemase Detection on Turnaround Time for an Early Therapy Against *Pseudomonas aeruginosa*, *AJIC: American Journal of Infection Control* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.08.018>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc.



Impact of the Blue-Carba Rapid Test for Carbapenemase Detection on Turnaround Time for an Early Therapy Against *Pseudomonas aeruginosa*

Running title: Blue-carba test for *Pseudomonas aeruginosa*

Rick Shandler Rodrigues da Cunha¹

Eliana Carniel²

Gabriel Azambuja Narvaez³

Cícero Gomes Dias⁴

Leandro Reus Rodrigues Perez^{1,4,*}

¹ Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

² Feevale University, Novo Hamburgo, RS

³ Mãe de Deus Hospital, Porto Alegre, RS

⁴ Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS

Conflict of interest: All authors declare have no conflict of interest

**Corresponding author:* Leandro Reus Rodrigues Perez, PhD

Microbiology Department - UFCSPA, 245, Sarmiento Leite Street,

Zip Code 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil

E-mail: leandro.reus@gmail.com

Keywords:

Pseudomonas Aeruginosa; carbapenem-resistance; blue-carba; Infection control; antimicrobial stewardship

Abstract

Objectives: To determine the turnaround time from a blue-carba result until a final microbiological report (bacterial identification plus antimicrobial susceptibility profile) and to infer the impact of an early therapeutic intervention based on the blue-carba results.

Methods: *Pseudomonas aeruginosa* isolates were recovered from hospitalized patients from Porto Alegre, Brazil, and tested by blue-carba test. Time required for a blue-carba result, right after the sample processing, was compared with those required to get final report (specie identification and antimicrobial susceptibility profile) Isolates blue-carba positive were tested by phenotypically and genotypically for KPC and MBL genes.

Results: A total of 199 isolates were analyzed and 23 (11.6%) were blue-carba positive and harboring the *bla*_{SPM-1-like} gene. Fifty-two (26.1%) isolates were blue-carba negative but resistant to meropenem and/or imipenem. Polymyxin B and ceftolozane/tazobactam (this latter except for SPM-1 producers) were 100% active. for all *P. aeruginosa* isolates, a blue-carba test allow an earlier intervention or adequacy of therapy.

Conclusion: Early adequacy can be promoted by blue-carba test for 11.6% of SPM-1-producing *P. aeruginosa* isolates, polymyxin B could be prior associated and ceftolozane/tazobactam withdrawn from therapy. For the remaining isolates, empirical therapy involving ceftolozane/tazobactam can be maintained with greater likelihood of adequacy. An active communication between laboratory and clinical services is necessary to better explore these earlier blue-carba results, significantly reducing the time for a first intervention.

1. Introduction

The worldwide emergence of carbapenem-resistance is a growing concern, particularly among *Pseudomonas aeruginosa* isolates.¹ This microorganism displays a large arsenal of resistance mechanisms which can contribute for the carbapenem-resistance phenotype, including efflux pumps, porin loss, overproduction of β -lactamases such as ESBLs and ampCs, and also production of metallo- β -lactamases (MBLs), which are enzymes that hydrolyze virtually all β -lactam antibiotics, including the carbapenems, severely limiting treatment options.² Moreover, new drugs such as ceftolozane with tazobactam has been introduced for *P. aeruginosa* resistant to carbapenems due to mechanisms other than carbapenemases, on which it has no activity.³ For this reason, early carbapenemase detection is crucially important for a better antimicrobial therapy choice. The aim of the present study was to evaluate the impact of the blue-carba rapid test for carbapenemase detection on turnaround time for an early therapy against *P. aeruginosa*.

Material and methods

All *P. aeruginosa* isolates were prospectively recovered from any clinical specimens from hospitalized patients between November 2018 and July 2019. Only one isolate per patient was included in the study. Bacterial identification was based upon production of characteristic pigments and biochemical tests such as: oxidase production, nitrate reduction and growth in cetrimide agar. The isolates were initially

submitted to the phenotypic blue-carba test for carbapenemase production as described elsewhere.⁴ Selected *P. aeruginosa* isolates confirmed with a positive result with a blue-carba test were then tested using a synergist test applying phenyl-boronic acid and ethylenediaminetetraacetic acid for detecting *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and metallo- β -lactamase (MBL) enzymes.⁵ All blue-carba positive isolates were also submitted to polymerase chain reaction (PCR) for carbapenemase gene detection. Presumptive MBL producers on the phenotypic test were further submitted to DNA amplification by PCR for detection of *bla*_{NDM-1-like}, *bla*_{SPM-1-like}, *bla*_{IMP-1-like} and *bla*_{VIM} genes as previously described.^{6,7} For those isolates with a blue-carba test negative, a phenotypic test in the presence of a specific pump inhibitor agent, the L-phenyl-L-arginine β -naphthylamine (pa β N) was applied as previously reported.⁸

Ceftolozane/tazobactam and polymyxin B minimum inhibitory concentration were determined using MIC test strips (MTS, Liofilchem, Italy) and broth microdilution prepared in house, respectively. Susceptibility to other antibiotics was determined by the disk-diffusion method. All susceptibility tests were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.⁹

The workflow required the microbiology laboratory to notify the nursing staff or clinician of positive blue-carba result for early carbapenemase mechanism notification after bacterial isolation of each clinical specimen.

Considering a prevalence of 35 non-repetitive *P. aeruginosa* isolates per month, during the nine months of study period, we calculate the required sample size. Using NQuery Advisor version 5.0 to determine the prevalence of *P. aeruginosa* infections

within 5% with a 95% level of confidence, an evaluable sample size of at least 174 *P. aeruginosa* isolates would be necessary.

Statistical analyses were carried out to estimate a 95% confidence intervals (CIs) for proportions. Average time and standard deviations were calculated for a preliminary blue-carba and a final antimicrobial susceptibility profile report. Sensitivity and specificity of blue-carba results in relation to the presence of MBL were also determined. The primary endpoint of this study was to determine the turnaround time from a blue-carba result until a final microbiological report (bacterial identification plus antimicrobial susceptibility profile) while the secondary endpoint was to infer the impact of an early therapeutic intervention based on the blue-carba results.

Results

A total of 199 *P. aeruginosa* isolates were included in the study, recovered from the following specimens: respiratory secretions (97 isolates), urine (74 isolates), blood (11 isolates) and other secretions (15 isolates). Of these 199 *P. aeruginosa* isolates, 176 (88.4%; 95% CI 83.2 – 92.2%) were blue-carba negative while the remaining 23 (11.6%; 95% CI 7.8 – 16.7%) isolates were blue-carba positive. Carbapenem (meropenem and imipenem) susceptibility profile and blue-carba results for the 199 *P. aeruginosa* isolates are shown in Table 1.

The results for the 199 *P. aeruginosa* isolates for meropenem and/or imipenem susceptibility and blue-carba test are shown Table 1. The resistance rate varied widely among the different profiles, but multiple resistance profile being notoriously

observed for the profiles 2, 3 and 5 (Table 2). Only five isolates (profile 4) were exclusively resistant to imipenem. All carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (no matter the mechanism) were susceptible to polymyxin B ($MIC_{50}/MIC_{90}=1.0/1.0\mu\text{g/mL}$). Carbapenem-resistant isolates, by mechanism other than SPM-1-producing, were all susceptible to ceftolozane/tazobactam ($MIC_{50}/MIC_{90}=1.0/2.0\mu\text{g/mL}$).

A total of 23 (11.6%; 95% CI 7.8 – 16.7%) blue-carba positive notifications were made during the study period. Time required (average time \pm standard deviation) for this notification was 1.66 ± 0.89 days for SPM-1-producing *P. aeruginosa* notification versus 3.19 ± 0.95 days for final antimicrobial susceptibility profile (Table 3). On the other hand, the most prevalent carbapenem-resistant mechanisms detected were attributed to mechanisms other than carbapenemase production, occurring in 52 isolates (26.1%; 95% CI 20.5 – 32.6%). For this group, a blue-carba negative notification was made in 1.61 ± 0.60 days against 3.06 ± 0.71 days for a final antimicrobial susceptibility profile (Table 3).

Discussion

Empirical treatment of serious *Pseudomonas* infections usually includes carbapenems. This therapy, if inadequate, is related to a significant increase in mortality. Carbapenem-resistance in *P. aeruginosa* may be due to the reduction of outer membrane permeability, overexpression of efflux pumps and β -lactamase production.^{8,10} The blue-carba test differentiates between carbapenemase producers and noncarbapenemase producers (including extended-spectrum- β -lactamase- and/or *AmpC*-producing isolates), with or without alterations in outer membrane

permeability.⁴ Considering the lack of activity of carbapenem agents against isolates exhibiting these mechanisms of resistance, drugs such as polymyxin B and more recently ceftolozane/tazobactam have been targeted for therapeutic approaches. However, as ceftolozane/tazobactam does not have effect on carbapenemase-producing ones. Thus, differentiation between the mechanisms is fundamental and has direct clinical application on the best therapeutic choice and crucially impact on the patient's outcome.

Carbapenemase production detected by blue-carba test have implications for infection control measures and for therapeutic adequacy. From a clinical point of view, an early blue-carba positive notification, in our study, means that polymyxin B should be associated with another antimicrobial (generally meropenem) for adequacy of a combined-therapy while ceftolozane/tazobactam should be withdrawn from therapy. According to stewardship principles, this is an opportunity to a more selective use of ceftolozane/tazobactam. On the other hand, a blue-carba negative result, all *P. aeruginosa* isolates would have adequate coverage with ceftolozane/tazobactam without the add another antimicrobial agent.

It is important to note that ceftolozane/tazobactam would be suitable for empirical clinical use in 176 isolates (88.4%; 95% CI 83.2 – 92.2%) since these isolates did not produce carbapenemase enzymes. Among the 97 isolates from the respiratory tract infections, for which ceftolozane/tazobactam is indicated, 12 of them (12.4%; 95% CI 7.2 – 20.4%) were SPM-1-producing *P. aeruginosa*. Particularly, for these patients, the preliminary blue-carba test report would result in a therapeutic intervention if ceftolozane/tazobactam was being administered.

In order to increase clonal diversity and antimicrobial susceptibility profiles, *P. aeruginosa* isolates from different clinical specimens were considered. This fact allowed us to determine if the inhibitory activity of ceftolozane/tazobactam was sustained when the site of origin (respiratory tract, blood or urine) and different susceptibility profiles were considered. Unequivocally, an impact on survival/clinical cure following anticipation of appropriate treatment would be highlighted for those patients with complicated urinary tract, intra-abdominal infections or pneumonia caused by multidrug-resistant *P. aeruginosa*.

An important limitation of our study was the fact that we did not evaluate the impact of an early blue-carba result on patient's outcome. On the other hand, we emphasized that a reduced turnaround time is first step for a therapeutic adequate intervention and is strongly related to better outcomes, lower selective pressure, and antimicrobial resistance development.

The blue-carba test is an accurate and inexpensive way to detect *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and MBL enzymes even in isolates with extremely low carbapenem MICs. Our results showed 100% (95% CI 85.7 - 100%) of sensitivity and 100% (95% CI 97.9 – 100%) of specificity for blue-carba results in comparison to the presence of SPM-1 enzyme. Once that MBLs in *P. aeruginosa*, such as SPM-1, VIM and IMP play a major role in the spread of nosocomial isolates and has been challenging therapy and infection control measures, our results clinically matter.

Moreover, it seems that inappropriateness of early therapy may be determinant of higher case-fatality among MBL-producing *P. aeruginosa* than non-MBL-producing ones. Considering that early appropriate antimicrobial therapy can be

the most important modifiable factor able to gain better patient's outcomes, blue-carba results may play role a crucial in decision making regarding therapy.

Importantly, the application of blue-carba in *P. aeruginosa* isolates allows to drive the use of ceftolozane/tazobactam in terms of antimicrobial stewardship and may prevent the emergence of resistance to it already described among derepressed AmpC- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates.³

In conclusion, we found 100% of sensitivity and specificity between blue-carba results and SPM-1 detection. For all *P. aeruginosa* isolates, a blue-carba rapid test would allow an early intervention (1.4 days before). In 23 (11.6%; 95% CI 7.8 – 16.7%) of SPM-1-producing *P. aeruginosa* isolates, polymyxin B could be early associated while ceftolozane/tazobactam withdrawn of therapy. For the remaining isolates, empirical therapy involving ceftolozane/tazobactam therapy could be maintained with great likelihood of adequacy. An active communication between laboratory and clinical services is necessary to better explore an early blue-carba notification and, thus, to significantly reduce the time for intervention.

Funding. None

Ethical approval. Not required.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 2016; 3: 15-21.
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306–25.
3. Perez LR, Carniel E, Narvaez GA. High minimum inhibitory concentrations among derepressed AmpC-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates for ceftolozane with tazobactam. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020; 41: 631-3.
4. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4281-3.
5. Rodrigues Perez, LR. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A major prevalence difference due to the high performance of carbapenemase producers when compared to the nonproducers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 36: 1480-2.
6. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci D, Machado A, Barth AL, Zavascki AP. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* 2014; 25:79-81.

7. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* 2007; 35: 457-60.
8. Perez LR. The impact of efflux pumps on meropenem susceptibility among metallo- β -lactamase-producing and nonproducing *Pseudomonas aeruginosa*: Insights for better antimicrobial stewardship. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019; 40: 957-8.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests 2020. Document M100-S30. Pennsylvania, USA.
10. Liew SM, Rajasekaram G, Puthuchery SD, Chua KH. Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 13: 271-3.

Table 1. Results of 199 *P. aeruginosa* isolates for meropenem and/or imipenem susceptibility and blue-carba test

Blue-carba	Meropenem and/or imipenem susceptibility profile		Total
	Susceptible	Resistant	
Negative	124	52	176
Positive	0	23*	23
Total	124	75	199

*All 23 isolates that presented a positive reaction in the blue-carba test were MBL producers according to the phenotypic test and all presented *bla_{SPM-1}* gene.

Table 2. Distinct profiles among 199 *P. aeruginosa* evaluated according to the phenotypic and molecular tests and antimicrobial resistance rates

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (N° of isolates; %)	Carbapenem-resistance (CR)	Blue-carbo	Attributed mechanism for the CR	Resistance rates (%)							
				AK	FEP	CAZ	CIP	CN	TZP	PMB	CT
Profile 1 (n=124; 62.3)	None	Negative	Not detected	8.1	7.3	3.2	3.6	11.3	7.3	NT	0
Profile 2 (n=48; 23.1)	IMP / MEM	Negative	Efflux pump	80.8	78.9	48.3	87.4	71.7	71.7	0	0
Profile 3 (n=23; 11.6)	IMP / MEM	Positive	SPM-1-like	55.6	100.0	100.0	100.0	91.3	100.0	0	NA
Profile 4 (n=3; 1.5)	IMP	Negative	Efflux pump	0	0	0	0	40.0	0	0	0
Profile 5 (n=1; 0.5)	MEM	Negative	Efflux pump	0	100.0	100.0	100.0	100.0	0	0	0

IMP, imipenem; MEM, meropenem; AK, amikacin; FEP, ceftepime; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CN, gentamicin; TZP, piperacilin/tazobactam; PMB, polymyxin B and CT, ceftolozane/tazobactam; NT, not tested; NA, not evaluated

Table 3. Time to obtain a blue-carba and final antimicrobial susceptibility profile results among 199 *P. aeruginosa* isolates according to their different carbapenem susceptibility profiles

Isolates characterization (N° of isolates; %)	Time for results (average time \pm SD, in days)		
	Blue-carba (A)	ASP results (B)	Crude difference (B) – (A)
Carbapenem-Susc (124; 62.3)	1.42 \pm 0.54	2.52 \pm 0.58	1.10
Carbapenem-Resis; blue-carba (-) (52; 26.1)	1.61 \pm 0.60	3.06 \pm 0.71	1.45
Carbapenem-Resis; blue-carba (+) (23; 11.6)	1.66 \pm 0.89	3.19 \pm 0.95	1.53
All <i>P. aeruginosa</i> (199; 100)	1.56 \pm 0.61	2.92 \pm 0.72	1.36

SD, standard deviation; ASP, antimicrobial susceptibility profile; Susc, susceptible; Resis, resistant; (-), negative; (+), positive

Journal Pre-proof

3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O tempo de liberação de um laudo é fundamental para um melhor desfecho clínico. No laboratório de microbiologia a agilidade na liberação do laudo se torna ainda mais essencial devido ao grande tempo requisitado pelas técnicas aplicadas. O advento de testes como o blue-carba surge neste contexto de forma a proporcionar resultados rápidos e capazes de ter impacto na conduta clínica.

O presente estudo demonstrou que o blue-carba pode ser utilizado como uma ferramenta importante para prever a produção de carbapenemase. No contexto de *P.aeruginosa*, essa identificação precoce do mecanismo de resistência demonstrou-se de grande utilidade clínica, uma vez que um dos principais antimicrobianos utilizados de forma empírica no tratamento de *P. aeruginosa*, ceftazolana/tazobactam, é inativa em isolados produtores de carbapenemase. Sendo assim, para os isolados positivos para blue-carba, o uso de ceftazolana/tazobactam pôde ser descontinuado e proporcionado nova intervenção terapêutica de forma precoce, como por exemplo, iniciando-se o uso de polimixina B. Já para os isolados negativos para blue-carba, a terapia empírica pôde ser continuada, com uma maior garantia de sucesso terapêutico.

Ferramentas como o blue-carba são ótimas alternativas e devem ter seu uso incentivado. Ademais, é importante que continuem sendo pesquisadas novas alternativas de agilizar a liberação dos laudos microbiológicos, tornando esse processo cada vez mais rápido e expandindo-o para outros mecanismos de resistência. Um diagnóstico ágil e uma comunicação ativa e efetiva entre laboratório e corpo clínico são o caminho para o melhor manejo de infecções.

REFERÊNCIAS

1. Gurbani N. Antimicrobial resistance. *Pharma Times*. 2014;46(4):16–23.
2. Neill JO'. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014;(December).
3. World Health Organisation. Draft Global action plan on antimicrobial resistance WHA68.7. World Heal Organ [Internet]. 2015;(May):1–4. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_20-en.pdf?ua=1
4. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. *Microbe Mag*. 2015;10(9):354–5.
5. Bobo LD, Dawson MC. The Quiet Before the Storm. *Du Bois Rev*. 2005;2(1):1–4.
6. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15–21.
7. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(6):1148–51.
8. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection*. 2007;35(6):457–60.
9. Reus L, Perez R. The impact of efflux pumps on meropenem susceptibility among metallo- β -lactamase-producing and nonproducing *Pseudomonas aeruginosa* : Insights for better antimicrobial stewardship Forecasting from phenotypic testing to an antimicrobial stewardship strate. :957–8.
10. Liew SM, Rajasekaram G, Puthuchery SD, Chua KH. Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2018;13:271–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.026>
11. Craig WA, Andes DR. In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, including strains with extended-spectrum β -lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1577–82.
12. Idelevich EA, Becker K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2019;25(11):1347–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.025>
13. Leonard H, Colodner R, Halachmi S, Segal E. Recent Advances in the Race to Design a Rapid Diagnostic Test for Antimicrobial Resistance. *ACS Sensors*. 2018;3(11):2202–17.
14. Goel G, Das D, Mukherjee S, Bose S, Das K, Mahato R, et al. A method for early detection of antibiotic resistance in positive blood cultures: Experience from an oncology centre in eastern India. *Indian J Med Microbiol*. 2015;33:S53–8.
15. Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent JL. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care* [Internet]. 2016;20(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1320-7>
16. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Vol. 43, *Intensive Care Medicine*. Springer Berlin Heidelberg; 2017. 304–377 p.
17. Bias TE, Vincent WR, Trustman N, Berkowitz LB, Venugopalan V. Impact of an

- antimicrobial stewardship initiative on time to administration of empirical antibiotic therapy in hospitalized patients with bacteremia. *Am J Heal Pharm.* 2017;74(7):511–9.
18. Kawasuji H, Sakamaki I, Kawamura T, Ueno A, Miyajima Y, Matsumoto K, et al. Proactive infectious disease consultation at the time of blood culture collection is associated with decreased mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: A retrospective cohort study. *J Infect Chemother* [Internet]. 2020;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.01.017>
 19. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281–3.