



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DE BACTÉRIAS
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE NDM EM ESTADOS DO SUL DO
BRASIL**

DOCTORANDA: LAVINIA NERY VILLA STANGLER AREND MSc

ORIENTADOR: FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON PhD

Curitiba, junho/2023



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DE BACTÉRIAS
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE NDM EM ESTADOS DO SUL DO
BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Curitiba, junho/2023

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

A681c
2023

Arend, Lavinia Nery Villa Stangler
Caracterização molecular e epidemiológica de bactérias produtoras de
carbapenemase NDM em estados do sul do Brasil / Lavinia Nery Villa Stangler
Arend; orientador: Felipe Francisco Bondan Tuon. – 2023.
89 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2023
Bibliografia: f. 72-82

1. Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos. 2. Epidemiologia.
3. Plasmídeos. I. Tuon, Felipe Francisco Bondan. II. Pontifícia Universidade
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
III. Título.

CDD. 20. ed. – 614.577



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 07 dias do mês de julho de 2023 às 13:30, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE NDM EM ESTADOS DO SUL DO BRASIL**” apresentado por Lavinia Nery Villa Stangler Arend para obtenção do título de Doutora; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon - Presidente	<i>Felipe Tuon</i>
Prof. Dr. Joao Paulo Marochi Telles (Mackenzie)	<i>Felipe Tuon</i>
Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira – (UFPR)	<i>Felipe Tuon</i>
Profa. Dra. Larissa Bail (UEPG)	<i>Felipe Tuon</i>
Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa (FPP)	<i>Felipe Tuon</i>

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon	Conceito: APROVADA
Prof. Dr. Joao Paulo Marochi Telles	Conceito: APROVADA
Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira	Conceito: APROVADA
Profa. Dra. Larissa Bail	Conceito: APROVADA
Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa	Conceito: APROVADA

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Felipe Tuon

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Presidente da Banca Examinadora

Cristina Pellegrino Baena

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho – CEP 80215-901
Tel./Fax: (41) 3271-2285 – E-mail: ppgcs@pucpr.br – Curitiba – Paraná – Brasil

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, ao meu marido Konrahd, às minhas filhas Ana Maria e Maria Eduarda, afilhada Amanda, aos meus pais Virginia e Gelson.

Agradecimentos

Agradeço aos meus queridos Konrahd, Ana Maria e Maria Eduarda por terem paciência me apoiarem em mais esse projeto. Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar.

Agradeço a minhas colegas de doutorado Carmem e Larissa que estiveram junto comigo nesse projeto, nas alegrias e nas dificuldades. À Keite que nos ajudou muito com o trabalho, especialmente com a genômica. Aos colegas do LEID por tratarem minhas amostras como se fossem do trabalho de vocês, muito obrigada. Ao meu orientador Felipe, obrigada pela paciência, incentivo e amizade.

À Maria do Carmo, Gisele, Claire, Etienne, Cláudia, Letícia Graziela, Aline e Irina, obrigada pela força para terminar a tese.

Ao Ricardo por nos atender quando precisamos, mesmo quando está envolvido em vários projetos. Ao Fabiano pela análise dos dados (nem sempre tão fáceis de analisar) do GAL.

Ao Dr. Marcelo Pilonetto, meu colega e professor, pelos contatos e pela ajuda. À Libera, minha primeira orientadora, por ter visto valor no meu trabalho. À Helena por me inspirar a fazer doutorado com o seu exemplo. À Dra. Célia e aos colegas do LACEN por me apoiarem em fazer mais uma pós-graduação. Aos colegas da ZHAW University, Theo e Rex, que se tornaram grandes colegas e incentivadores desse trabalho.

Aos colegas da Bacteriologia do LACEN/PR que cobriram o setor na minha ausência em todas as vezes que eu tive que sair para fazer alguma disciplina ou curso.

Aos colegas do NEBaC por acreditarem que eu poderia terminar mais esse desafio.

Ao laboratório de bioinformática da PUCPR, na pessoa do Bruno Guerra. Ao Dany Mesa, bioinformata do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, pela ajuda com as imagens dos plasmídeos. Ao laboratório de Bioquímica da UFPR, prof. Emanuel Malpenti, que realizou o sequenciamento Illumina das nossas bactérias. Ao laboratório da USP, prof. Nilton Lincopan e a Bruna Fuga por realizarem o sequenciamento Nanopore e nos auxiliarem com as análises.

EPÍGRAFE

“Nenhum homem é uma ilha, isolado em si mesmo; todos são parte do continente, uma parte de um todo. Se um torrão de terra for levado pelas águas até o mar, a Europa ficará diminuída, como se fosse um promontório, como se fosse o solar de teus amigos ou o teu próprio; a morte de qualquer homem me diminui, porque sou parte do gênero humano. E por isso não pergutes por quem os sinos dobram; eles dobram por ti”.

John Donne

A tese foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT, com referências bibliográficas estilo Vancouver. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório LEID (*Laboratory of Emerging Infectious Diseases*) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR coordenado pelo Prof. Dr. Felipe Francisco B. Tuon, no LACEN/PR (Laboratório Central do Estado do Paraná) diretora Técnica Dra. Irina Riediger e Diretora Geral Dra. Célia Fagundes da Cruz, no Laboratório de Bioquímica da UFPR sob coordenação do professor Dr. Emanuel Malpenti e no Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas da Universidade de São Paulo sob coordenação do prof. Nilton Lincopan. Este estudo foi parcialmente financiado pelo Projeto Samba 2, em parceria com a ZHAW University de Zurich. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente tese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hidrólise de um β -lactâmico por uma metalo- β -lactamase binuclear da classe B.	23
Figura 2- Evolução e disseminação da carbapenemase NDM.	25
Figura 3 - Características moleculares das β -lactamases NDM-1.....	26
Figura 4 - Duas prováveis rotas de construção do gene <i>bla</i> _{NDM-1}	28
Figura 5- Distribuição dos tipos de plasmídeos carreadores de <i>bla</i> _{NDM-1}	30
Figura 6- Distribuição da carbapenemase NDM nos estados do Sul do Brasil.....	41
Figura 7- Aumento em progressão aritmética para bactérias produtoras de NDM.	42
Figura 8- Similaridade genética de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por rep-PCR.....	45
Figura 9- Plasmídeo de 121321pb contendo <i>bla</i> _{NDM-1} de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 11955RM.....	48
Figura 10 - Plasmídeo de 155630pb contendo <i>bla</i> _{NDM-1} de <i>Escherichia coli</i> 11955RM.	50
Figura 11 - Genes e suas orientações de transcrição.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gênero e espécie dos isolados bacterianos produtores de NDM.	40
Tabela 2 - Atividade in vitro dos antimicrobianos contra isolados de <i>Enterobacterales</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp	42
Tabela 3- MIC ₅₀ e MIC ₉₀ de <i>Enterobacterales</i> produtores de NDM.	44
Tabela 4 -Cromossomo e conteúdo dos plasmídeos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 11955RM.	47
Tabela 5 - Cromossomo e conteúdo dos plasmídeos de <i>Escherichia coli</i> 16211RM.....	49

Siglas e Abreviaturas

NDM-1 – New Delhi Metallo- β -lactamase

EDTA – Ácido diamino etilenodiamino tetracético

IMP – Imipenemase

VIM – Verona Imipenemase

MALDI-TOF – Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight

PCR – Polymerase Chain reaction

MLST – Multi locus sequence typing

GAL – Gerenciador de Ambiente Laboratorial

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical Laboratorial Standards Institute

ATCC – American Culture Type Collection

CGE – Center for Genomic Epidemiology

BrCAST – Brazilian Comittee on Antimicrobial Susceptibility Test

EUCAST – European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Test

AMR – Antimicrobial Resistance

Resumo

A resistência antimicrobiana aos carbapenêmicos é um problema mundial. A *New Delhi* metalo- β -lactamase (NDM) é uma metalo- β -lactamase do tipo B1, capaz de hidrolisar quase todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam. Existem 29 tipos de NDM descritos e identificados em mais de 60 espécies de 11 famílias, e elas apresentam atividades variáveis de carbapenemase. Vários tipos de plasmídeos estão implicados na disseminação da *bla*_{NDM} (gene que codifica a NDM) como os tipos IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 e os novos IncN e IncHI1. Bactérias com NDM têm sido identificadas pelo mundo todo, com maior prevalência na Índia, no Oriente Médio, e na região dos Balcãs. A polimixina, combinada com outros agentes como os aminoglicosídeos se mantém a principal alternativa de antibioticoterapia. Compostos capazes de inibir a NDM foram encontrados, porém, ainda não estão aprovados para uso clínico.

O objetivo desse trabalho é caracterizar epidemiológica e molecularmente os isolados NDM enviados ao LACEN/PR de janeiro de 2013 e agosto de 2018. A epidemiologia foi acessada através dos dados do software GAL utilizando Elasticsearch. A sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada através da microdiluição em caldo. A similaridade genética da espécie predominante, *Klebsiella pneumoniae*, foi determinada através do rep-PCR. O sequenciamento NGS plataforma Illumina, o software Prokka e ferramentas do CGE foram utilizados para mapear os genes de resistência e determinar o tipo de NDM e de plasmídeos. Para a caracterização dos plasmídeos das duas espécies mais frequentes foi utilizado o sequenciamento de nova geração *short* e *long reads*, com montagem híbrida Illumina e Nanopore através do software Unicycler. O desenho dos plasmídeos foi realizado usando BRIG.

No nosso estudo, encontramos prevalência de 4% de bactérias NDM, a espécie predominante foi *K. pneumoniae* seguida de *Escherichia coli*. Foram encontrados oito perfis clonais de *K. pneumoniae*, os quais foram tipados por MLST. Os ST encontrados foram ST11, ST15, ST2640, ST340 e um novo ST descrito pelo nosso grupo, o ST15 foi prevalente. Para *E. coli* foi encontrado o ST744.

Sendo *K. pneumoniae* e *E. coli*, as bactérias produtoras de NDM mais prevalentes, neste trabalho tipamos os plasmídeos envolvidos nesta resistência, sendo o plasmídeo IncFII/Inc FIB (pKpQIL) e IncA/C respectivamente e descrevemos os contextos genéticos de dois transposons carreadores de *bla*_{NDM} destas espécies.

Micro-organismos NDM são um desafio para os estabelecimentos de saúde e mais estudos são necessários para entender sua disseminação.

Palavras-chave: carbapenemase, *bla*_{NDM}, plasmídeos, MLST, epidemiologia

Abstract

Antimicrobial resistance against these life-saving drugs is a major public health problem worldwide. New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) is a B1 metallo- β -lactamase able to hydrolyze nearly all β -lactams available, except aztreonam. Twenty-nine NDM variants have been identified in >60 species of 11 bacterial families, showing a variable carbapenemase activity between variants. *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* are the predominant carriers of *bla*_{NDM}. Several replicon type plasmids are implicated in *bla*_{NDM} carrying such as IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 and the new IncN e IncHI1. NDM-positive strains have been identified worldwide, with the highest prevalence in India, the Middle East, and the Balkans. Polymyxins combined with other agents as aminoglycosides remain the main antimicrobial treatment options. Medicines able to inhibit NDM producing bacteria have been found, but not yet approved for clinical use.

The aim of this study is the epidemiological and molecular characterization of NDM- producing isolates received by the central reference laboratory (LACEN/PR) since January 2013 until august 2018. Epidemiological data was accessed through laboratory environment management (GAL) using Elasticsearch. Minimal inhibitory concentration was performed using broth microdilution. Genetic similarity of predominant specie, *K. pneumoniae*, was determined using rep-PCR. Next Generation sequence Illumina was used to access resistant genes, typing of NDM gene and replicon typing using Prokka and CGE tools. Plasmid characterization was done using short and long-reads next-generation sequence and Unicycler for hybrid assembly. Graphical visualization was done using BRIG.

In our study, we found a prevalence of 4% of NDM-producing bacteria. The predominant species was *K. pneumoniae* followed by *E. coli*. Eight clonal profiles of *K. pneumoniae* were found, which of them were typed by MLST.

The sequence types found for *K. pneumoniae*, ST11, ST15, ST2640, ST340 and a new ST described by our group, being ST15 the most prevalent; for *E. coli* we have found que sequence type ST744.

The replicon type plasmids of *bla*_{NDM} found was IncA/C for *E. coli* and IncFII/Inc FIB (pKpQIL) for *K. pneumoniae*. We described the genetic context of the transposons carried by two strains selected between the most frequent species, *K. pneumoniae* and *E. coli*.

The continual evolution of resistant markers due to the selection pressure and their spread among the bacteria through horizontal gene transfer is one of the alarming threats to the health worker in the hospital settings to control infections.

NDM will remain a severe challenge in health care settings, and more studies on appropriate countermeasures are required.

Keywords: carbapenemase, *bla*_{NDM}, plasmid, MLST, epidemiology

Resumo popular

Os medicamentos da classe da penicilina são muito utilizados para tratar vários tipos de infecções, porém o aparecimento de bactérias em que estes antibióticos não têm ação é um sério problema de saúde pública. A New Delhi metalo- β -lactamase (NDM) é um modo que as bactérias podem usar para fugir da ação de muitos medicamentos disponíveis nos hospitais e nas farmácias. Existem 29 tipos de NDM descritos identificados em mais de 60 tipos de bactérias e elas podem ser mais ou menos afetadas pelos antibióticos usados pelos médicos. A *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli* são as bactérias mais encontradas dentre esse tipo de bactérias.

Bactérias produtoras da resistência NDM têm sido encontradas pelo mundo todo, com maior prevalência na Índia, no Oriente Médio, e na região dos Balcãs. O antibiótico polimixina, último medicamento que pode ser usado quando todos já estão sem ação, combinado com outros fármacos como a gentamicina ainda são tratamentos possíveis para as pessoas que desenvolvem infecções por essas bactérias. Novos medicamentos capazes de combater a NDM foram encontrados, porém, nenhum deles está aprovado para uso pelos médicos para tratamento de seus pacientes.

No levantamento feito de janeiro de 2013 e agosto de 2018, foi encontrado um total de 4% de bactérias NDM. A bactéria mais frequente foi *Klebsiella pneumoniae* e depois *Escherichia coli*. Foram encontrados oito tipos distintos de *Klebsiella pneumoniae*. Esses tipos foram classificados através de uma técnica mais moderna, a tipagem por sequenciamento genético, que separa as bactérias em tipos que podem ser comparados entre países diferentes.

Genes que podem ser transmitidos de uma bactéria para outra, chamados de plasmídeos, foram encontrados, classificados e comparados com os que existem em outras regiões.

O uso abusivo de antibióticos propicia que as bactérias que possuem genes que permitem fugir aos antibióticos se espalhem nos hospitais e nas infecções que ocorrem na comunidade. Este fato representa cada vez mais um desafio para a medicina tratar esses germes. É necessário que estes tipos de bactérias sejam sempre monitorados para que sua disseminação seja minimizada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Histórico e características fenotípicas	21
3.2 Características genotípicas	26
3.3 Plasmídeos.....	29
3.4 Sequence typing	31
3.5 Tratamento	31
4. OBJETIVO GERAL	34
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 Amostragem	35
5.2 Epidemiologia	35
5.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	36
5.4 Determinação da clonalidade pela técnica de Rep-PCR:	36
5.5 <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST):	37
5.6 Sequenciamento de nova geração (NGS):.....	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 Epidemiologia	39
6.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	42
6.3 Similaridade Genética	44
6.4 MLST	45
6.5 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	46
6.5.1 Sequenciamento Illumina	46
6.5.2 Sequenciamento Nanopore combinado com sequenciamento Illumina	46
7. CONCLUSÃO.....	54
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
9. ARTIGOS PUBLICADOS	57

9.1 Dissemination of NDM producing bacteria in South Brazil.	57
9.2 Distribution of genes encoding 16S-rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing Enterobacterales in Brazil.	63
9.3 Antagonistic effect between tigecycline and meropenem: from bed to bench to bed.....	67
9.4 A carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> outbreak associated with a polymyxin during the COVID pandemic: an <i>in vitro</i> and biofilm analysis of synergy between meropenem, gentamicin and sulbactam.	69
9.5 Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and KPC-producing <i>Enterobacterales</i>	69
9.6 Resistance of clinical and environmental <i>Acinetobacter baumannii</i> against quaternary ammonium.....	69
9.7 Resolving taxonomic confusion: establishing the genus <i>Phytobacter</i> on the list of clinically relevant <i>Enterobacteriaceae</i>	70
9.8 Evaluation of Microscan Walkaway for determination of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Susceibility in Carbapenem-Resistant Gram-negative Bacilli.	70
9.9 The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
9.10 Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods.	70
9.11 Identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas de hemoculturas de pacientes oncológicos e pesquisa de biofilme.....	71
9.12 Validation of multiplex PCR for de diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid.	71
9.13 Low level of polymyxin resistance among nonclonal mcr-1 positive <i>Escherichia coli</i> from human sources in Brazil	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS	84
Anexo 1 - Genes de resistência detectados em <i>Klebsiella pneumoniae</i> 11955RM.....	84
Anexo 2- Genes de resistência detectados em <i>Escherichia coli</i> 16211RM.....	85
Anexo 3 - Genes de resistência detectados em <i>Enterobacter hormachei</i> 20257RM.....	89

1. INTRODUÇÃO

A multirresistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema emergente no mundo todo, está presente em inúmeras espécies bacterianas, causando tanto infecções relacionadas aos serviços de saúde quanto ambulatoriais(1).

O aumento da resistência entre os gram-negativos é um exemplo importante de como as bactérias podem adquirir, manter e expressar novas informações genéticas adquiridas via elementos móveis que conferem resistência a um ou mais tipos de antimicrobianos (2).

Os carbapenêmicos são importantes antibióticos β -lactâmicos com comprovada ação contra quase todos os micro-organismos gram-negativos, porém a sua ação está ameaçada com a emergência das carbapenemases(3). A emergência da carbapenemase NDM-1(New Delhi Metallo- β -lactamase) é considerada um grande problema de saúde pública devido a sua grande velocidade de disseminação(4). Sua capacidade de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos e carrear outros tipos de resistência em plasmídeos, deixa poucas alternativas terapêuticas disponíveis. Este tipo de resistência espalha-se rapidamente para outras bactérias através de elementos genéticos móveis e também geograficamente entre pessoas, países e continentes, viajando através dos em pacientes que buscam atendimento médico fora do seu país de residência e (4). Pode-se afirmar que a *bla*_{NDM-1} é um gene epidêmico, dada a sua grande contribuição na falha terapêutica em *Enterobacterales* e outras bactérias resistentes a carbapenêmicos(5).

2. JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana se tornou uma das maiores ameaças à saúde pública, em particular quando se fala no aumento da resistência aos carbapenêmicos sendo uma preocupação particular, devido à falta de terapêutica efetiva e segura para o tratamento dessas infecções(6).

A compreensão dos mecanismos de resistência, dos elementos genéticos móveis que os codificam e da epidemiologia é necessária para a prevenção de novas infecções, diminuindo a morbimortalidade dos pacientes acometidos por elas. Os carbapenêmicos são potentes antibióticos de amplo espectro e são, ou deveriam ser, reservados para o tratamento de infecções que causam risco de vida aos pacientes (7). A efetividade dos carbapenêmicos está sendo continuamente comprometida devido à resistência promovida pelas β -lactamases com capacidade de hidrólise destes antimicrobianos, as também chamadas carbapenemases(8). Por essa razão a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos e mecanismos de resistência destes isolados é fundamental, para o estudo das opções terapêuticas disponíveis. A carbapenemase NDM-1, descrita em 2008, espalhou-se muito rapidamente pelo mundo, atraindo a atenção para o problema da resistência bacteriana(9). As bactérias produtoras de NDM causam uma variedade de infecções associadas com alta mortalidade(10). Elas podem ser encontradas no mundo inteiro, representando um desafio para o tratamento clínico e a saúde pública (11). Por esse motivo o estudo da sua disseminação é uma necessidade para seu entendimento.

A caracterização dos plasmídeos promove o conhecimento e análise do gene *bla*_{NDM-1} e seus elementos anexos, fornecendo um melhor entendimento dos aspectos epidemiológicos dos plasmídeos carreadores de genes de resistência(12). O tipo de plasmídeo (*replicon typing*) e características da bactéria hospedeira (ex. *sequence typing*)

são ferramentas importantes para inferir a disseminação dos determinantes da resistência antimicrobiana entre bactérias não relacionadas(13).

Este trabalho pretende mostrar os aspectos microbiológicos e epidemiológicos das bactérias produtoras de NDM assim como suas propriedades genéticas, sua distribuição entre as espécies e sua distribuição geográfica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

A NDM-1 é uma carbapenemase de classe B1, uma metalo- β -lactamase, descrita em 2009, em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* isoladas de um paciente da Suécia que havia sido transferido um dia antes de um hospital da Índia(14). A NDM-1 parece estar disseminada em todo subcontinente indiano, e em estudos retrospectivos (estudo SENTRY) foi encontrada em amostras isoladas desde o ano de 2006 (15). Os países da região dos Bálcãs parecem ser outro reservatório importante, porém está presente em todos os continentes (16,17). A disseminação da NDM se deu pelo mundo em curto período, sendo considerada endêmica em lugares como a Índia, Paquistão e Bangladesh. Há relatos do seu isolamento em vários países, como Estados Unidos, Canadá, Grécia, Colômbia, Brasil, Espanha, França, Inglaterra, Itália, Suíça, Turquia, Marrocos, Emirados Árabes, Kuwait, China, Japão, Taiwan, Coreia do Sul e Austrália(15,18). Na China, Emirados Árabes, Índia e Paquistão é a carbapenemase com maior prevalência(19). Em alguns países há a prevalência de *Acinetobacter baumannii*, enquanto em outros *Klebsiella pneumoniae* é a mais prevalente (20). Na América Latina o primeiro isolado foi em *Providencia rettgeri*. No Brasil foram reportados primeiramente em *Providencia rettgeri* e *Acinetobacter baumannii*(15,21). A disseminação ocorre tanto em surtos como através de elementos móveis entre bactérias (9).

Todas as bactérias descritas como prioritárias pela Organização Mundial de Saúde, tem potencial de serem produtoras de NDM, o que suscita atenção (61).

3.2 Características fenotípicas

Como todas as metalo- β -lactamases, ela possui a capacidade de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, porém, o monobactam aztreonam, apesar de ser β -lactâmico, não é hidrolisado. É inibida por quelantes de íons divalentes como o EDTA e ácido mercaptoetanóico e não é inibida pelo ácido clavulânico(2). Os inibidores de β -lactamase mais comuns, como o avibactam, clavulanato, sulbactam e tazobactam não são ativos contra NDM. Ocorre é mais prevalente em *Enterobacterales*, porém pode ser encontrada em não fermentadores de glicose e *Vibrionaceae*, em menor escala. A maioria das bactérias produtoras de NDM são resistentes a quase todos os antimicrobianos, além dos β -lactâmicos, sendo exceções a colistina, e os aminoglicosídeos(4).

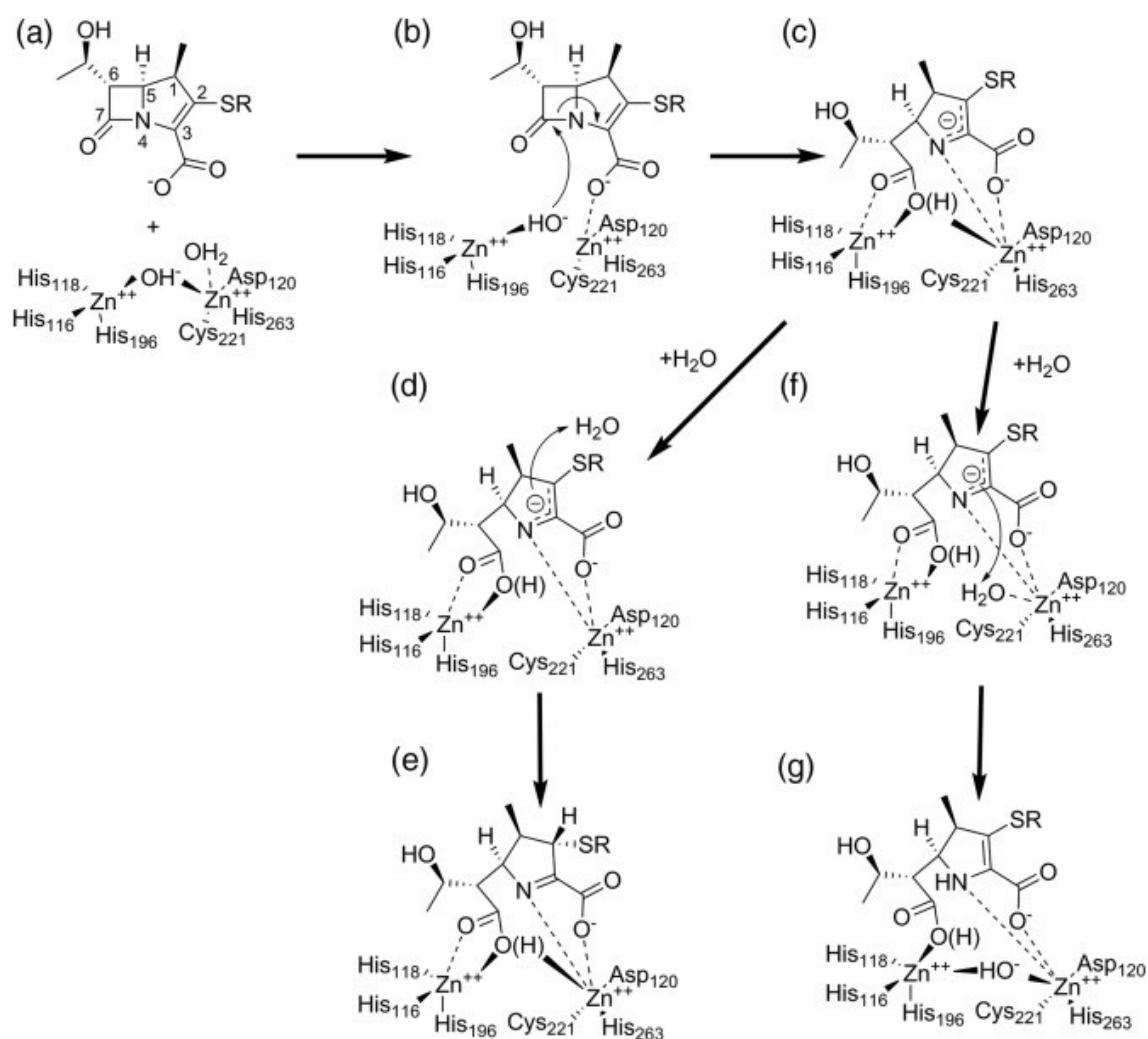


Figura 1 - Hidrólise de um β-lactâmico por uma metalo-β-lactamase binuclear da classe B.

Fonte: Tooke 2019

Como uma β-lactamase da subclasse B1, a NDM possui dois átomos de zinco no centro ativo, assim como a IMP (Imipenemase) e VIM (Verona Imipenemase) (5). Além de fazer parte do centro ativo, o zinco também ativa uma molécula de água, que doa um próton para gerar uma hidroxila para hidrólise do carbono do grupo carbonila do anel β-lactâmico(22) (Figura1). Como a identidade entre a NDM e IMP e VIM é de apenas 34% e 35% respectivamente, foi proposto um novo grupo entre a subclasse B, ficando a NDM na subclasse B1b, e as demais compondo a subclasse B1a (23).

A localização da NDM na célula bacteriana difere de todas as outras metalo- β -lactamases. Ela é uma lipoproteína ancorada na membrana externa das bactérias gram-negativas. Este fato tem sido atribuído à presença de uma sequência de aminoácidos de lipidação canônica, a LSGC (lipidobox), no final do seu sinal peptídico, que promove a sua ancoragem na membrana plasmática (24). Outras metalo- β -lactamases, diferentemente da NDM, se solubilizam no espaço periplasmático (25). A ancoragem da NDM aumenta a estabilidade da enzima, especialmente em baixas concentrações de zinco, que ocorre em locais de infecção pela secreção de calprotectina, uma proteína quelante de metais, pelo sistema imune. A ancoragem também facilita a secreção da enzima em vesículas (OMV), que podem carrear tanto a enzima NDM como o gene *bla_{NDM}* para outras células (17, 61).

A estrutura secundária da NDM contém 9 α -hélices, 17 cadeias β , e 3 giros e possui uma conformação $\alpha\beta/\beta\alpha$ da superfamília metalo-hidrolase/oxiredutase (Figura 3)(26). Substituições tem sido observadas em seus 269 aminoácidos, resultando em variantes distintas. Até o ano de 2022, um total de 29 variantes (NDM-1 a NDM-29) foram identificadas em várias espécies bacterianas em todo o mundo (Figura 2) (23).

As variantes apresentam entre 1 e 7 aminoácidos diferentes comparados com a NDM-1. Nenhuma das substituições são no centro ativo da enzima, porém algumas variantes exibem atividade alterada contra os β -lactâmicos. As variantes NDM-5, NDM-17, NDM-20, NDM-21 são possuidoras da substituição V88L e foram reportadas como exibirem 4 a 8 vezes mais atividade contra os carbapenêmicos(27).

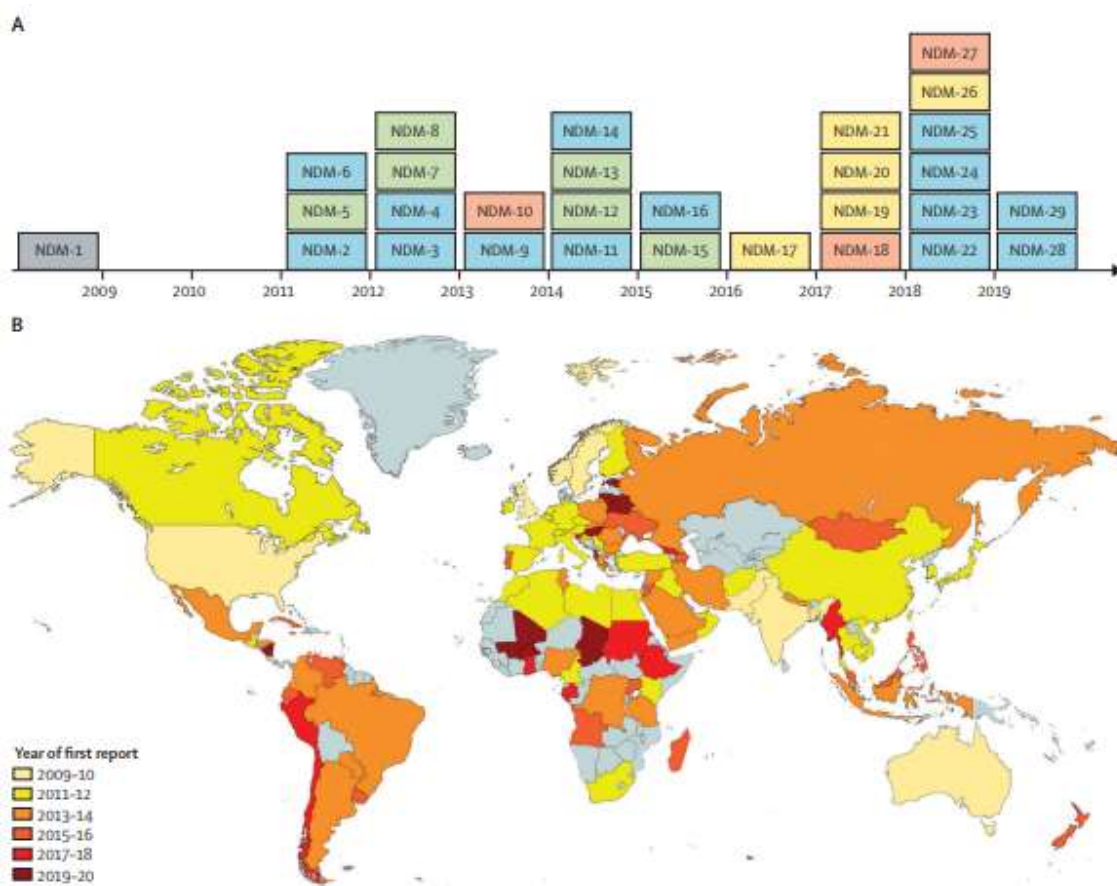


Figura 2- Evolução e disseminação da carbapenemase NDM.

(A) Linha do tempo do surgimento de variantes de NDM por ano. Número de substituições de aminoácidos comparado com NDM-1: uma (azul), duas (verde), três (amarelo), e cinco (vermelho). (B) Disseminação global de NDM carbapenemase. Seções cinza indicam áreas sem NDM reportadas. NDM-New Delhi metalo- β -lactamase.

Fonte: Mojica 2022

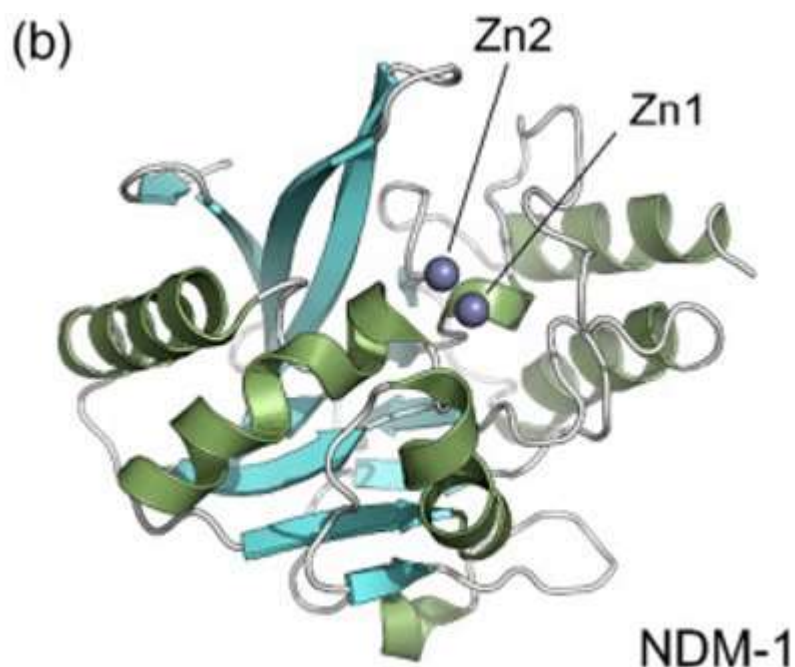


Figura 3 - Características moleculares das β -lactamases NDM-1.

Fonte: Tooke,2019.

3.3 Características genotípicas

Contexto genético do gene *bla*_{NDM}

A origem do gene *bla*_{NDM-1} é provavelmente quimérica e pode ter ocorrido em *Acinetobacter*(12,28). Molecularmente falando, a NDM-1 não se parece com outras carbapenemases, sendo a VIM-1/VIM-2 as mais semelhantes, apresentando apenas 32,4 % de similaridade(14). O gene *bla*_{NDM-1} codifica uma proteína monomérica de 269 aminoácidos com massa de aproximadamente 27,5 kDa(14). Diferente da maioria das β -lactamases, ele não é sempre carregado por um Integron de classe 1 (14)

O gene *bla*_{NDM-1} está presente em uma variedade de contextos genéticos, o que sugere que múltiplos mecanismos podem estar associados à mobilização deste gene. Algumas características são mantidas, como a sequência de inserção *IS**Aba*125 (intacta ou truncada) sempre *upstream* do gene e da resistência a bleomicina (*ble*MBL) sempre

downstream. Depois do gene *bleMBL*, há normalmente um conjunto completo ou remanescente de genes como o *trpF*, *dsbC* (também chamada de *tat*), *cutA1* (também chamada de *dct*), e *groES-groEL* além da a sequência de inserção ISCR27. A sequência IS*Aba*125 fornece a região promotora para a expressão da *bla*_{NDM-1}(29).

Em *Acinetobacter* spp., outro elemento IS*Aba*125 se encontra *downstream* de ISCR27, e dois elementos IS*Aba*125 formam um transposon composto, o Tn125 que carrega a *bla*_{NDM-1}. É provável que os componentes genéticos que compõe o transposon Tn125 tenham origens diferentes, e a seção *groES-groEL-ISCR27* pode ter sido originada de *Stenotrophomonas* spp. (30,31)

A análise do contexto genético e sequência por Toleman e colaboradores em 2012, sugere como pode ter sido formado o gene *bla*_{NDM-1} (Figura 4). Os primeiros 19 pares de bases que codificam os primeiros 6 aminoácidos de NDM-1 se originariam de um gene de resistência aos aminoglicosídeos, o *aphA6*. As demais sequências de nucleotídeos se originam a partir de um gene de metalo- β -lactamase ainda não identificada na época. É bastante provável que a fusão dos dois genes tenha ocorrido em *Acinetobacter* spp. uma vez que tanto a IS*Aba*125 e *aphA6* são achados comuns nesta bactéria(32). Os elementos ISCR são conhecidos por acumular componentes genéticos via círculo rolante(33).

O elemento ISCR27 pode ter adquirido o gene progenitor da *bla*_{NDM-1}(31,32) e o mobilizado juntamente com os genes *bleMBL*, *trpF*, *dsbC*, *cutA1* e *groES-groEL* em um gene *aphA6* (*downstream* da cópia de IS*Aba*125), permitindo a fusão e a formação da *bla*_{NDM-1}(31,32). A segunda cópia de IS*Aba*125 é inserida *downstream* do ISCR27 formando o transposon composto Tn125 no IS*Aba*125 (32).

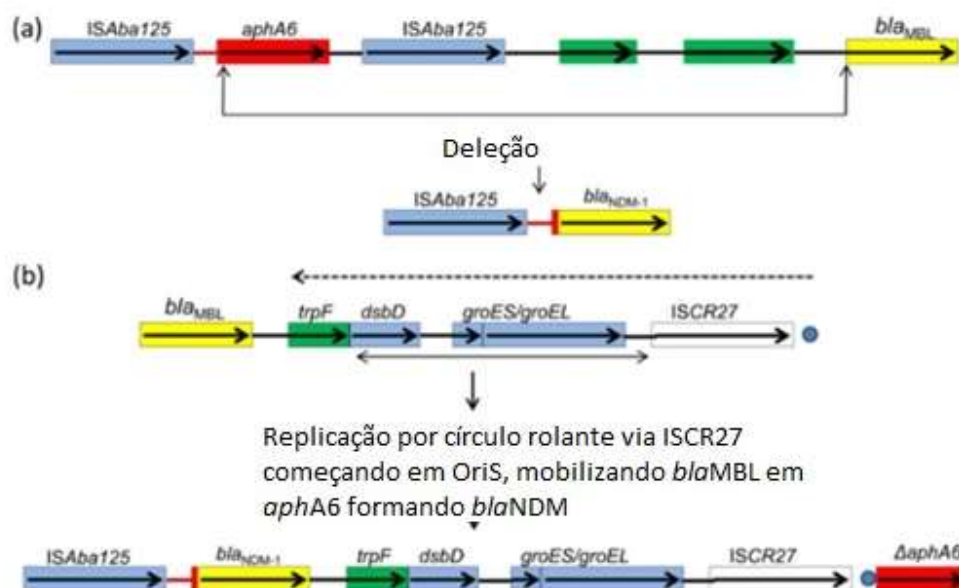


Figura 4 - Duas prováveis rotas de construção do gene *bla*_{NDM-1}.

(a) o gene *bla*_{NDM-1} pode ter sido construído via a deleção que ocorreu entre o transposon composto *aphA6-ISAbal25* e um gene de uma metalo-β-lactamase *bla*_{MBL}. Esse evento removeria todas as sequências entre as setas, incluindo a maioria da sequência de *aphA6* e toda sequência *upstream* a *bla*_{MBL} (b). Um evento de círculo rolante envolvendo elementos *ISCR27* começando no *oriS* mobilizaria o DNA *upstream* que inclui o *bla*_{MBL}.

O *Acinetobacter* spp. pode também, ter servido como um intermediário para a mobilização da *bla*_{NDM} para as *Enterobacterales* (31). O elemento Tn125 que carrega o gene *bla*_{NDM} é interrompido ou truncado em *Enterobacterales*, gerando uma variedade de contextos genéticos complexos. Essa interrupção acontece pela inserção de diversos elementos genéticos móveis como IS1, IS5, IS26, IS903, ISEc33 e ISKpn14 entre outros e uma recombinação. As sequências flanqueadoras remanescentes de Tn125 formam mecanismos de mobilização do gene *bla*_{NDM}. Estes mecanismos incluem um número de transposons compostos formados por duas cópias da mesma sequência de inserção como a IS26, IS90 e IS3000. A duplicação do gene no mesmo plasmídeo se dá pela ação de um transposon composto formado pela IS26(34).

A mobilização do gene *bla_{NDM}* pode ser associada com outra sequência de inserção, a ISCR1. Duas cópias em tandem, repetidas, foram encontradas no cromossomo de *Escherichia coli* na China e *Pseudomonas aeruginosa* na Sérvia(35). Em ambos os casos, as cópias em tandem de *bla_{NDM}* são associadas com a ISCR1, que utiliza o círculo rolante de transposição e pode gerar duplicações em tandem (seguidas) de suas sequências mobilizadas via recombinação homóloga(33).

3.4 Plasmídeos

O gene *bla_{NDM-1}* normalmente está relacionado à plasmídeos, com IncX3, IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 e IncN. Estas estruturas são relacionadas com a disseminação não clonal do gene. Os plasmídeos IncA/C são particularmente importantes por serem capazes de se replicar em *Pseudomonas spp.* e outras espécies, além das *Enterobacterales*. Os plasmídeos deste grupo carregam múltiplos genes, conferindo resistência a aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfá/trimetoprim, além de enzimas de restrição, metilases e sistemas que promovem a manutenção e sobrevivência no citoplasma bacteriano(44, 45).

Embora o gene esteja presente em cromossomos em alguns casos, a grande maioria está presente em plasmídeos o que facilita grandemente a sua transmissão(45). Wu e colaboradores determinaram os tipos de replicon envolvidos com o gene *bla_{NDM-1}* utilizando 355 sequências completas de plasmídeos depositados no GenBank até 2018. Eles encontraram a *bla_{NDM-1}* em 21 tipos de plasmídeos: IncC, IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFII, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL/M, IncP, IncR, IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY, and ColE10, o que sugere múltiplas aquisições de vários plasmídeos, (Figura 5)(46).

espectro estendido, estes plasmídeos têm sido associados recentemente com carbapenemases em *Enterobacterales*. A sua grande versatilidade intracelular e rápida evolução das sequências permitiu que se espalhassem entre as enterobactérias(78)v. Esse fato é mostrado na maioria dos estudos de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtores de NDM-1 em diferentes países(77).

3.5 Sequence typing

Os STs mais reportados como *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM foram os ST11, ST290, ST147, ST340, ST15, ST278 e ST14(49). Em 2014 foi reportado no mediterrâneo, na Grécia, um surto com predomínio de ST11, vindo provavelmente da região dos Balcãs. Esse ST também foi reportado como sendo o predominante em um estudo da China(50,51).

3.6 Tratamento

As bactérias produtoras de carbapenemase são muitas vezes resistentes à maioria dos β -lactâmicos e também a muitos dos antibióticos de outras classes, sendo assim, as opções terapêuticas para tratamento destes isolados muitas vezes limita-se a polimixina B, a fosfomicina, a tigeciclina e alguns aminoglicosídeos como a plazomicina(19).

A plazomicina é um fármaco semissintético, derivado da sisomicina(52), o qual foi modificada estruturalmente para não sofrer ação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (com exceção da AAC(2') -I) (53). A resistência a plazomicina, assim como a outros aminoglicosídeos, se dá via 16S rRNA metiltransferases. Ela apresenta-se como uma opção terapêutica viável para infecções do trato urinário por micro-organismos produtores de carbapenemases(54). Um estudo feito no Brasil constatou a sua sensibilidade em isolados produtores de carbapenemases em 87% dos isolados. As

enzimas metilases foram encontradas em 75% dos produtores de NDM-1 na Europa, o que representa um dado importante de resistência, associado à presença dos genes de metilases nos plasmídeos carreadores de *bla*_{NDM-1}(58). A atividade *in vitro* da plazomicina utilizado sozinha ou em combinação com colistina, meropenem, fosfomicina e tigeciclina também foi testada resultando em efeitos sinérgicos com os primeiros três, porém não com a tigeciclina(60).

A necessidade de um inibidor específico para ser utilizado na clínica para tratar isolados produtores de NDM e outras metalo- β -lactamases é urgente. Uma vez que os últimos medicamentos lançados só inibem serina carbapenemases, há a seleção dos isolados produtores de metalo- β -lactamases (62). Diferente das serina carbapenemases, que são enzimas exclusivamente bacterianas, as metalo- β -lactamases pertencem à superfamília das metaloproteínas com diversas funções biológicas além da hidrólise de β -lactâmicos. Estas enzimas compartilham a forma das proteínas, o que resulta em centros ativos similares. Isso explica o porquê do L-captopril (inibidor da enzima conversora da angiotensina) inibir as metalo- β -lactamases. O desafio é criar um inibidor que não interfira nas enzimas que não são o seu alvo. Hoje em dia, não existem inibidores aprovados capazes de inibir metalo- β -lactamases para uso clínico, porém novas perspectivas como o Taniborbactam 46, QPX772847, Aspergilomarasmina A e L-bisthiazolidina são novos compostos de boronato que são efetivas contra as metalo- β -lactamases do tipo B1 (Figura 8). Estes compostos estão na fase 3 e 1, sendo propostas promissoras, porém estas drogas podem demorar para chegar ao mercado e ainda podem ter alguns problemas associados a eles, o que pode impedir seu uso clínico. O seu mecanismo de ação não é completamente conhecido: algumas enzimas do tipo B1 são menos inibidas ou não inibidas como SPM e IMP, e elas não são ativas contra a classe B3 como por exemplo a L1 de *Stenotrophomonas* spp. (62).

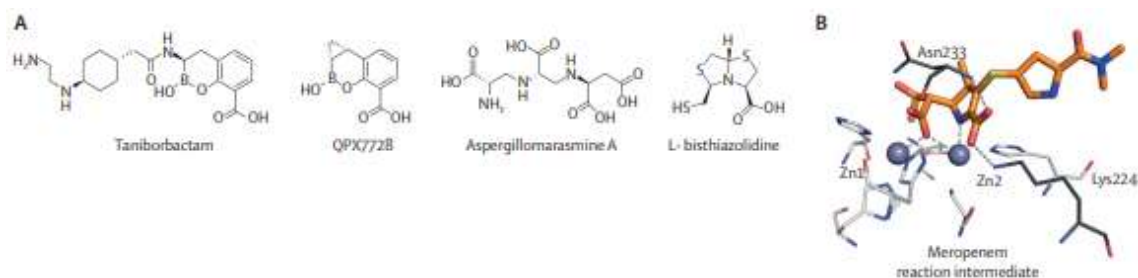


Figura 1: Inibidores de metalo- β -lactamase e sua estrutura

Fonte: Mojica, 2022

Não há consenso no tratamento de infecções por micro-organismos produtores de carbapenemase NDM devido a diversidade de mecanismos de resistência presentes nos plasmídeos carreadores. A terapia com colistina tem sido utilizada ultimamente como uma das drogas de escolha, porém as implicações produzidas pela sua toxicidade e a ausência de esquemas com doses otimizadas limita seu uso(63,64).

Autores tem relatado sucesso no tratamento infecções causadas por micro-organismos produtores de NDM utilizando a ceftazidima-avibactam associada ao aztreonam. A efetividade deste tratamento se dá pela proteção contra hidrólise causada por enzimas ESBL ou AmpC ao aztreonam, garantindo a sua efetividade para tratamento das infecções. Como os plasmídeos que carregam a NDM, frequentemente trazem outras β -lactamases, o tratamento se mostra efetivo, visto que o aztreonam tem ação contra micro-organismos produtores de NDM, porém é suscetível à hidrólise por β -lactamases do grupo A e C (59).

4. OBJETIVO GERAL

Descrever as características epidemiológicas e moleculares dos micro-organismos produtores de metalo- β -lactamase NDM identificados nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul entre janeiro de 2013 e agosto de 2018.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a epidemiologia (sítio de infecção, espécies, cidade) dos micro-organismos produtores de metalo- β -lactamase NDM em bactérias de origem hospitalar enviadas para pesquisa de carbapenemases.

- Determinar a concentração inibitória mínima dos isolados produtores de NDM aos principais fármacos utilizados para tratamento de infecções por micro-organismos multirresistentes.

- Estudar a similaridade genética entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM através da técnica de rep-PCR.

- Realizar a tipagem por Multi-Locus Sequence Typing dos clones de *Klebsiella pneumoniae* encontrados por repPCR.

- Avaliar os componentes dos plasmídeos presentes nos micro-organismos produtores de *bla*_{NDM} através de sequenciamento de nova geração (NGS).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Amostragem

O estudo utilizou isolados bacterianos de uma coleção de culturas enviados por estados da região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) ao Laboratório Central do Estado do Paraná LACEN/PR no período de 01 de janeiro de 2013 a 31 de agosto de 2018. Todos os isolados enviados por esses estados são processados, confirmada a identificação, teste de sensibilidade e são testados via qPCR multiplex para carbapenemases. Os hospitais realizam a identificação e o teste de sensibilidade (automatizado) aos carbapenêmicos dos micro-organismos suspeitos de produção de carbapenemases, e enviam seus isolados que apresentam resistência aos carbapenêmicos para o LACEN/PR. Todos os isolados enviados foram testados quanto a identificação bacteriana por espectrometria de tempo de dessorção a laser assistida por matriz (MALDI- TOF) e quanto à presença do gene *bla*_{NDM} utilizando-se qPCR como rotina do laboratório. As amostras foram selecionadas aleatoriamente e por conveniência, para que todas as cidades envolvidas obtivessem ao menos uma tipagem bacteriana. No caso de mais de um isolado por cidade, foram selecionadas por sítio anatômico mais representativo de infecção (sangue, líquido, urina, trato respiratório, outros).

5.2. Epidemiologia

Os dados epidemiológicos das populações afetadas por infecção/colonização por bactérias produtoras de NDM, assim como dados de identificação, sensibilidade aos antimicrobianos foram acessados através da ferramenta de visualização de dados Kibana (MS, Brasil), baseado na plataforma *Elasticsearch*, alimentado por dados obtidos no

software GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial) do Ministério da Saúde/DATASUS (65).

5.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo conforme descrito pelo CLSI (2019) para os seguintes antimicrobianos: plazomicina, gentamicina, meropenem, ampicilina, colistina, ceftazidima, ceftazidima/avibactam, imipenem, imipenem/relebactam, cefepime e ciprofloxacino. Todos os testes foram realizados em triplicata. O controle de qualidade foi realizado utilizando *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 como cepas padrão. Foi determinada a CIM de um representante de cada clone encontrado em *Klebsiella pneumoniae* e um representante aleatório de cada espécie bacteriana não *Klebsiella* spp.

5.4 Determinação da clonalidade pela técnica de Rep-PCR:

Para a análise da clonalidade, foi utilizada a técnica de rep-PCR em 213 isolados da espécie bacteriana predominante (*Klebsiella pneumoniae*). Para fins de amostragem para o rep-PCR de *Klebsiella pneumoniae*, realizou-se o cálculo amostral utilizando-se 90% de confiança e 5% de erro. A amplificação foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para sequências repetitivas não codificadoras presentes nos cromossomos bacterianos utilizando kit Diversilab (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France), AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystems) e DNA ultrapuro extraído utilizando o kit MO Bio UltraClean kit (Carlsbad, CA, USA) segundo orientação dos

fabricantes. A sequência dos primers não é divulgada pelo fabricante por se tratar de segredo industrial. Após a amplificação, foi realizada a leitura dos amplicons no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A análise dos perfis gerados foi realizada utilizando-se o software Bionumerics através da correlação de Pearson sendo o coeficiente de similaridade de 95% para fins de análise da similaridade genética.

5.5 Multi Locus Sequence Typing (MLST):

A tipagem MLST das *Klebsiella pneumoniae* foi realizada segundo protocolo 2 como descrito por Dilancourt et al., utilizando sequenciamento Sanger, no aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems, Waltham, MA). As sequências obtidas foram submetidas à base de dados do MLST na página do Instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) para a determinação do *sequence type* (ST) (23). Os isolados escolhidos para tipagem plasmidial foram submetidos a NGS (Next Generation Sequence) tiveram seu MLST acessado através do site CGE (Center for Genomic Epidemiology). Foram tipados pelo menos um representante das amostras em que foi encontrada alta similaridade molecular (clone) nas análises de rep-PCR para os isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

5.6 Sequenciamento de nova geração (NGS):

O sequenciamento de nova geração Illumina foi realizado em três isolados produtores de NDM (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter hormachei*).

A extração e purificação do material genético dos isolados bacterianos foram realizados utilizando-se o kit UltraClean MOBio (Carlsbad, CA) e realizado o sequenciamento de nova geração utilizando-se o sequenciador MiSeq (Illumina) para os *short-reads* e MinION (Oxford Nanopore, Oxford, United Kingdom) para os *long reads* segundo as orientações dos fabricantes. O assembly *de novo* dos *contigs* Illumina foi realizado utilizando-se o software SPADIS v2.1.3 com parâmetros originais e correção manual (*mismatch correction*).

A Montagem Híbrida *de novo* foi realizada através do software Unicycler v0.4.7 usando parâmetros originais e com verificação manual (*mismatch correction*). A anotação foi realizada utilizando-se o software Prokka v1.14.5. O estudo dos genes de resistência foi realizado utilizando CARDS e ResFinder. A tipagem dos plasmídeos foi acessada através da ferramenta PlasmidFinder. As análises das sequências geradas pelo sequenciamento de nova geração, o assembly híbrido e a anotação foram realizadas em convênio com a ZHAW Zurich University of Applied Sciences, Suíça, laboratório de Ciências Naturais (IUNR).

O estudo dos plasmídeos carreadores de *bla*_{NDM} através de montagem híbrida (Illumina e Oxford Nanopore) foi realizado em isolados de duas espécies, as mais frequentemente reportadas, (*Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*). A amostra de *Klebsiella pneumoniae* foi escolhida aleatoriamente entre o ST prevalente (ST15) e a amostra de *Escherichia coli* aleatoriamente entre as amostras disponíveis.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Epidemiologia

Foram analisadas 10.684 requisições de pacientes de 01 de janeiro de 2013 a 31 de agosto de 2018 recebidas da região Sul, Paraná (8.282), Santa Catarina (2.825), Rio Grande do Sul (267). Dos isolados recebidos, 8.904 (83,33 %) apresentaram-se positivos para alguma carbapenemase, sendo 478 (4,47%) positivos para o gene *bla*_{NDM}.

O programa SMART de vigilância mostrou prevalência de 0,28% de NDM-1 em 103.960 isolados sendo que alguns países mostram altos índices de positividade como 5,01% nos Emirados Árabes, 6,15% no Egito e 6,22% na Índia(66). Nossos dados não são comparáveis com o estudo SMART uma vez que mostram a positividade entre isolados triados como resistentes a carbapenêmicos, e não em uma população inteira de isolados, porém pode ser comparado com estudo um realizado na China, que mostrou positividade de 31% entre as enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em 2017, e também o EuSCAPE que mostrou que 7,7% das *Klebsiella pneumoniae* e 10,3% das *Escherichia coli* resistentes a carbapenêmicos eram produtoras de NDM-1(50,67).

Cinquenta e três por cento (53%) dos isolados recebidos eram provenientes de amostras clínicas, sendo as amostras mais frequentes: urina (n=122;48%), sangue (n=37;14%), aspirado traqueal (n=40;16%), líquidos estéreis (n=11;4%), outras (n=46;18%).

Dos micro-organismos isolados produtores de NDM (Tabela 1), 69% (329) foram identificados como *Klebsiella pneumoniae*, 10 % (47) *Escherichia coli*, 8% (37) Complexo *Enterobacter cloacae*, 4% (17) *Klebsiella oxytoca*, 4% (17) *Citrobacter freundii*, 2% (11) Complexo *Acinetobacter baumannii*. Os demais micro-organismos

representaram 1% ou menos do total sendo eles: (4) *Klebsiella aerogenes*, (3) *Pseudomonas aeruginosa*, (3) *Serratia marcescens*, (3) *Citrobacter* sp., (2) *Leclercia adecarboxylata*, (2) *Morganella morganii*, (1) *Acinetobacter lwoffii*, (1) *Klebsiella ozaenae* (1) *Proteus mirabilis*, (1) *Proteus vulgaris*, (1) *Raoultella ornithinolytica* e (1) *Raoultella planticola* (1).

Embora o gene *bla*_{NDM} tenha sido identificado em *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp., outros patógenos raros foram identificados como produtores de NDM. Esses patógenos são considerados receptores do gene *bla*_{NDM} e de baixo risco de disseminação clonal.

Tabela 1 - Gênero e espécie dos isolados bacterianos produtores de NDM.

Familia	Gênero e espécie	Isolados NDM	
		n	%
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	49	10.1%
	<i>Citrobacter freundii</i>	16	3.3%
	<i>Citrobacter</i> sp.	3	0.6%
	<i>Citrobacter youngae</i>	1	0.2%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	333	68.5%
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	17	3.5%
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	4	0.8%
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0.2%
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0.2%
	<i>Raoultella planticola</i>	1	0.2%
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	37	7.6%
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	0.4%
<i>Yersiniaceae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2	0.4%
<i>Morganellaceae</i>	<i>Morganella morganii</i>	2	0.4%
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.2%
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0.2%
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0.6%
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	2.3%
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	0.2%
Total		486	100%

Fonte: a autora.

A maioria dos casos concentrou-se na capital do estado de Santa Catarina (153), seguido pelo estado do Rio Grande do Sul, cidade de Caxias do Sul, com 76 casos e da capital do estado do Paraná, Curitiba com 55 isolados positivos. A capital do estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, apresentou 27 casos positivos (Figura 6).

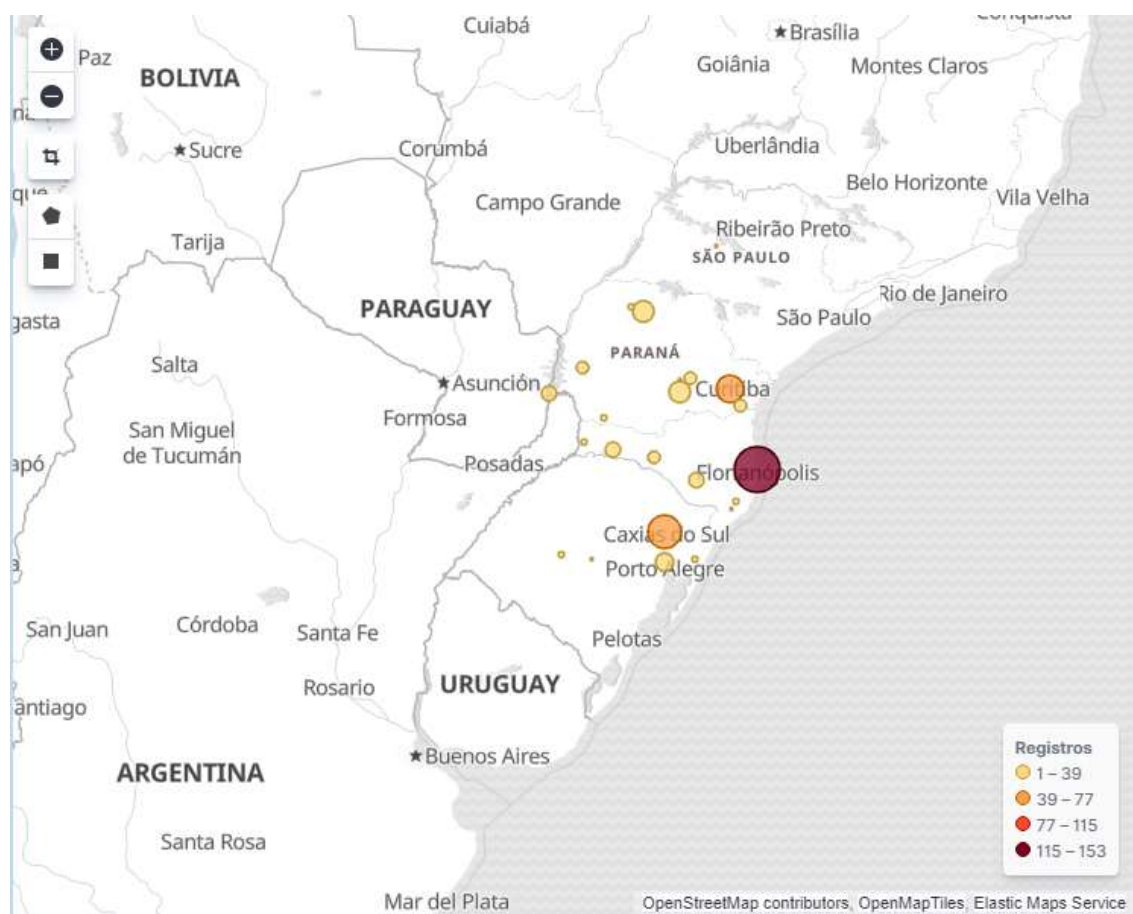


Figura 6- Distribuição da carbapenemase NDM encontrada em nas espécies citadas na Tabela 1, nos estados do Sul do Brasil.

Fonte: a autora

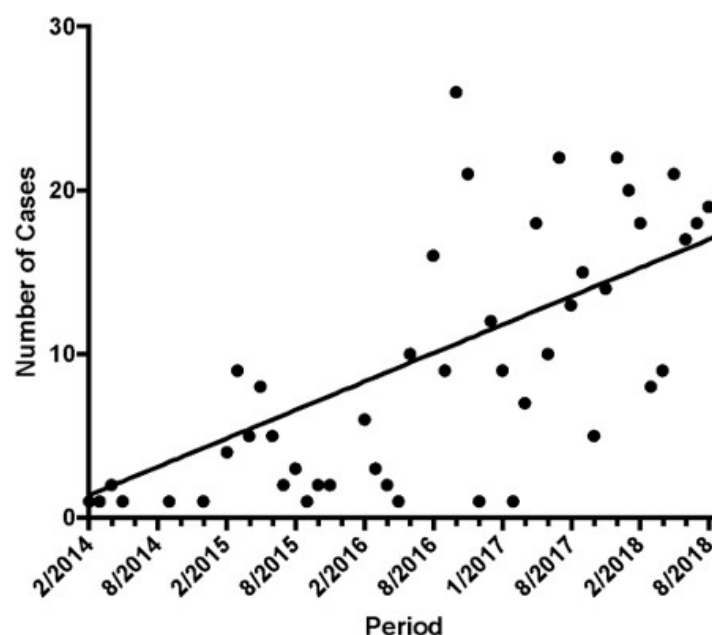


Figura 7- Aumento em progressão aritmética para bactérias produtoras de NDM.

A incidência de NDM mostrado em nosso estudo, aumentou consideravelmente, em progressão aritmética, como podemos notar pela Figura 7, e varia de cidade para cidade, mostrando a ocorrência de surtos de disseminação clonal nestes locais. O uso de antibióticos carbapenêmicos pode ser indicado como a causa da emergência destes micro-organismos (68).

6.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A atividade e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para os 26 isolados de *Enterobacteriales* (uma foi excluída da análise por falta de viabilidade e uma por perda de plasmídeo) estão descritos na Tabela 2. Os antimicrobianos com as maiores taxas de sensibilidade foram amicacina (92% pelo CLSI e 72% pelo BrCAST/EUCAST), plazomicina (85% pelo FDA) e colistina (72% pelo BrCAST/EUCAST). No entanto, plazomicina e colistina (CIM₅₀ de 0,25 µg/mL) foram dezesseis vezes mais potentes (*in*

vitro) que amicacina (CIM₅₀ de 4 µg/mL). Gentamicina e ciprofloxacino foram pouco ativos, 40% e 19% de sensibilidade, respectivamente. Como esperado, baixa ou nenhuma atividade foi mostrada pelos beta-lactâmicos (ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem), associados ou não aos novos inibidores de β-lactamase.

Tabela 2 - Atividade in vitro dos antimicrobianos contra isolados de *Enterobacteriales* e *Acinetobacter* spp.

Microrganismo	PLZ	GEN	MEM	AMI	COL	CAZ	CAZAVI	IMI	IMIREL	CPM	CIP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	≤0,25	≤0,25	1	0,125	0,5	≤0,06	1	0,5	≤0,5	≤0,06
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	64	128	8	>32	>128	>32	128	>32	>256	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	128	16	16	0,125	>128	>32	64	>32	64	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>64	>128	8	>256	0,25	>128	>32	32	32	32	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	0,5	4	16	0,25	>128	>32	8	8	32	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	128	64	8	0,25	>128	>32	128	>32	>256	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	0,5	4	8	0,125	>128	>32	16	16	32	2
<i>Enterobacter hormachei</i>	0,25	32	8	2	≤0,06	>128	>32	32	32	64	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	64	16	16	16	>128	>32	32	32	128	>32
<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,5	16	8	0,125	>128	>32	32	32	128	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25	≤0,25	8	1	0,125	>128	>32	16	16	32	≤0,06
<i>Leclercia adecarboxilata</i>		0,5	0,5	1	2	>128	>32	8	8	16	0,5
<i>Morganella morganii</i>	0,5		2		>32	>128	>32	8	8	>256	0,25
<i>Raoutella ornithinolitica</i>	0,25	32	16	8	0,125	>128	>32	32	32	32	16
<i>Raoutella planticola</i>	0,25	16	8	2	0,125	>128	>32	32	32	32	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	>128	>128	32	0,125	>128	>32	>128	>32	>256	>32
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4	64	128	16	2	>128	32	128	>32	>256	32
<i>Citrobacter freundii</i>	0,25	16	16	4	0,25	>128	>32	32	32	32	>32
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	>128	>128	4	2	>128	>32	>128	>32	128	>32
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,25	≤0,25	16	2	0,125	>128	>32	32	32	32	0,5
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0,5	8	4	2	0,125	>128	>32	16	16	64	>32
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1	8	4	>32	>128	>32	128	>32	128	≤0,06
<i>Serratia marcescens</i>	1	32	2	32	>32	>128	>32	4	4	>256	>32

Fonte: a autora.

A sensibilidade de quatro (4) bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose (2 *Acinetobacter* spp. e 2 *Pseudomonas aeruginosa*) também foi avaliada. A colistina foi o único antimicrobiano ativo para os 4 isolados. A CIM foi de 0,125 µg/mL para *A. baumannii*, 2 µg/mL para *A. lwoffii* e 0,5 µg/mL para as duas amostras de *P. aeruginosa*.

Historicamente, as *Enterobacterales* apresentavam-se bastante sensíveis aos antibióticos carbapenêmicos, porém, as carbapenemases, encontradas com frequência em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, emergiram a partir de 1990, causando falha terapêutica. Vários antimicrobianos e inibidores de β-lactamases foram desenvolvidos para tentar mitigar a ação das carbapenemases, porém grande maioria das lançadas até hoje, são ativas somente para as serino-β-lactamases, não sendo ativas contra as metalo-β-lactamases(6). Como podemos observar na tabela 2, não encontramos ação dos antimicrobianos β-lactâmicos nos nossos isolados.

O maior desafio associado às infecções associadas às enterobactérias produtoras de NDM é a falta de opções terapêuticas. Somente a polimixina e aminoglicosídeos mostram atividade, porém estes são antimicrobianos que podem causar dano renal agudo(69) e as polimixinas são drogas que apresentam dificuldade de atingir os alvos farmacodinâmicos e farmacocinéticos. A monoterapia com aminoglicosídeos também tem sido questionada (70). A plazomicina seria uma opção promissora, porém ainda não é disponível no Brasil e não existem estudos clínicos em pacientes críticos(71).

Tabela 3- MIC₅₀ e MIC₉₀ de *Enterobacterales* produtores de NDM.

	PLZ	GEN	MER	AMI	COL	CAZ	CAZ/AV I	IMI	IMI/RE L	CFP	CIP
CIM (µg/mL)											
CIM ₅₀	0,25	16	8	4	0,25	>128	>32	32	32	64	16
CIM ₉₀	4	128	32	16	>32	>128	>32	128	>32	>256	>32
Sensibilidade (n/%)											
CLSI	-	10 (40%)	1 (4%)	23 (92%)	-	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (19%)
BrCAST	-	10 (40%)	6 (23%)	18 (72%)	18 (72%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (19%)
FDA	22 (85%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

PLZ, plazomicina; GEN, gentamicina; MER, meropenem; AMI, amicacina; COL, colistina; CAZ, ceftazidima; CAZ/AVI, ceftazidima/avibactam; IMI, imipenem; IMI/REL, imipenem/relebactam; CFP, cefepime; CIP, ciprofloxacino; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; BrCAST, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; FDA, Food and Drug Administration; CIM₅₀, concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados bacterianos; CIM₉₀, concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados bacterianos; NA, não avaliado.

Fonte: a autora.

6.3 Similaridade Genética

Das 213 amostras de *Klebsiella pneumoniae* selecionadas para análise de similaridade genética por rep-PCR, conforme observamos na Figura 8, foram encontrados 8 clones, totalizando 101 amostras clonais. Estes receberam o nome de Clone Z (14 amostras), K (7 amostras), B (17 amostras), E (27 amostras), N (4 amostras), A (23 amostras), H (3 amostras), e D (3 amostras). As demais amostras realizadas apresentaram baixo grau de similaridade entre si e foram consideradas amostras isoladas.

A similaridade genética das *Klebsiella pneumoniae* mostrou que a disseminação dos isolados produtores de NDM é mista, apresentando perfil vertical e horizontal associados. A determinação da variabilidade de clonal quando se tem uma população grande de isolados é importante para evitar que apenas um clone seja caracterizado (84).



Figura 8- Similaridade genética de *Klebsiella pneumoniae* por rep-PCR.

Fonte: A autora.

6.4 MLST

Os STs de *Klebsiella pneumoniae* NDM encontrados em nosso estudo pertencem ao ST15 (44 isolados), ST11 (27 isolados), ST1866 (3 isolados), ST2640 (3 isolados), ST340 (4 isolados) e um ST novo (14 isolados), ainda não descrito. Foi observado predomínio dos ST15 e ST11. Um resultado semelhante foi reportado por Wu e Zhang, que descrevem prevalência em *Klebsiella pneumoniae* NDM dos ST11, ST14, ST15 e ST147(46,50). Safavi reportou em 2020 que os ST11, ST15, ST147 e ST340 são os mais reportados pelo mundo todo, porém, dependendo do país uma grade variedade de STs podem ser encontrados. Diferente do que encontramos, o ST15 é predominantemente

associado com KPC na China. Os ST11 e ST340 em NDM são reportados como predominantes na Europa, enquanto o ST15 é predominante na Ásia e em menor grau na Europa (49).

O isolado de *Escherichia coli* pertence ao ST744. Diferente do reportado na literatura com predomínio de ST167, ST410 e ST617, porém como viés, nossa amostra foi escolhida aleatoriamente entre os isolados de *Escherichia coli*, portanto, não podemos afirmar ser esse ST o predominante na nossa população estudada (72).

6.5 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Foi realizado o sequenciamento de nova geração Illumina nos isolados 11955RM (*Klebsiella pneumoniae*), 16211RM (*Escherichia coli*) e 20257RM (*Enterobacter hormachei*).

6.5.1 Sequenciamento Illumina

Através do sequenciamento Illumina encontramos vários mecanismos de resistência nas amostras de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter hormachei*. Os genes e mecanismos encontrados estão listados nos anexos 1,2 e 3.

O tipo de NDM encontrado no sequenciamento genético das três amostras foi o NDM-1 (75).

6.5.2 Sequenciamento Nanopore combinado com sequenciamento Illumina

Para *Enterobacter hormachei* não foi possível realizar a montagem híbrida, por isso a análise do plasmídeo se reduziu à sua tipagem, pertencente ao replicon type IncX3.

Para *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, os *short-reads* (Illumina) foram complementados pelo sequenciamento *long-reads* (Nanopore) e montagem híbrida do genoma.

Foram encontrados no isolados 11955RM (*Klebsiella pneumoniae*), o cromossomo bacteriano e 5 plasmídeos:

Tabela 4 -Cromossomo e conteúdo dos plasmídeos de *Klebsiella pneumoniae* 11955RM.

Elemento	Pares de bases	Genes encontrados
Cromossomo	5'360'334 bp	
Plasmídeo 1	192'965 bp	resistência a cobre, prata, arsenato, Fe-dicitrato, Tra, RepB e transposases
Plasmídeo 2	121'321 bp	RepA, <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-18} , <i>ant1</i> , <i>aacA4-1</i> , CTX-M-1, <i>aphA2</i> , <i>bla</i> _{NDM-1} , Bleo, Tra, transposases
Plasmídeo 3	67'151 bp	<i>cat</i> , <i>bla</i> _{OXA1} , <i>aacA4-2</i> , <i>ctxM1</i> , <i>tetA</i> , <i>EcoRII</i> , <i>neo</i> , <i>folP2</i> , <i>tmrB</i> , resistência ao mercúrio, RepE
Plasmídeo 4	11'145 bp	<i>rop</i>
Plasmídeo 5	5'252 bp	<i>mbeC</i>

Fonte: A autora.

O plasmídeo 2, carreador do gene *bla*_{NDM-1} foi classificado como um plasmídeo híbrido IncFII/Inc FIB(pKpQIL). Esses tipos de plasmídeos já foram descritos em Mianmar na África do Sul(76).

O plasmídeo encontrado no nosso estudo, possui o replicon type IncFIIB e IncFI caracterizando-o como plasmídeo híbrido, com a presença de mais de um *replicon type* provavelmente para o início da replicação (79). Essa é uma importante característica dos

Klebsiella pneumoniae, vários grupos de replicons de plasmídeos tem sido descritos em isolados produtores de NDM-1 na Austrália, China, México e Vietnam, incluindo IncF (como achamos no nosso estudo), IncR, Encol, L/M e A/C(77).

IncF é o plasmídeo mais frequentemente descrito, sendo em humanos ou animais, sendo encontrado muitas vezes em *Escherichia coli*. São carreadores de genes de ESBL e carbapenemases(47).

Wu e colaboradores encontraram até 2018, 99 tipos de plasmídeos carreadores de *bla*_{NDM} IncFII, sendo a maioria associado a IncFIIB, assim como encontramos no nosso estudo(45).

A primeira ocorrência de plasmídeo IncF(pKpQIL) em *Klebsiella pneumoniae* ST258 foi reportada por Villa e colaboradores, sendo um plasmídeo de 113kb pertencente ao grupo de replicon IncFII(78). Desde essa publicação, os plasmídeos IncF tem sido citado como responsáveis por disseminar NDM e também KPC em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*(28,81,82).

Na análise do isolado 16211RM (*Escherichia coli*) foram encontrados o cromossomo bacteriano e 2 plasmídeos:

Tabela 5 - Cromossomo e conteúdo dos plasmídeos de *Escherichia coli* 16211RM.

Elemento genético	Pares de bases	Genes encontrados
Cromossomo	4'679'988 bp	
Plasmídeo 1	209613 bp	cat2, bla-Oxa1, aacA4, bla-ctxM1, ant1, tra, repB, resistência a cobre, prata e arsenato, tetRA2, transposases
Plasmídeo 2	155'630 bp	tetRA3, cmlA4, ant1_2, emrE, folP2, bla-NDM1 ,

A NDM-1 em *Escherichia coli* tem sido disseminada por todo o mundo através de vários replicons de plasmídeos, incluindo IncF, IncI, IncX, and A/C (como encontrado no nosso estudo), apesar do replicon IncX ser o mais prevalentemente envolvido na disseminação da *bla*_{NDM}(77).

O gene *bla*_{NDM} é usualmente associado a plasmídeos, sendo a maioria está limitada aos tipos IncX3, IncFII ou IncC(83,84).

Walsh e colaboradores encontraram um plasmídeo IncA/C portando *bla*_{NDM-1} em fontes de água, que possuíam alta taxa de transferência a 25-30°C, o que pode indicar que o gene pode ser adquirido fora do ambiente hospitalar (48).

Os plasmídeos IncA/C são associados com a multirresistência bacteriana e estão disseminados pelo mundo inteiro. (48)

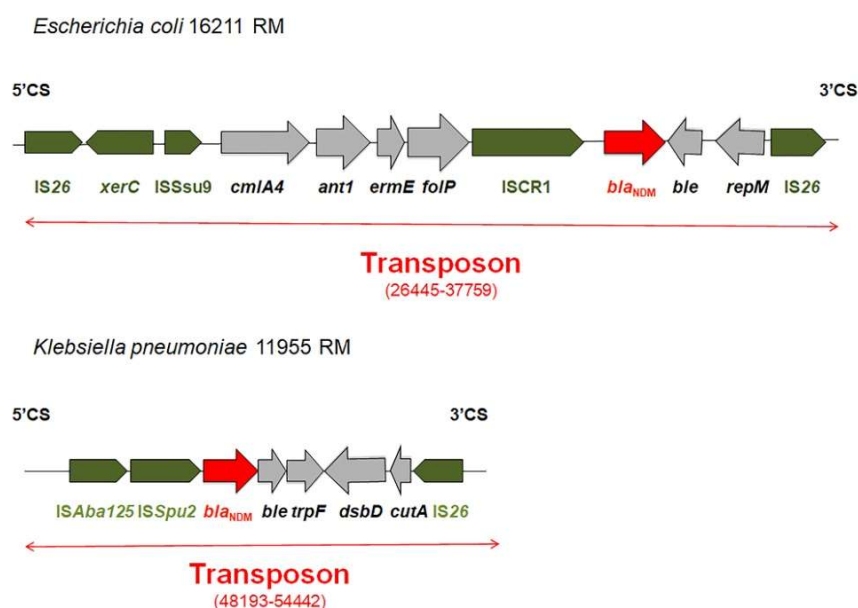


Figura 11 – Transposons encontrados em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e suas orientações de transcrição.

Fonte: a autora

Neste estudo caracterizamos os plasmídeos de 2 isolados produtores de carbapenemase NDM, *Escherichia coli* 16211RM, *Klebsiella pneumoniae* 11955RM. O

gene *bla*_{NDM} está descrito em transposons carregados pelos plasmídeos IncFIB/IncFII em *Klebsiella pneumoniae* e IncA/C em *Escherichia coli* estão em diferentes contextos genéticos.

Em *Escherichia coli* o transposon está entre 26445 e 37759pb do plasmídeo. É flanqueado pela transposase IS26 e contém a ISCR1 ao centro. Há a presença do gene XerC (tirosina recombinase), ISSu9 (sequência de inserção), cmlA4 (bomba de efluxo da família Bcr/CflA), ant1 (aminoglicosídeo adenililtransferase), ermE (rRNA metiltransferases), folP (dihidropteroato sintase), *bla*_{NDM}, acompanhada de *ble*MBL (resistência a bleomicina) downstream como esperado e repM (replicase).

Na maioria dos plasmídeos A/C, a ilha de resistência está usualmente incluída upstream do gene *rh1* e contém um integron, múltiplos transposons, um módulo Tn21-tnp e um módulo Tn21-mer, o qual é interrompido por uma sequência de inserção IS4321(85). Os integrons, particularmente os de classe 1, usualmente estão associadas com plasmídeos A/C e genes cassetes carregando genes de resistência, incluindo a *bla*_{NDM}(86). Isso foi mostrado em múltiplos plasmídeos A/C e em um IncF(pNDM-EcoGN568) que era idêntico ao dos plasmídeos A/C; o plasmídeo IncF somente diferia do A/C pelo número de genes cassetes de resistência no integron de classe 1(87). Um cassete de genes adicional, flanqueado por dois elementos IS26 e carregando *bla*TEM-1 foi achado downstream do gene *rmtB*(88).

Em *Klebsiella pneumoniae* verificamos um transposon entre 48193-54442pb do plasmídeo com a IS*Aba*125 acompanhado de IS*Spur*2 e a *bla*_{NDM} upstream de *ble*MBL (resistência a bleomicina), *dsbD* (proteína de intercâmbio tiol:dissulfeto), *cutA* (proteína de tolerância a cátions divalentes) e finalizado pela IS26, caracterizando uma estrutura de transposon composto IS26 dependente.

A reconstrução detalhada das sequências dos transposons encontrados mostraram dois contextos genéticos diferentes, flanqueados pelo IS26 em *E. coli* e com IS*Aba125* e IS26 em *K. pneumoniae*. Estes elementos móveis permitem que a transmissão horizontal e interespecies sejam facilitadas, o que explica também por que a disseminação da carbapenemase NDM se dá de forma clonal e não clonal interespecies.

As *Enterobacterales* carregam múltiplos elementos IS que afetam a expressão dos genes vizinhos(89). A sequência de inserção IS26 pertence à família IS6 que tem sido reportados com a transferência do gene *bla*_{NDM} (90)_i. Foram encontrados também dois elementos normalmente encontrados ao lado da *bla*_{NDM-1}, elementos IS e o gene de resistência a bleomicina *ble*_{MBL}(46). Consistentemente, as sequências de inserção upstream do gene *bla*_{NDM-1} iniciam a transcrição. O gene *ble*_{MBL} é encontrado downstream do gene *bla*_{NDM-1} e é regulado pelas mesmas regiões promotoras. A bleomicina tem sido usada como um agente anticâncer utilizado na terapêutica, sugerindo que gene *bla*_{NDM-1} pode ser selecionado pelo uso de antibióticos e co-selecionado pela bleomicina(91).

7. CONCLUSÃO

Com esse trabalho estudamos a epidemiologia dos isolados produtores de NDM nos três estados da região Sul e caracterizamos os plasmídeos de duas bactérias, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, encontrando resultados semelhantes aos da literatura.

A positividade para o gene *bla*_{NDM} foi de 4,47% entre as amostras analisadas. A bactéria mais prevalente entre as positivas foi *Klebsiella pneumoniae* (69%) seguida de *Escherichia coli* (8%) e Complexo *Enterobacter cloacae* (4%). As amostras mais frequentes foram urina, aspirado traqueal e sangue.

A amostras se mostraram altamente resistentes aos beta-lactâmicos, inclusive às novas associações como imipenem-relebactam e ceftazidima com avibactam, como esperado. Os antimicrobianos com maiores taxas de sensibilidade foram a amicacina (92% pelo CLSI e 72% pelo BrCAST/EUCAST), plazomicina, (85% pelo FDA) e colistina (72% pelo BrCAST/EUCAST). Para os não fermentadores de glicose testados, o único antimicrobiano ativo foi a colistina.

O estudo da similaridade genética entre as cepas da bactéria mais frequente, *Klebsiella pneumoniae*, mostrou a presença de 8 perfis clonais (101 de 213), e um número grande de amostras isoladas, sugerindo a disseminação mista, plasmidial e via mãos da equipe de saúde.

Os *sequence types* encontrados nos nossos isolados foram ST15, ST11, ST1866, ST2640, ST340 e um ST novo descrito pelo nosso grupo. Os ST15, ST11 e ST340 são reportados internacionalmente como perfis de disseminação de NDM, porém os STs variam conforme os países.

A *Klebsiella pneumoniae* 11955RM ST15 apresentou 5 plasmídeos, carbapenemase NDM-1, beta-lactamase de espectro estendido CTX-M15, genes de resistência a aminoglicosídeos e tetraciclinas, além de resistência à metais pesados. O isolado de *Escherichia coli* 16211RM ST744 apresentou 2 plasmídeos. A reconstrução detalhada das sequências dos plasmídeos encontrados mostraram dois contextos genéticos diferentes, flanqueados pelo IS26 em *E. coli* e com IS*Aba*125 e IS26 em *K. pneumoniae*, o que facilita a transferência horizontal.

Em *Enterobacter hormachei* o replicon type do plasmídeo encontrado foi IncX3.

Não foram detectados genes de metilases nos isolados testados, preservando a ação de novos aminoglicosídeos como a plazomicina.

Nossos resultados mostram a importância de uma análise dos genomas em disseminações que envolvem diferentes espécies, esclarecendo os potenciais mecanismos envolvidos.

A contínua evolução dos marcadores de resistência devido à pressão seletiva e sua disseminação através de transferência genética horizontal é um importante risco para os estabelecimentos de saúde e controladores de infecção.

Este estudo é limitado pelo baixo número de isolados sequenciados, porém os dados epidemiológicos são relevantes, mesmo com os números baixos. Não foi possível a determinação do subtipo de todos os isolados, na procura de tipos raros, porém esse não é o objetivo de estudos epidemiológicos grandes.

A NDM continua sendo um desafio para os estabelecimentos de saúde e mais estudos são necessários para se definir as medidas de contenção necessárias.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração a progressão do número de casos encontrados de micro-organismos produtores de NDM e a dificuldade de tratamento das infecções causadas por estes micro-organismos, entende-se que o estudo da sua epidemiologia e o desenvolvimento de novos medicamentos e inibidores eficazes de metalo- β -lactamase é essencial e urgente.

A testagem da associação aztreonam com ceftazidima com avibactam é uma opção terapêutica importante, porém não estava disponível quando foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos e representa um viés do nosso trabalho.

9. ARTIGOS PUBLICADOS

9.1 Dissemination of NDM producing bacteria in South Brazil.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 106 (2023) 115930

Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Original Article

Dissemination of NDM-producing bacteria in Southern Brazil

Lavinia N.V.S. Arend^{a,b}, Ricardo Bergamo^c, Fabiano B. Rocha^d, Larissa Bail^a, Carmen Ito^a,
Valter A. Baura^e, Eduardo Balsanelli^e, Joël F. Pothier^f, Fabio Rezzonico^f, Marcelo Pilonetto^{b,g},
Theo H.M. Smits^f, Felipe Francisco Tuon^{a,*}

^a Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
^b Public Health Central Laboratory – State of Paraná – LACEN/PR, Molecular Bacteriology Division, São José Dos Pinhais, Paraná, Brazil
^c State Health Department of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
^d CGLAB General Coordination of Laboratories of Public Health, Ministry of Health, Brasília, Federal District, Brazil
^e Laboratory of Biochemistry, Polytechnic Center, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
^f Environmental Genomics and Systems Biology Research Group, Institute of Natural Resource Sciences (IUNR), Zurich University of Applied Sciences ZHAW, Wädenswil, Switzerland
^g Core for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 October 2022
Revised in revised form 23 January 2023
Accepted 28 February 2023
Available online 6 March 2023

Keywords:
Carbapenemase
Plasmids
Antimicrobial resistance
Enterobacterales
Klebsiella pneumoniae

ABSTRACT

Background: The dissemination of NDM-1 carbapenemases (New Delhi Metallo- β -lactamase) is a global public health problem, mainly in developing countries. The aim of this study was to characterize the spread of NDM-producing bacteria in the Southern Brazilian states analyzing epidemiological, molecular, and antimicrobial susceptibility aspects.

Methods: A total of 10,684 carbapenem-resistant isolates of *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. obtained from several hospitals in eight cities in Southern Brazil were screened, and 486 NDM-producing bacteria were selected.

Results: The incidence varied from 0.5 to 77 cases/100,000 inhabitants. ST11, ST15, ST340 and ST674 were the most common in *K. pneumoniae*. A total of 5 plasmids were identified in one *K. pneumoniae* strain: Col440I, Col440II, IncFIA(H11), IncFIB(K), IncFIB(pQII)/ IncFII(K), and IncR.

Conclusions: The number of patients with NDM-producing bacteria has increased in Southern Brazil, whose gene is present in different plasmids, explaining the expansion of this enzyme.

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The emergence of NDM-1 carbapenemases (New Delhi Metallo- β -lactamase) is a global public health problem [1]. The high hydrolysis capacity of this β -lactamase, including against carbapenems, and their association with other plasmid-borne resistance mechanisms decreases the available therapeutic options [2]. The *bla*_{NDM-1} gene is usually encoded on mobile elements like plasmids and can be carried by several types of plasmids, such as IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1, and the new IncN and IncHI1 plasmids [3]. These structures are related to nonclonal, horizontal dissemination of the gene. IncA/C plasmids are particularly important because they are capable of replication in *Pseudomonas* and other species besides *Enterobacterales* [4].

The *bla*_{NDM} gene has spread around the world in a short period and now is considered to be endemic in places like India, Pakistan, and Bangladesh [5]. There are reports in various countries on different continents, such as the United States, Canada, Greece, Colombia, Brazil, Spain, France, England, Italy, Switzerland, Turkey, Morocco, United Arab Emirates, Kuwait, China, Japan, Taiwan, South Korea, and Australia [6,7]. In China, the United Arab Emirates, India, and Pakistan, it is reported as the most prevalent carbapenemase [8]. In Latin America, the first isolates containing the *bla*_{NDM} resistance gene were reported in Brazil, in isolates of *Providencia rettgeri* and *Acinetobacter baumannii* [9,10]. A growing number of NDM-producing bacteria was reported in samples from nine of 26 states (including federal district), analyzing 81 isolates chosen by repPCR analysis to excluded genetic similar strains. However, the number of NDM-producing bacteria is potentially much larger, and clonality is important to understand the dissemination [11,12].

This study aimed to characterize the spread of NDM-producing bacteria in the Southern Brazilian states analyzing epidemiological, molecular, and antimicrobial susceptibility aspects.

* Corresponding author: Tel./Fax: 55-41-3071-1133.
E-mail address: felipe.tuon@pucpr.br (F.F. Tuon).

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115930>
0732-8893/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

2. Methods

2.1. Samples

A total of 10,684 carbapenem-resistant isolates of *Enterobacteriales*, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. obtained from several hospitals in 8 cities in Southern Brazil were evaluated in the reference laboratory between January 1, 2013 and August 31, 2018. Isolates were received, grown in McConkey agar, submitted to DNA extraction and storage at -80°C in BHI broth with 10% glycerol until processed.

2.2. Epidemiological data

Epidemiological data from populations affected by infection/colonization by NDM-1 producing bacteria, as well as identification, antimicrobial susceptibility data were accessed through the Kibana data visualization tool, based on the Elastic Search repository, fed by data from Paraná's Department of Health software GAL (Laboratory Environment Manager), provided by the Ministry of Health (DATASUS).

2.3. Bacterial identification and susceptibility tests

Bacterial isolates were spotted on an inox slide with $1\mu\text{L}$ of CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) and identification was carried on using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system VitekMS (Biomérieux; Marcy L'Etoile, France).

Susceptibility tests by microdilution were performed in all bacterial isolates except for *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* susceptibility tests by microdilution tests were performed after excluding similar "clones" (genetic similarity) by repPCR. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution, according to the M07-A10 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2015). Concentrations of avibactam and relebactam were tested at constant concentration of 4 mg/L. EUCAST 2020 clinical breakpoints were applied for colistin and IMiREL, CLSI 2020 for other antimicrobials. *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as controls (8). Interpretation of susceptibility results was performed using the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

2.4. *bla*_{NDM} gene amplification

2.4.1. DNA extraction

Crude lysates were done heating microcentrifuge tubes with 0.5 McFarland bacterial inoculum in a dry thermoblock at 95°C for 5 minutes, centrifuged, and storage in freezer at -20°C .

2.4.2. Amplification

*bla*_{NDM} was detected using qPCR CDC protocol, as published previously [13]. For the test assay, reaction mixtures of primers forward, reverse and probes (NDM-F_GACCGCCAGATCCTCAA, NDM-R_CGCGACCGGCAGGTT and probe NDM_HEX-TGGATCAAGCAGGAGAT-BHQ1) plus MasterMix Taqman Fast (Applied Biosystems; Vilnius, Lithuania) and sterile reagent grade water ($11\mu\text{L}$ final volume) were mixed with $1\mu\text{L}$ of crude lysate before analysis on 7500 Fast platform (Applied Biosystems; Carlsbad, CA).

2.4.3. Genetic similarity by repPCR

Since *K. pneumoniae* was the most prevalent NDM producing bacteria in our study, we carried out a genetic similarity to reduce the risk of overlapping results due to clustering. *Klebsiella pneumoniae* were analysed by repPCR, using 95% confidence and 5% error, selected by convenience with at least 1 isolate of *Klebsiella*

pneumoniae per city. If there were more than one isolate per city, the most representative anatomical site of infection was selected.

RepPCR was performed using the Diversilab System (Biomérieux; Marcy L'Etoile, France), AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems), and ultrapure DNA was extracted using MO Bio UltraClean kit (ThermoFisher; Carlsbad, CA). Amplicons were read on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Santa Clara, CA). The analysis of the generated profiles was performed using Bionumerics software (Biomérieux; Marcy L'Etoile, France), using Pearson correlation and the 95% similarity coefficient for clonality purposes [11].

2.4.4. Whole genome sequencing (WGS)

After ultra-pure DNA extraction, sequences were generated using MiSeq sequencer (Illumina; San Diego, CA) for short-reads and MinION (Oxford Nanopore; Oxford, UK) for long reads. Sequence adapters and low-quality regions were removed using Trimmomatic. RefSeq genome assembly was done by SPAdes. Annotation was done using Prokka. Hybrid assembly was done using Unicycler and manually verified.

MLST and detection of genes encoding virulence factors were achieved by uploading contigs obtained from WGS to the Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Determination of resistance gene plasmids typing, and MLST were performed with default settings using ResFinder 3.1, CARDs, PlasmidFinder 2.0, and MLST 1.4, respectively [14,15].

2.4.5. Multi Locus Sequence Typing

The MLST typing was performed using Sanger sequencing on ABI 3130 (Applied Biosystems) as previously described [16], and whole genome sequence analysis (if the isolate was sequenced by NGS). The sequences obtained were submitted to the MLST database at the Pasteur Institute website (<https://bigdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) for the determination of the corresponding sequence type (ST) when Sanger sequence and CGE website when Next-generation sequence.

3. Results

3.1. Samples and epidemiological data

In the period of this study, 10,684 carbapenem-resistant isolates of *Enterobacteriales*, *Pseudomonas* spp., and *Acinetobacter* spp. were evaluated. From 10,684 isolates, 8904 presented carbapenemase genes on qPCR assays, 486 isolates (4.55%) carried *bla*_{NDM}. The first isolate was identified in February 2014. Since then, the number has increased with a linear tendency with an R^2 (0.2; $P = 0.0014$) (Fig. 1). The NDM-1 containing isolates were identified mainly in surveillance cultures, which are cultures to detect colonization, not clinically significant ($n = 222$; 46%). Considering only clinically significant samples, isolates were identified in urine ($n = 122$; 48%), blood ($n = 37$; 14%), tracheal aspirate ($n = 40$; 16%), other body fluids ($n = 11$; 4%), and other clinical samples ($n = 46$; 18%).

The most common isolates were *Klebsiella pneumoniae* ($n = 333$; 68.5%), followed by *Escherichia coli* ($n = 49$; 10.1%), and *Enterobacter cloacae* complex ($n = 37$; 7.6%). Non-fermenter Gram-negative bacteria like members of the *Acinetobacter baumannii* complex or *Pseudomonas aeruginosa* represented a less important group of pathogens harboring *bla*_{NDM} with only 11 (2.2%) and 3 isolates (0.6%), respectively (Table 1).

The distribution of NDM-producing isolates in the states of Paraná (PR), Santa Catarina (SC), and Rio Grande do Sul (RS) is shown in Fig. 2. Most cases were identified in the capital of Santa Catarina, Florianópolis, with 153 isolates, followed by Caxias do Sul (Rio Grande do Sul state) with 76 isolates and the capital of Paraná state Curitiba with 55 isolates. The incidence varied from 77 cases/100,000

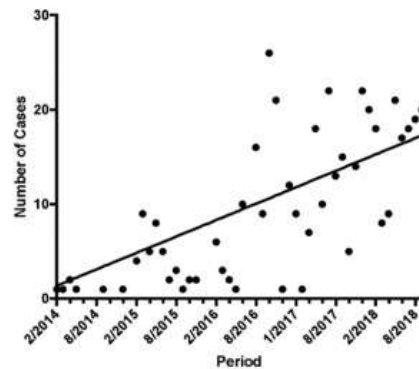


Fig. 1. Number of isolates with *bla*_{NDM} identified in the period of January 2014 to September 2018 in Brazil. A total of 486 isolates were included in the period.

habitants (Irati in Parana State) to 0.5 cases/100,000 inhabitants (Francisco Beltrão in Parana State) (Fig. 2).

3.2. RepPCR

From 333 *K. pneumoniae* isolates, repPCR showed eight main genotype patterns, and several isolates without any genetic similarity. Similar genotypes were observed especially among the same facilities and cities. The most prevalent genotypes were A (6), a (25), B (16), E (27), K (5), N (4), and Z (14). Genotypes A and Z occurred in only one city, while the others were seen in more than one state. Genotype E was the only genotype that was present in all three states (SC, PR, and RS) (Fig. 3).

3.3. MLST

MLST was performed only for *K. pneumoniae* considering the most important pathogens in the database. Based on eight genotypes identified on repPCR, MLST analysis revealed *K. pneumoniae* isolates

sequence types ST11 (*n* = 27), ST15 (*n* = 44), ST340 (*n* = 4), ST2640 (*n* = 3), ST1866 (*n* = 3) and a not yet described ST (*n* = 14). ST15 was the most frequent type.

3.4. Plasmids

The plasmid identification was performed in one isolate of *K. pneumoniae* (the most common ST, the ST15), and one aleatory *E. coli* and *E. cloacae*. A total of five plasmids were identified in the strain 11955RM *K. pneumoniae*. Col440I, Col440II, IncFIA(HI1), IncFIB(K), IncFIB(pQil)/IncFII(K), and IncR. A total of 5 plasmids were identified in the strain 20257RM *E. cloacae*. Col(pHAD28), IncHI2, IncHI2A, IncN2, and IncX3. A total of three plasmids were identified in the strain of *E. coli* 16211RM IncC, IncFIB(K), and IncFII(K). *bla*_{NDM} was found in IncFIB(pQil):IncFII(K) plasmid in *K. pneumoniae*, IncC in *E. coli* (Supplementary material 1 and Supplementary material 2).

3.5. Antimicrobial susceptibility tests

All isolates (*n* = 486) were resistant to imipenem with MIC_{50/90} 32/128 mg/L. All isolates were also resistant to new beta-lactamase inhibitors (relebactam and avibactam). The most active drug was amikacin (92% of susceptibility using CLSI criteria and 72% using EUCAST). The susceptibility to colistin was 72% and to gentamicin 40%.

The antimicrobial susceptibility tests *Enterobacterales* isolates are described in the Table 2. The susceptibility of 4 nonglucose fermenting gram-negative bacilli (2 *Acinetobacter* spp. and 2 *Pseudomonas aeruginosa*) was also evaluated. Colistin was the only active antimicrobial for the 4 isolates. The MIC was 0.125 µg/mL for *A. baumannii*, 2 µg/mL for *A. lwoffii* and 0.5 µg/mL for the 2 *P. aeruginosa* isolates.

4. Discussion

The number of isolates harboring *bla*_{NDM} in Southern Brazilian cities has increased considerably, in arithmetic progression according with the Fig. 1. In addition, the incidence varies widely between cities, suggesting that some cases are small and local outbreaks and that in others, there is a local spread. This panorama brings complications to the treatment since carbapenem antibiotics are the last β-lactam with proven action against almost all Gram-negative microorganisms, however, their action is threatened with the emergence of carbapenemase [17].

The *bla*_{NDM} gene spreads quickly to other bacteria through mobile genetic elements and geographically between people, countries, and continents, traveling on patients seeking medical care outside their country of residence [18]. NDM-1 was the type identified in the typed isolates from our study. NDM-1 appears to be widespread across the Indian subcontinent, and in retrospective studies, it was found in isolated samples in 2006 [19]. The Balkan countries seem to be another important reservoir, but the spread is present on all continents [5]. The ST15 clonal type was determined as the most abundant clone of *K. pneumoniae*, a sequence type identified in several countries around the world and associated with outbreaks [20]. When we evaluated genotyping of *E. coli*, the ST744 genotype was identified in 49 NDM-producing isolates. At this moment, there is only 1 isolate of ST744 identified in Hong Kong [21].

The *bla*_{NDM-1} gene is usually associated with plasmids and can be carried by several types of them, such as IncI / M, IncA / C, IncF, IncHI1. Recently, new plasmids have been described, such as IncN and IncHI1 [22–24]. In our isolates, 2 different plasmids were identified, the hybrid plasmid IncFIB(pQil) and IncFII(K) in 11955RM *K. pneumoniae* and IncC in 16211RM *E. coli*. These plasmids harboring *bla*_{NDM} has been described in a hospital in Myanmar and South Africa, respectively [25,26]. This suggests that the mechanism of *bla*_{NDM-1} transmission may not be the same among different species. These

Table 1
Frequency of Gram-negative bacterial isolates, carbapenemase-containing isolates and isolates harboring *bla*_{NDM} during the study period in Brazil.

Family	Genus and species	NDM-containing isolates	
		n	%
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	49	10.1%
	<i>Citrobacter freundii</i>	16	3.3%
	<i>Citrobacter</i> sp.	3	0.6%
	<i>Citrobacter youngiae</i>	1	0.2%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	333	68.5%
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	17	3.5%
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	4	0.8%
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0.2%
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0.2%
	<i>Raoultella planticola</i>	1	0.2%
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	37	7.6%
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	0.4%
Yersiniaceae	<i>Serratia marcescens</i>	2	0.4%
Morganellaceae	<i>Morganella morganii</i>	2	0.4%
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.2%
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0.2%
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0.6%
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	2.3%
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	0.2%
	Total	486	100%

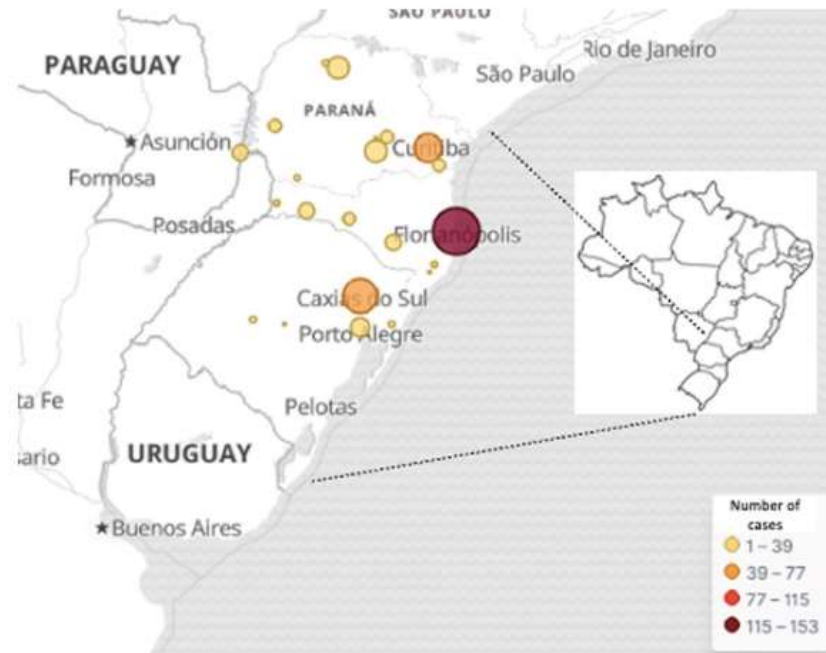


Fig. 2. *bla*_{NDM} isolates distribution in Brazil according to with the city from January 2014 to September 2018.

structures are related to the non-clonal spread of the gene. InCA/C plasmids are particularly important because they can replicate in *Pseudomonas* and other species, in addition to *Enterobacteriales*. Plasmids in this group carry multiple antibiotic resistance genes, conferring resistance to aminoglycosides, chloramphenicol, sulfa / trimethoprim, in addition to restriction enzymes, methylases, and systems that promote maintenance and survival in bacterial cytoplasm [4].

Although the *bla*_{NDM} has been identified mainly in *Klebsiella*, *E. coli*, and *Enterobacter*, other rare pathogens, such as *Leclercia*

adecarboxylata, *Raoultella ornithinolytica*, and *Raoultella planticola* have also been identified as carriers of this carbapenemase. These species harboring *bla*_{NDM} have been previously described in the literature but are uncommon pathogens and it was not the aim of our study [27–29].

The major challenge of infections associated with NDM-producing *Enterobacteriales* is the lack of therapeutic options. Only polymyxin and aminoglycosides showed activity: the groups of antibiotics with a higher incidence of acute kidney injury [30]. Polymyxins are drugs with hard-to-achieve pharmacokinetic and pharmacodynamic

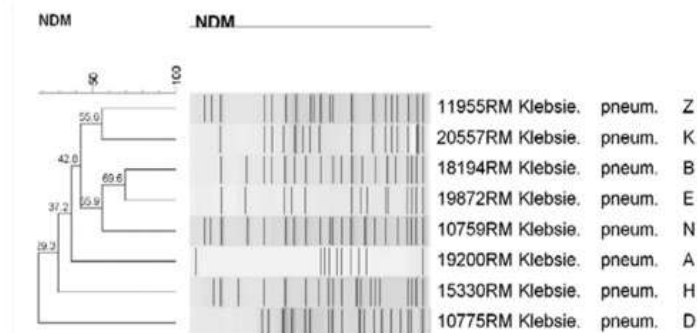


Fig. 3. repPCR of *K. pneumoniae* selected for genetic similarity.

Table 2
Antimicrobial susceptibility of 486 NDM-producing *Enterobacteriaceae*.

	PLZ	GEN	MER	AMI	COL	CAZ	CAZ/AVI	IMI	IMI/REL	CFP	CIP
MIC ($\mu\text{g/mL}$)											
MIC ₅₀	0.25	16	8	4	0.25	>128	>32	32	32	64	16
MIC ₉₀	4	128	32	16	>32	>128	>32	128	>32	>256	>32
Susceptibility (n/%)											
CLSI	-	10 (40%)	1 (4%)	23 (92%)	-	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (19%)
EUCAST	-	10 (40%)	6 (23%)	18 (72%)	18 (72%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (19%)
FDA	22 (85%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

PLZ = plazomicin; GEN = gentamicin; MER = meropenem; AMI = amikacin; COL = colistin; CAZ = ceftazidime; CAZ/AVI = ceftazidime/avibactam; IMI = imipenem; IMI/REL = imipenem/relebactam; CFP = cefepime; CIP = ciprofloxacin; CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; FDA = Food and Drug Administration; CIM₅₀ = Minimal inhibitory concentration required to inhibit the growth of 50% of organisms; CIM₉₀ = Minimal inhibitory concentration required to inhibit the growth of 90% of organisms; NA = non-applicable.

targets, and monotherapy with aminoglycosides has been questionable [31–34]. Plazomicin is an attractive alternative in the treatment of NDM-producing bacteria, but lack clinical studies in severe patients [35,1].

This study is limited by the small number of carbapenemase producers sequenced, but the epidemiological strength is relevant considering the number of isolates. The subtype of each carbapenemase was not defined, which could be important for the detection of rare subtypes, but not for large epidemiological studies.

In summary, the number of patients with NDM-producing bacteria has increased in Southern Brazil. Aminoglycosides present a higher activity against these isolates. The NDM-1 is the only type of NDM enzyme identified, whose gene is present in different plasmids, explaining the expansion of this enzyme.

Declaration of Competing Interest

Felipe Tuon is a CNPq researcher. The other authors declare that they have no conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

Lavinia N.V.S. Arend: Conceptualization, Writing – original draft. **Ricardo Bergamo:** Data curation. **Fabiano B. Rocha:** Data curation. **Larissa Bail:** Methodology. **Carmen Ito:** Methodology. **Valter A. Baura:** Data curation. **Eduardo Balsanelli:** Data curation. **Joel F. Pothier:** Formal analysis. **Fabio Rezzonico:** Formal analysis. **Marcelo Pilonetto:** Visualization. **Theo H.M. Smits:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Felipe Francisco Tuon:** Conceptualization, Writing – review & editing.

Acknowledgments

We would like to thank the support of researchers Bruna Fuga (USP), Nilton Lincopan (USP), Emanuel Malpenti (UFPR), Bruno Guerra (PUCPR) for helping in sequencing techniques and analysis.

JFP, FR and THMS thank the the Leading House for the Latin American Region of the University of St. Gallen, Switzerland, and the Life Science and Facility Management Department at Zurich University for Applied Sciences (ZHAW) for support.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.diagmicrobio.2023.115930.

References

- [1] Martins AF, Bail L, Ito CAS, da Silva Nogueira K, Dalmolin TV, Martins AS, et al. Antimicrobial activity of plazomicin against *Enterobacteriaceae*-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90 (3):228–32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.004.

- [2] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17(10):1791–8. doi: 10.3201/eid1710.110655.
- [3] Weber RE, Pietsch M, Fruhauf A, Pfeifer Y, Martin M, Luft D, et al. IS26-Mediated Transfer of bla_{NDM-1} as the main route of resistance transmission during a polyclonal, multispecies outbreak in a german hospital. *Front Microbiol* 2019;10:2817. doi: 10.3389/fmicb.2019.02817.
- [4] Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008;153(Suppl 1):S347–57. doi: 10.1038/sj.bjp.0707607.
- [5] Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006–2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):1274–8. doi: 10.1128/AAC.01497-10.
- [6] Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill* 2013;18(31):20547. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.31.20547.
- [7] Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, et al. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4885–8. doi: 10.1128/JCM.43.9.4885-4888.2005.
- [8] Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol* 2016;7:1–30. doi: 10.3389/fmicb.2016.00895.
- [9] Carvalho-Assef AP, Pereira AS, Albano RM, Beriao CC, Chagas TP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(12):2956–7. doi: 10.1093/jac/dkt298.
- [10] Pilonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelissom M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(12):7592–4. doi: 10.1128/AAC.03444-14.
- [11] Arend LN, Toledo P, Pilonetto M, Tuon FF. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different facilities in Southern Brazil. *Am J Infect Control* 2015;43(2):137–40. doi: 10.1016/j.ajic.2014.11.003.
- [12] da Silva IR, Aires CAM, Conceicao-Neto OC, de Oliveira Santos IC, Ferreira Pereira N, Moreno Senna JP, et al. Distribution of Clinical NDM-1-producing gram-negative bacteria in Brazil. *Microb Drug Resist* 2019;25(3):394–9. doi: 10.1089/mdr.2018.0240.
- [13] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12):5046–54. doi: 10.1128/AAC.00774-09.
- [14] Carattoli A, Hasman H. PlasmidFinder and In Silico pMLST: identification and typing of plasmid replicons in whole-genome sequencing (WGS). *Methods Mol Biol* 2020;2075:285–94. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_20.
- [15] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(11):2640–4. doi: 10.1093/jac/dks261.
- [16] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4178–82. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005.
- [17] Tuon FF, Graf ME, Merlini A, Rocha JL, Stallbaum S, Arend LN, et al. Risk factors for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Braz J Infect Dis* 2017;21(1):1–6. doi: 10.1016/j.bjid.2016.09.008.
- [18] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10 (9):597–602. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
- [19] Bhattacharya D, Thattaiyan R, Bhattacharya H, Sayi DS, Muruganandam N, Roy S, et al. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1) producing and multidrug resistant uropathogens causing urinary tract infections in Andaman Islands, India. *Microb Drug Resist* 2013;19(6):457–62. doi: 10.1089/mdr.2013.0070.
- [20] Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a

- widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2019;74(8):2197–202. doi: 10.1093/jac/dkz176.
- [21] Ho PL, Cheung YY, Wang Y, Lo WU, Lai EL, Chow KH, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a healthcare region in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35(3):379–85. doi: 10.1007/s10096-015-2550-3.
- [22] Dolejska M, Villa L, Poirer L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(1):34–9. doi: 10.1093/jac/dks357.
- [23] Lopez-Diaz M, Ellaby N, Turton J, Woodford N, Tomas M, Ellington MJ. NDM-1 carbapenemase resistance gene vehicles emergent on distinct plasmid backbones from the IncI/M family. *J Antimicrob Chemother* 2022;77(3):620–4. doi: 10.1093/jac/dkab466.
- [24] Toledano-Tableros JE, Gayosso-Vazquez C, Jarillo-Quijada MD, Fernandez-Vazquez JL, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, et al. Dissemination of bla NDM-1 gene among several *klebsiella pneumoniae* sequence types in Mexico associated with horizontal transfer mediated by IncF-like plasmids. *Front Microbiol* 2021;12:611274. doi: 10.3389/fmicb.2021.611274.
- [25] Pedersen T, Sekyere JO, Govinden U, Moodley K, Sivertsen A, Samuelsen O, et al. Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical enterobacteriaceae in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(5):e02178–17. doi: 10.1128/AAC.02178-17.
- [26] Takei S, Lu YJ, Tohya M, Watanabe S, Misawa S, Tabe Y, et al. Spread of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing NDM-type metallo-beta-lactamase in Myanmar. *Microbiol Spectr* 2022;10(4):e0067322. doi: 10.1128/spectrum.00673-22.
- [27] Dang B, Zhang H, Li Z, Ma S, Xu Z. Coexistence of the blaNDM-1-carrying plasmid pWLK-NDM and the blaKPC-2-carrying plasmid pWLK-KPC in a *Raoultella ornithinolytica* isolate. *Sci Rep* 2020;10(1):2360. doi: 10.1038/s41598-020-59341-4.
- [28] Pan Z, Liu R, Zhang P, Zhou H, Fu Y, Zhou J. Combination of tigecycline and levofloxacin for successful treatment of nosocomial pneumonia caused by New Delhi Metallo-beta-lactamase-1-producing *raoultella planticola*. *Microb Drug Resist* 2017;23(1):127–31. doi: 10.1089/mdr.2015.0346.
- [29] Riazoo C, Lopez-Cerero L, Rojo-Martin MD, Hoyos-Mallecot Y, Fernandez-Cuenca F, Martin-Ruiz JL, et al. First report of NDM-1-producing clinical isolate of *Leclercia adecarboxylata* in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88(3):268–70. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.013.
- [30] Tuon FF, Rocha JL, Gasparetto J. Polymyxin B and colistin—the economic burden of nephrotoxicity against multidrug resistant bacteria. *J Med Econ* 2019;22(2):158–62. doi: 10.1080/13696998.2018.1552431.
- [31] Lawandi A, Yek C, Kadri SS. IDSA guidance and ESCMID guidelines: complementary approaches toward a care standard for MDR Gram-negative infections. *Clin Microbiol Infect* 2022;28(4):465–9. doi: 10.1016/j.cmi.2022.01.030.
- [32] Peixoto BC, Contrera GG, Cieslinski J, Gasparetto J, Tuon FF. Acute kidney injury in patients using low dose (3 mg/kg/day) of gentamicin under therapeutic dose monitoring. *J Infect* 2018;76(5):496–8. doi: 10.1016/j.jinf.2018.01.008.
- [33] Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins: endorsed by the American college of clinical pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy* 2019;39(1):10–39. doi: 10.1002/phar.2209.
- [34] Tuon FF, Aragao BZ, Santos TA, Gasparetto J, Cordova K, Abujamra M. Acute kidney injury in patients using amikacin in an era of carbapenem-resistant bacteria. *Infect Dis (Lond)* 2016;48(11–12):3. doi: 10.1080/23744235.2016.1205215.
- [35] Bail L, Ito CAS, Arend L, Pilonetto M, Nogueira KDS, Tuon FF. Distribution of genes encoding 16S rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing *Enterobacteriales* in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020;99(2):115239. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115239.

9.2 Distribution of genes encoding 16S-rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing Enterobacterales in Brazil.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 99 (2021) 115239



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio



Technical Note

Distribution of genes encoding 16S rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Brazil



Larissa Bail^{a,b}, Carmen Antonia Sanches Ito^{a,b}, Lavinia Nery Villa Stangler Arend^{b,c}, Marcelo Pilonetto^c, Keite da Silva Nogueira^{d,e}, Felipe Francisco Tuon^{b,*}

^a Division of Microbiology, Universidade Estadual de Ponta Grossa do Paraná, Ponta Grossa, PR, Brazil

^b Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Laboratório Central do Estado do Paraná - LACEN, São José dos Pinhais, PR, Brazil

^d Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^e Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2020

Revised in revised form 8 October 2020

Accepted 9 October 2020

Available online 15 October 2020

Keywords:

Carbapenemase
Aminoglycosides
Enterobacterales
Gentamicin
Amikacin

ABSTRACT

Background: The presence of 16S rRNA methyltransferases (16S-RMTases) in carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) is a major concern because it inactivates all clinical use of aminoglycosides, including plazomicin. The aim of this study is to investigate the prevalence of 16S-RMTases in CPE nonsusceptible to plazomicin collected in different Brazilian hospitals. **Methods:** All isolates with plazomicin MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 67$) were screened for the presence of 16S-RMTases by sequencing. **Results:** 54 (80.6%) isolates encoded 16S-RMTase genes (41 *rmtB1*, 7 *armA*, 3 *rmtD2*, 1 *rmtD1* and 2 *rmtC*). Among 41 samples *rmtB1* positive, 40 co-harbored *bla_{KPC-2}* and 1 *bla_{OXA-48}* gene. Of the seven isolates harboring *armA* gene, 6 were New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM)-producer. *rmtD* was only found in isolates *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producers, one in *Serratia marcescens* with *rmtD2*, not reported in Brazil. **Conclusion:** The co-existence of 16S-RMTase and CPE is worrisome because of limited treatment options and the endemic characteristic of (KPC) and NDM in Brazil.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) have been an important group of bacteria due to resistance to various antimicrobials beyond carbapenem, and therapeutic options for treating infections caused by these microorganisms are very limited. Aminoglycosides are often used to treat healthcare-associated infections, mainly those caused by CPE (Rodríguez-Bano et al., 2018). A usual resistance mechanism is the alteration of these antibiotics by aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) (Krause et al., 2016). Production of 16S rRNA methyltransferase (16S-RMTases) is an important mechanism that confers high levels of resistance against aminoglycosides (Costello et al., 2019).

Plazomicin, a novel aminoglycoside, is not inactivated by a broad spectrum of aminoglycoside modifying enzymes and therefore considered a potential therapeutic option against CPE. However, the production of 16S-RMTases prevents the action of plazomicin (Doi, 2019). The aim of this study is to investigate the prevalence of 16S-RMTases in plazomicin-nonsusceptible CPE collected in different Brazilian hospitals.

A total of 499 CPE (371 *Klebsiella* spp.; 73 *Enterobacter* spp.; 18 *Escherichia coli*; 13 *Serratia* spp.; 10 *Citrobacter* spp.; 6 *Morganella morganii*; 4 *Providencia* spp.; 2 *Proteus* spp.; 1 *Edwardsiella hoshinae* and 1 *Raoultella planticola*) collected during 2013 to 2015 from clinical samples (bloodstream, respiratory tract, cerebrospinal fluid and other infections) and surveillance samples from inpatients in Brazilian hospitals (Rio de Janeiro, São Paulo, Curitiba, Cascavel, Londrina, Maringá, Joinville, Ponta Grossa, Foz do Iguaçu, Francisco Beltrão), were previously characterized by our group in terms of sensitivity and molecular profile using broth microdilution and polymerase chain reaction (PCR) (Martins et al., 2018). We have used the results obtained to select all ($n = 70$) isolates nonsusceptible to plazomicin (MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, according to the FDA breakpoints). Three clonal samples were excluded by ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction) and of the 67 nonclonal samples selected to investigate the presence of methyltransferases, 54 displayed high-level resistance to the three aminoglycosides tested, with plazomicin MIC ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, gentamicin MIC > 64 $\mu\text{g/mL}$ and amikacin MIC ranged from 256 to ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$. Those isolates with plazomicin MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$ and MIC = 8 $\mu\text{g/mL}$ demonstrated sensibility at least one of the aminoglycosides

* Corresponding author. Tel.: +55 (41) 3271-1515
E-mail address: felipe.tuon@pucpr.br (F.F. Tuon).

Table 1

Characteristics of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE).

Isolate ^a	Patient specimen	Species	Carbapenemase	MIC (μg/mL) ^b			
				PLZ	GEN	AMK	MEM
01RS	Rectal Swab	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1	4	64	2	16
02RS	Rectal Swab	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1	4	>64	4	32
03RS	NA	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1	4	64	4	64
04SP	NA	<i>Serratia marcescens</i>	GES-16	4	64	256	256
05RJ	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	4	0.5	8	256
06SP	NA	<i>Proteus mirabilis</i>	KPC-2	4	2	>512	8
07SP	NA	<i>Morganella morganii</i>	KPC-2	4	2	≤1	4
08RS	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	4	64	4	128
09PR	Blood	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2	4	1	4	4
10PR	Urine	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2	4	0.5	4	4
11RS	Tracheal aspirate	<i>Providencia rettgeri</i>	NDM-1	8	32	8	64
12RS	Surgical wound	<i>Morganella morganii</i>	NDM-1	8	64	2	64
13RS	Rectal Swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	8	64	2	256
14RS	Cerebrospinal fluid	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1	64	>64	>512	2
15RS	Rectal Swab	<i>Morganella morganii</i>	NDM-1	64	>64	>512	16
16RS	Cutaneous abscesses	<i>Morganella morganii</i>	NDM-1	64	>64	>512	8
17RS	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	64	>64	>512	32
18RS	Urine	<i>Escherichia coli</i>	NDM-1	64	>64	>512	64
19SP	NA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	64	>64	512	64
20PR	Dermal wound	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	>512	64
21RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	512	>256
22RJ	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	512	>256
23RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	256	>256
24SP	NA	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1	64	>64	>512	128
25PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	>512	256
26PR	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	>512	1
27PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	64	>64	>512	128
28PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
29PR	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
30PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
31PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
32PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	>256
33PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
34PR	Cerebrospinal fluid	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
35PR	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
36PR	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	16
37PR	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	512	4
38PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
39PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	32
40PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	32
41PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	32
42PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
43PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
44PR	Urine	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2	>64	>64	>512	8
45PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	>256
46RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
47RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
48RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
49RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
50RJ	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
51SP	NA	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-2; NDM-1	>64	>64	>512	64
52RS	Blood	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48	>64	>64	>512	4
53RS	Rectal Swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	>256
54RS	Rectal Swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
55RS	Rectal Swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
56PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	8
57PR	Urine	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2	>64	>64	>512	32
58PR	Abscesses	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
59PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
60PR	Blood	<i>Providencia stuartii</i>	KPC-2	>64	>64	>512	8
61PR	Blood	<i>Providencia stuartii</i>	KPC-2	>64	>64	>512	4
62PR	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
63RS	Tracheal aspirate	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
64PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
65PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256
66PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	128
67PR	Urine	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KPC-2	>64	>64	>512	>256
68PR	Blood	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
69PR	Blood	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-2	>64	>64	>512	64
70PR	Tracheal aspirate	<i>Serratia marcescens</i>	KPC-2	>64	>64	>512	256

^a Letters indicate the State of Brazil: RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; PR, Paraná; SP, São Paulo.^b Abbreviations: PLZ = plazomicin; AMK = amikacin; GEN = gentamicin; MEM = meropenem; NA = not available.^c Isolate excluded by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC PCR).

Table 2
Distribution of 16S rRNA methyltransferases in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing *Enterobacteriales* clinical isolates according FDA breakpoints.

Specie and carbapenemase	16S rRNA methyltransferase gene	Plazomicin MIC (μ g/mL)						Total
		4	8	16	32	64	>64	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (41)								
KPC-2	<i>rmtB1</i>					5	27	32
KPC-2	<i>rmtD1</i>					1		1
KPC-2	<i>rmtD2</i>						2	2
KPC-2	<i>armA</i>						1	1
KPC-2	-	2						2
NDM-1	<i>armA</i>					1		1
NDM-1	<i>rmtC</i>					1		1
NDM-1	-		1					1
<i>Enterobacter cloacae</i> (8)								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						1	1
NDM-1	<i>armA</i>					2		2
OXA-48	<i>rmtB1</i>						1	1
KPC-2, NDM-1	<i>rmtC</i>						1	1
NDM-1	-	3						3
<i>Escherichia coli</i> (5)								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						2	2
NDM-1	<i>armA</i>					1		1
KPC-2	-	2						2
<i>Morganella morganii</i> (4)								
NDM-1	<i>armA</i>					2		2
NDM-1	-		1					1
KPC-2	-	1						1
<i>Klebsiella aerogenes</i> (3)								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						3	3
<i>Providencia stuartii</i> (2)								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						2	2
<i>Serratia marcescens</i> (2)								
GES-16	-	1						1
KPC-2	<i>rmtD2</i>						1	1
<i>Providencia rettgeri</i> (1)								
NDM-1	-		1					1
<i>Proteus mirabilis</i> (1)								
KPC-2	-	1						1
Total		10	3	0	0	13	41	67

(gentamicin or amikacin), except one. The characteristics of the 70 isolates are described in Table 1.

Two distinct multiplex PCR were performed as previously described by Correa et al. (Correa et al., 2014) to detect *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, and *npmA*. A positive result was further confirmed by simplex PCR with the same primers. The multiplex PCR assay revealed the presence of 16S-RMTases on those samples with plazomicin MIC $\geq 64 \mu$ g/mL ($n = 54/80.6\%$) and all of them harbored only one type of 16S-RMTases gene. No sample with plazomicin MIC $\leq 64 \mu$ g/mL ($n = 13$) was positive for methyltransferases. The *rmtB* gene was found in 41 (75.9%) isolates, followed by *armA* in 7 (13%), *rmtD* in 4 (7.4%) and *rmtC* in 2 (3.7%) samples. All *rmtB* genes were classified as *rmtB1* by genetic sequencing and, among four *rmtD*, 3 were *rmtD2* and 1 was *rmtD1*.

Among 41 isolates with *rmtB1* gene, 40 samples co-harbored *bla_{KPC-2}* and one *Enterobacter cloacae bla_{OXA-48}* gene. Of the 7 isolates harboring *armA* gene, 6 were New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM)-producer, and one *Klebsiella pneumoniae* *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-2-producer. The *rmtD* gene was found in *Klebsiella pneumoniae*, 2 with *rmtD2* and 1 *rmtD1*, and one *Serratia marcescens* with *rmtD2*, all isolates KPC-producers. Two isolates harbored the *rmtC* gene, one *Klebsiella pneumoniae bla_{NDM-1}* positive and one *Enterobacter cloacae* co-harboring *bla_{KPC-2}* and *bla_{NDM-1}* genes (Table 2). *rmtB1* was the most prevalent gene (41/75.9%), followed by *armA* (7/13%), *rmtD* (4/7.4%) and *rmtC* (2/3.7%).

Association of 16S-RMTases and carbapenemases in *Enterobacteriales* has been reported around the world. However, differently from our data, NDM is the most prevalent carbapenemase co-harboring methyltransferases reported (Doi et al., 2016). Taylor et al. (Taylor et al., 2018) identified 762 pan-aminoglycoside-resistant *Enterobacteriales* in United Kingdom and Ireland with one or more 16S-RMTase

genes (*armA*, 44.6%; *rmtC*, 19.2%; *rmtF*, 18.0%; *rmtB*, 11.4%) and several (93.4%; 712/762) also carried carbapenemases, *bla_{NDM-1}* (592/712; 83.1%) and *bla_{OXA-48-like}* (23.7%, 169/712) were the main genes. Only 13 of 712 (1.6%) isolates were KPC producers. Wangkheimayum et al. in a hospital of northeast India showed the same 16S-RMTases of our study, nevertheless, *rmtC* and *bla_{NDM-1}* were predominant (Wangkheimayum et al., 2017).

In our study, *bla_{KPC-2}* was present in all isolates *rmtD* positive ($n = 4$) and 40 of 41 *rmtB1* (32 *K. pneumoniae*), whereas *armA* and *rmtC* were present mainly in isolates NDM-producers. Association of *rmtB1* and *bla_{KPC-2}* has been related in *K. pneumoniae* isolated in the routine of the laboratory of a tertiary teaching hospital in Brazil. Among 1,052 *Enterobacteriales* recovered in December of 2014, 22 harbored 16S-RMTases genes and 20 were *K. pneumoniae* co-harboring *rmtB1*, *bla_{KPC-2}* and *bla_{CTX-M-15}* genes. These isolates belonged to the clone ST258 which could explain in part the spread of *rmtB1* in our country (Cassu-Corsi et al., 2018). In addition to clonal expansion, different Inc plasmid types (FIB, FIBS, I, T, X, N, Y, L/M, FIA) encoding 16S-RMTase genes have been contributed to the spread of these enzymes (Wangkheimayum et al., 2017).

We found 2 *rmtC*-harboring isolates, one *K. pneumoniae* NDM-1-producer and one *E. cloacae* KPC-2 and NDM-1 co-producer, not reported in *Enterobacteriales* in our country to date. *RmtC* was first reported in *P. mirabilis* in Japan in 2003. Subsequently, this enzyme was found in other countries, usually associated with NDM carbapenemase (Doi et al., 2016). *RmtC* was found in *Acinetobacter baumannii* in Uruguay and Brazil. The 2 Uruguayan clinical isolates harbored OXA-23 and OXA-51 and 6 Brazilian isolates co-produced *ArmA* and *rmtB* 16S-RMTases (da Paz Pereira et al., 2020).

Other 16S-RMTases detected in previous studies in Brazil are *rmtD* and *rmtG* (Fritsche et al., 2008). We found 3 *rmtD2* and one *rmtD1*

gene. These 16S RMTase are typically found in South of America and *rmtD1* was first described in *Pseudomonas aeruginosa* co-producing SPM-1, following in *K. pneumoniae* and other *Enterobacteriales* species in Brazil (Doi and Arakawa, 2007). The variant *rmtD2* was subsequently reported in *E. aerogenes* strain from Argentina and has also been found in *K. pneumoniae* KPC-2-producer in Brazil (Bueno et al., 2013). Interestingly, one *rmtD2* gene of our study was identified in *S. marcescens* of a Paraguayan patient transferred to a Brazilian hospital, not reported in our country to the best of our knowledge.

Studies on the dissemination of 16S-RMTases in Brazil are still scarce and the most notable finding of this study is the high prevalence of methyltransferases in CPE isolates (10.8%). *RmtB* was the most prevalent 16S-RMTases among CPE notably in KPC-producer *K. pneumoniae*. Other 16S-RMTases as *ArmA*, *rmtD*, and *rmtC* are spreading among *Enterobacteriales* species. The co-existence of 16S-RMTase and CPE is worrisome because of limited treatment options and the endemic characteristic of KPC and NDM in Brazil. Despite low rates of susceptibility to amikacin and gentamicin, plazomicin could be an important therapeutic option for CPE in our country.

Transparency declaration

Felipe Tuon is CNPQ researcher.

Author contributions

Conceptualization: FFT, MP; Data curation: FFT, KN; Formal analysis: FFT, CI, LA, LB; Investigation: FFT, CI, LA, LB; Methodology: CI, LB; Project administration: FFT, KN; Resources: FFT, MP, LA; Supervision: FFT, LA, KN; Validation: KN; Roles/Writing - original draft: FFT, KN, LB, CI; Writing - review & editing: FFT, KN, LB, CI.

Conflicts of interest

The authors have no interest conflicts.

Funding

None to report.

References

- Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2397–400.
- Cassu-Corsi D, Martins WM, Nicoletti AG, Almeida LG, Vasconcelos AT, Gales AC. Characterisation of plasmid-mediated *rmtB*-1 in *Enterobacteriaceae* clinical isolates from Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113: e180392.
- Correa LI, Montezzi LF, Bonelli RR, Moreira BM, Picao RC. Revised and updated multiplex PCR targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:479–81.
- Costello SE, Deshpande LM, Davis AP, Mendes RE, Castanheira M. Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;16:278–85.
- da Paz Pereira JN, de Andrade C, da Costa Lima JL, de Lima Neto RG, de Araujo PSR, Maciel MAV. Clonal dissemination of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* carriers of 16S rRNA methylase genes in an oncological hospital in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* 2020;77:32–9.
- Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2019;69(Supplement 7):S565–S75.
- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007;45:88–94.
- Doi Y, Wachino JL, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:523–37.
- Fritzsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1843–5.
- Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a027029.
- Martins AF, Bail L, Ito CAS, da Silva Nogueira K, Dalmolin TV, Martins AS, et al. Antimicrobial activity of plazomicin against *Enterobacteriaceae*-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90:228–32.
- Rodriguez-Bano J, Gutierrez-Gutierrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00079-17.
- Taylor E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the UK and Ireland. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:278–82.
- Wangkhemmayum J, Paul D, Dhar D, Nepram R, Chetri S, Bhowmik D, et al. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* within a tertiary referral hospital of North-east India. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e01037-16.

9.3 Antagonistic effect between tigecycline and meropenem: from bed to bench to bed

Infection
https://doi.org/10.1007/s15010-019-01353-y

CORRESPONDENCE



Antagonistic effect between tigecycline and meropenem: from bed to bench to bed

Lavinia Arend^{1,2} · João Paulo Telles³ · Felipe Francisco Tuon¹

Received: 6 June 2019 / Accepted: 30 August 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Dear Editor:

We appreciated the recent publication of Bi et al. about the in vitro antagonistic effect between tigecycline and meropenem in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate [1]. After microbiological proofs of antagonism, patient presented a good clinical outcome with meropenem monotherapy, but without improving with tigecycline and meropenem combination. The source of bacteremia in this patient was unclear, which complicated most appropriate antibiotic therapy choice. Although we know that anecdotal cases of infections by multidrug-resistant bacteria treated with antibiotics with a limited activity are reported, in this case, the authors included an extensive investigation and an interesting explanation of pharmacodynamics of these drugs against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CRE). Tigecycline monotherapy was evaluated by meta-analysis on different sources of infections. Hospital-acquired pneumonia and diabetic foot infection treated with tigecycline were not equivalent to another standard antibiotic regimens. However, general eradication of *K. pneumoniae* did not differ statistically. Tigecycline to blood stream infection was also evaluated on a meta-analysis and monotherapy presented significant higher mortality versus combined regimens. Finally, clinical responses on CRE infections demonstrated worse outcomes when compared monotherapy versus combination regimens and tigecycline standard- versus high-dose regimen [2].

Regarding meropenem use on CRE infections, combined synergic therapy or extended/continuous monotherapy high-dose infusion is recommended.

The authors cited in the text that two previous studies of our group did not report synergism between meropenem and tigecycline. However, our group has dedicated to study combination therapy against CRE, since a large outbreak of KPC-2 *K. pneumoniae* in Curitiba (Southern Brazil) occurred. The first study evaluated in vitro activity of different combinations and monotherapy against KPC-producing *K. pneumoniae* with meropenem, tigecycline, polymyxin and aminoglycoside [3, 4]. Monotherapy with meropenem and tigecycline presented the worse results using in vitro and in vivo animal model. Time kill curve method, the ideal dynamic evaluation for synergism or antagonism between two antibiotics, confirmed antagonism between meropenem and tigecycline in comparison with tigecycline monotherapy. Besides it, other studies evaluated this combination and found divergent results. Synergism was weakly demonstrated by few studies and apparently depending upon meropenem MIC (<64 mg/dL) [5]. Majority strains demonstrated indifference on tigecycline and meropenem association.

The author referred our both studies as non-synergic; however, it is important to cite that our studies showed antagonism. We also performed an evaluation of more than 100 patients with ventilator-associated pneumonia due to KPC-producing *K. pneumoniae*, but neither clinical outcome was similar in patients with tigecycline alone or combined with meropenem [2]. It is also important to cite that tigecycline should be used cautiously. Tigecycline achieve very low serum levels to be considered as a safe drug in severe patients. Moreover, lung concentrations are not well known, even with perfect conditions of serum levels.

✉ Felipe Francisco Tuon
felipe.tuon@pucpr.br

¹ Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho, Curitiba, PR 80215-901, Brazil

² Laboratório Central do Estado (LACEN-PR), Curitiba, PR, Brazil

³ Infectious Diseases Department, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

Published online: 06 September 2019

Springer

Compliance with ethical standards

Conflict of Interest Felipe Tuon has received research grants from Pfizer and MSD in the last year. Felipe Tuon conducts research for CNPQ.

References

1. Bi S, Yao X, Huang C, et al. Antagonistic effect between tigecycline and meropenem: successful management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infection*. 2019;47:497–500.
2. Tuon FF, Graf ME, Merlini A, et al. Risk factors for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Braz J Infect Dis*. 2017;21:1–6.
3. Toledo PV, Aranha Junior AA, Arend LN, Ribeiro V, Zavascki AP, Tuon FF. Activity of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a rat model and time-kill assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:4301–4.
4. Toledo PV, Tuon FF, Arend L, Aranha Junior AA. Efficacy of tigecycline, polymyxin, gentamicin, meropenem and associations in experimental *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* non-lethal sepsis. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:574–5.
5. Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, et al. Three dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumonia* isolates. *PLoS One*. 2015;10:e0126479.

9.4 A carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak associated with a polymyxin during the COVID pandemic: an *in vitro* and biofilm analysis of synergy between meropenem, gentamicin and sulbactam.

A carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak associated with a polymyxin shortage during the COVID pandemic: an *in vitro* and biofilm analysis of synergy between meropenem, gentamicin and sulbactam

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

[Show more detail](#)

2022 | Journal article

DOI: [10.1093/jac/dkac102](https://doi.org/10.1093/jac/dkac102)

WOSUID: [WOS:000785626900001](https://www.wosid.org/000785626900001)

CONTRIBUTORS: Chaiben, Viviane; Yamada, Carolina Hikari; Telles, Joao Paulo; de Andrade, Ana Paula; Villa Stangler Arend, Lavinia Nery; Tasca Ribeiro, Victoria Stadler; Dantas, Leticia Ramos; Suss, Paula Hansen; Tuon, Felipe Francisco

Source: Web of Science

9.5 Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing *Enterobacterales*.

Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing *Enterobacterales*

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

[Show more detail](#)

2022 | Journal article

DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2021.115568](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115568)

WOSUID: [WOS:000718381400002](https://www.wosid.org/000718381400002)

CONTRIBUTORS: Bail, Larissa; Sanches Ito, Carmen Antonia; Villa Stangler Arend, Lavinia Nery; Nogueira, Keite da Silva; Tuon, Felipe Francisco

Source: Web of Science

9.6 Resistance of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* against quaternary ammonium.

Resistance of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* against quaternary ammonium

Infection Control & Hospital Epidemiology

[Show more detail](#)

2022-04 | Journal article

DOI: [10.1017/ice.2021.418](https://doi.org/10.1017/ice.2021.418)

CONTRIBUTORS: Ana Paula de Andrade; Lavinia Nery Villa Stangler Arend; Victoria Stadler Tasca Ribeiro; Felipe Francisco Tuon

Source: Crossref ★ Preferred source (of 2)

9.7 Resolving taxonomic confusion: establishing the genus *Phytobacter* on the list of clinically relevant *Enterobacteriaceae*.

Resolving taxonomic confusion: establishing the genus *Phytobacter* on the list of clinically relevant *Enterobacteriaceae*

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

[Show more detail](#)

2022-04 | Journal article

DOI: [10.1007/s10096-022-04413-8](https://doi.org/10.1007/s10096-022-04413-8)

CONTRIBUTORS: Theo H. M. Smits; Lavinia N. V. S. Arend; Sofia Cardew; Erika Tång-Hallbäck; Marcelo T. Mira; Edward R. B. Moore; Jorge L. M. Sampaio; Fabio Rezzonico; Marcelo Pillonetto

Source: Crossref ★ Preferred source (of 2)

9.8 Evaluation of Microscan Walkaway for determination of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Susceibility in Carbapenem-Resistant Gram-negative Bacilli.

Evaluation of MicroScan WalkAway for Determination of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli

Journal of Clinical Microbiology

[Show more detail](#)

2021 | Journal article

DOI: [10.1128/JCM.01536-21](https://doi.org/10.1128/JCM.01536-21)

WOSUID: [WOS:000720776400017](https://www.wosid.org/WOS:000720776400017)

CONTRIBUTORS: Sanches Ito, Carmen Antonia; Bail, Larissa; Villa Stangler Arend, Lavinia Nery; Silva, Kleber Oliveira; Michelotto, Simone Sebold; Nogueira, Keite da Silva; Tuon, Felipe Francisco

Source: Web of Science

9.9 The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Infectious Diseases

[Show more detail](#)

2021 | Journal article

DOI: [10.1080/23744235.2020.1867763](https://doi.org/10.1080/23744235.2020.1867763)

EID: 2-s2.0-85099347163

Part of ISSN: [23744235](https://doi.org/10.1080/23744235)

CONTRIBUTORS: Ito, C.A.S.; Bail, L.; Arend, L.N.V.S.; Nogueira, K.D.S.; Tuon, F.F.

Source: Lavinia Arend via Scopus - Elsevier ★ Preferred source (of 2)

9.10 Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods.

Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

[Show more detail](#)

2020 | Journal article

DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910)

EID: 2-s2.0-85075461750

Part of ISSN: [18790070 07328893](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910)

CONTRIBUTORS: Dalmolin, T.V.; Mazzetti, A.; Ávila, H.; Kranich, J.; Carneiro, G.I.B.; Arend, L.N.V.S.; Becker, G.N.; Ferreira, K.O.; de Lima-Morales, D.; Barth, A.L. et al.

Source: Lavinia Arend via Scopus - Elsevier

9.11 Identificação de leveduras do gênero *Candida* isoladas de hemoculturas de pacientes oncológicos e pesquisa de biofilme

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> ISOLADAS DE HEMOCULTURAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E PESQUISA DE BIOFILME	
Revista Uningá 2020-10-06 Journal article DOI: 10.46311/2318-0579.57.eUJ3502 CONTRIBUTORS: Eduarda Sampaio Lazzarotto; Jannaina Ferreira De Melo Vasco; Caroline Martins Lopes; Andrea Krelling; Lavinia Nelli Villa Stangler Arend; Luiza Souza Rodrigues	Show more detail
Source: Crossref	

9.12 Validation of multiplex PCR for the diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid.

Validation of multiplex PCR for the diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid, Validação do PCR multiplex para o diagnóstico de meningite bacteriana aguda com cultura de líquido cefalorraquidiano negativa	
Arquivos de Neuro-Psiquiatria 2019 Journal article DOI: 10.1590/0004-282x20190028 EID: 2-s2.0-85066862116 Part of ISSN: 16784227.0004282X CONTRIBUTORS: de Almeida, S.M.; Dalla Costa, L.M.; Siebra, C.; Arend, L.N.V.S.; Nogueira, K.D.S.	Show more detail
Source: Lavinia Arend via Scopus - Elsevier ★ Preferred source (of 2)	

9.13 Low level of polymyxin resistance among nonclonal mcr-1 positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil

Low level of polymyxin resistance among nonclonal mcr-1-positive <i>Escherichia coli</i> from human sources in Brazil	
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2019 Journal article DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.009 EID: 2-s2.0-85055096596 Part of ISSN: 18790070.07328893 CONTRIBUTORS: Pillonetto, M.; Mazzetti, A.; Becker, G.N.; Siebra, C.A.; Arend, L.N.V.S.; Barth, A.L.	Show more detail
Source: Lavinia Arend via Scopus - Elsevier ★ Preferred source (of 2)	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2014 May 29];56(12):6437–40. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/content/long/56/12/6437>
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases : the Quiet before the Storm ? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306–25.
3. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* [Internet]. 2011;19(12):588–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005>
4. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2010 Sep [cited 2013 Feb 28];10(9):597–602. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
5. Williams JD. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 1999 Aug 1 [cited 2014 Mar 18];12:S3–7. Available from: [http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(99\)00085-0/abstract](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(99)00085-0/abstract)
6. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis*. 2019 Nov 13;69:S565–75.
7. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2022 Jun 10];64(suppl_1):i29–36. Available from: https://academic.oup.com/jac/article/64/suppl_1/i29/750087
8. Patel G, Bonomo RA. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. <http://dx.doi.org/10.1586/eri1128> [Internet]. 2014 May [cited 2022 Jun 10];9(5):555–70. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/eri.11.28>
9. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. Vol. 19, *Trends in Microbiology*. 2011. p. 588–95.
10. Guducuoglu H, Gursoy NC, Yakupogullari Y, Parlak M, Karasin G, Sunnetcioglu M, et al. Hospital Outbreak of a Colistin-Resistant, NDM-1- and

- OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae*: High Mortality from Pandrug Resistance. <https://home.liebertpub.com/mdr> [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Jun 10];24(7):966–72. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2017.0173>
11. Dortet L, Poirel L, Nordmann P, Torkar K. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/249856>
 12. Ho P-L, Li Z, Lo W-U, Cheung Y-Y, Lin C-H, Sham P-C, et al. Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying blaNDM-1 in Enterobacteriaceae isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2012 [cited 2019 Feb 18]; Available from: <https://doi.org/10.1038/emi.2012.37>
 13. Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. Genomic characteristics of NDM-producing Enterobacteriaceae isolates in Australia and their blaNDM genetic contexts. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Jun 9];60(1):136–41. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.01243-15>
 14. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;
 15. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2013 Apr 5];55(3):1274–8. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/content/long/55/3/1274>
 16. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Eurosurveillance*. 2013;
 17. Carvalho-Assef APD alincourt, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. Vol. 68, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013.
 18. CR L, JH L, KS P. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella*

- pneumoniae: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 7:895.
19. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016;7(JUN):1–30.
 20. Chen L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2012 Sep [cited 2013 Jun 23];5:133. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3460674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 21. Pillionetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APD, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12):7592–4.
 22. Kim Y, Cunningham MA, Mire J, Tesar C, Sacchettini J, Joachimiak A. NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism. *FASEB J* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Mar 1];27(5):1917–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23363572/>
 23. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where do we stand?
 24. González LJ, Bahr G, Nakashige TG, Nolan EM, Bonomo RA, Vila AJ, et al. Membrane-anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi Metallo- β -lactamase HHS Public Access Author manuscript. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Mar 1];12(7):516–22. Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms
 25. Crowder MW, Spencer J, Vila AJ. Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc Chem Res* [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 Mar 1];39(10):721–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17042472/>
 26. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. Vol. 17, *BMC Microbiology*. 2017.
 27. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo- β -Lactamase in a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* ST648 Isolate

- Recovered from a Patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Dec [cited 2022 Mar 1];55(12):5952. Available from: [/pmc/articles/PMC3232805/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2232805/)
28. Zheng B, Tan S, Gao J, Han H, Liu J, Lu G, et al. An unexpected similarity between antibiotic-resistant NDM-1 and beta-lactamase II from *Erythrobacter litoralis*. *Protein Cell*. 2011;2(3):250–8.
 29. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Sep [cited 2022 Jun 7];55(9):4224–9. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
 30. Toleman MA, Walsh TR. Evolution of the ISCR3 group of ISCR elements. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2008 Oct [cited 2022 Jun 7];52(10):3789–91. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
 31. Partridge SR, Iredell JR. Genetic Contexts of bla NDM-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov 16;56(11):6065–7.
 32. Toleman MA, Spencer J, Jones L, Walsh TR. bla NDM-1 is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Jun 7];56(5):2773–6. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.06297-11>
 33. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. IS CR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? . *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 Jun 7];70(2):296–316. Available from: <https://journals.asm.org/journal/membr>
 34. Wu W, Feng Y, Carattoli A, Zong Z. Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM carbapenemases by whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Jun 8];59(10):6625–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1414>
 35. Jovčić, BJ, Lepšanović, ZL, Begović, Begović, J, Rakonjac B, Perovanović, JP, Topisirović, LT, et al. The Clinical Isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 Carries Two Copies of the bla NDM-1 Gene in a Novel Genetic Context. 2013 [cited 2022 Jun 9];57:3405–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02312-12>.aac.asm.org3405
 36. Huang TW, Wang JT, Lauderdale TL, Liao TL, Lai JF, Tan MC, et al. Complete sequences of two plasmids in a bla_{NDM-1}-positive *Klebsiella oxytoca* isolate from

- taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Aug [cited 2022 Jun 9];57(8):4072–6. Available from:
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.02266-12>
37. Szuplewska M, Ludwiczak M, Lyzwa K, Czarnecki J, Bartosik D. Mobility and Generation of Mosaic Non-Autonomous Transposons by Tn3-Derived Inverted-Repeat Miniature Elements (TIMES). *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 14 [cited 2022 Jun 9];9(8):e105010. Available from:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105010>
 38. Liu L, Feng Y, McNally A, Zong Z. blaNDM-21, a new variant of blaNDM in an *Escherichia coli* clinical isolate carrying blaCTX-M-55 and rmtB. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Jun 10];73(9):2336–9. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/73/9/2336/5038110>
 39. Feng Y, Liu L, McNally A, Zong Z. Coexistence of two blaNDM-5 genes on an IncF plasmid as revealed by nanopore sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Jun 9];62(5). Available from:
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.00110-18>
 40. Zhang X, Feng Y, Zhou W, McNally A, Zong Z. Cryptic transmission of ST405 *Escherichia coli* carrying bla NDM-4 in hospital. *Sci Reports* 2017 81 [Internet]. 2018 Jan 10 [cited 2022 Jun 9];8(1):1–4. Available from:
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-18910-w>
 41. Lynch T, Chen L, Peirano G, Gregson DB, Church DL, Conly J, et al. Molecular Evolution of a *Klebsiella pneumoniae* ST278 Isolate Harboring blaNDM-7 and Involved in Nosocomial Transmission. *J Infect Dis* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Jun 10];214(5):798–806. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article/214/5/798/2238048>
 42. Huang TW, Chen TL, Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Lee YT, et al. Copy Number Change of the NDM-1 Sequence in a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 29 [cited 2022 Jun 10];8(4):e62774. Available from:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062774>
 43. Göttig S, Riedel-Christ S, Saleh A, Kempf VAJ, Hamprecht A. Impact of blaNDM-1 on fitness and pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Jun 1;47(6):430–5.
 44. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance : acquisition and transfer of

- antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008;(January):347–57.
45. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Mar 1];32(2). Available from: [/pmc/articles/PMC6431124/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3251124/)
 46. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. Vol. 32, *Clinical Microbiology Reviews*. 2019.
 47. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018 May 1;73(5):1121–37.
 48. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2011;11(5):355–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)
 49. Safavi M, Bostanshirin N, Hajikhani B, Yaslianifard S, van Belkum A, Goudarzi M, et al. Global genotype distribution of human clinical isolates of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; A systematic review. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Dec 1;23:420–9.
 50. Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Strains in China. *EBioMedicine* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Mar 1];19:98. Available from: [/pmc/articles/PMC5440625/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25440625/)
 51. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2014;
 52. Zhanel GG, Lawson CD, Zelenitsky S, Findlay B, Schweizer F, Adam H, et al. Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Mar 1];10(4):459–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22512755/>
 53. Karaiskos I, Souli M, Giamarellou H. Plazomicin: an investigational therapy for the treatment of urinary tract infections. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet].

- 2015 Nov 2 [cited 2022 Mar 1];24(11):1501–11. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26419762/>
54. Shaeer KM, Zmarlicka MT, Chahine EB, Piccicacco N, Cho JC. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. *Pharmacotherapy*. 2019 Jan 1;39(1):77–93.
 55. Toledo PV. Surveillance Program for Multidrug Resistant Bacteria in Healthcare Associated Infections - a City Perspective at South Brazil. *J Hosp Infect*. 2011;
 56. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2014 Mar 24];55(7):943–50. Available from:
<http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/55/7/943>
 57. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of Double-and Triple-Antibiotic Combinations for VIM-and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* by In Vitro Time-Kill Experiments. 2014; Available from: www.eucast.org
 58. Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Aug 19];66(10):2295–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21807739>
 59. Liu S, Lin Q, Lizhi Ouyang ·, Zhou · Chengjie, Wang H. Successful treatment of ceftazidime/avibactam combined with aztreonam in the NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream and intestinal infections in a NK/T lymphoma patient with agranulocytosis during autologous hematopoietic stem cell transplantation: a case report. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2022 [Internet]. 2022 Nov 12 [cited 2022 Nov 17];1–4. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-022-04523-3>
 60. Rodríguez-Avial I, Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Culebras E. In vitro activity of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomycin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains. In: *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier; 2015. p. 616–21.
 61. Shields RK, Doi Y. Clinical Infectious Diseases Aztreonam Combination Therapy: An Answer to Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative

- Bacteria? Clin Infect Dis ® [Internet]. 1099;2020(4):1099–101. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organ->
62. Mojica MF, Rossi M-A, Vila AJ, Bonomo RA. Personal View The urgent need for metallo- β -lactamase inhibitors: an unattended global threat. 2022 [cited 2022 Nov 11]; Available from: <https://www.ncbi.>
 63. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Jun 21];30(2):557. Available from: [/pmc/articles/PMC5355641/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866944/)
 64. Wei WJ, Yang HF, Ye Y, Li J Bin. New Delhi Metallo- β -Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. Chin Med J (Engl) [Internet]. 2015 Jul 7 [cited 2022 Jun 21];128(14):1969. Available from: [/pmc/articles/PMC4717920/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866944/)
 65. para correspondência E, de Jesus R, Paim Guimarães R, Bergamo R, Carlos Ferreira dos Santos L, Sander Duarte da Matta A, et al. Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial: relato de experiência de uma ferramenta transformadora para a gestão laboratorial e vigilância em saúde. Epidemiol e Serviços Saúde [Internet]. 2013 Sep [cited 2022 Sep 29];22(3):525–9. Available from: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742013000300018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 66. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Badal RE, Young K, Motyl MR, et al. In Vitro Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. J Clin Microbiol [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Mar 1];55(6):1638. Available from: [/pmc/articles/PMC5442520/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866944/)
 67. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Mar 1];17(2):153–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866944/>
 68. Tuon FF, Graf ME, Merlini A, Rocha JL, Stallbaum S, Arend LN, et al. Risk factors for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Brazilian J Infect Dis. 2017;21(1).

69. Tuon FF, Rocha JL, Gasparetto J. Polymyxin B and colistin—the economic burden of nephrotoxicity against multidrug resistant bacteria. *J Med Econ* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2023 Mar 26];22(2):158–62. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ijme20>
70. Lawandi A, Yek C, Kadri SS. IDSA guidance and ESCMID guidelines: complementary approaches toward a care standard for MDR Gram-negative infections. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Mar 26];28(4):465–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35150882/>
71. Bail L, Ito CAS, Arend LNVS, Pilonetto M, Nogueira KDS, Tuon FF. Distribution of genes encoding 16S rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing Enterobacterales in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;99(2).
72. Ho PL, Cheung YY, Wang Y, Lo WU, Lai ELY, Chow KH, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a healthcare region in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Mar 26];35(3):379–85. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-015-2550-3>
73. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. [cited 2023 Mar 26]; Available from: https://clsi.org/media/1632/m07a10_sam
74. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010;
75. Carattoli A, Zankari E, Garcíá-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895–903.
76. Pedersen T, Sekyere JO, Govinden U, Moodley K, Sivertsen A, Samuelsen Ø, et al. Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical enterobacteriaceae in durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Mar 26];62(5). Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>

77. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. Vol. 1457, *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.; 2019. p. 61–91.
78. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010 Dec [cited 2022 Sep 28];65(12):2518–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20935300/>
79. Ogbolu DO, Daini OA, Ogunledun A, Terry Alli OA, Webber MA. Dissemination of IncF plasmids carrying beta-lactamase genes in Gram-negative bacteria from Nigerian hospitals. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2013 May 13 [cited 2022 Sep 28];7(05):382–90. Available from: <https://jids.org/index.php/journal/article/view/2613>
80. Hayes F. The function and organization of plasmids. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2003 [cited 2022 Sep 28];235:1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12904641/>
81. Sidjabat H, Nimmo GR, Walsh TR, Binotto E, Htin A, Hayashi Y, et al. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Due to the New Delhi Metallo- β -lactamase. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 2011 Feb 2 [cited 2022 Sep 29];52(4):481. Available from: </pmc/articles/PMC3106237/>
82. Kieffer N, Nordmann P, Aires-De-Sousa M, Poirel L. High Prevalence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae among Hospitalized Children in Luanda, Angola. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2022 Sep 29];60(10):6189. Available from: </pmc/articles/PMC5038229/>
83. Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. [cited 2023 Mar 26]; Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/68/1/34/672511>
84. Chen S, Henrique Camargo C, Lutz Institute A, Yunsong Yu B, Dolores Alcántar-Curiel M, Eduardo Toledano-Tableros J, et al. Dissemination of bla NDM-1 Gene Among Several *Klebsiella pneumoniae* Sequence Types in Mexico Associated With Horizontal Transfer Mediated by IncF-Like Plasmids. 2021 [cited 2023 Mar 26]; Available from: www.frontiersin.org

85. Ruggiero M, Girlich D, Dabos L, Power P, Naas T, Gutkind G. Complete Sequence of the IncA/C1 Plasmid pCf587 Carrying blaPER-2 from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Sep 28];62(5). Available from: [/pmc/articles/PMC5923148/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111148/)
86. Tijet N, Richardson D, MacMullin G, Patel SN, Melano RG. Characterization of multiple NDM-1-producing Enterobacteriaceae isolates from the same patient. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 [cited 2022 Sep 28];59(6):3648–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25845877/>
87. Campos JC, Da Silva MJF, Dos Santos PRN, Barros EM, Pereira MDO, Seco BMS, et al. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Sep 28];59(12):7387–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26392506/>
88. Sugawara Y, Akeda Y, Sakamoto N, Takeuchi D, Motooka D, Nakamura S, et al. Genetic characterization of blaNDM-harboring plasmids in carbapenem-resistant *Escherichia coli* from Myanmar. *PLoS One* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Sep 28];12(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910381/>
89. Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Sep 29];38(5):865–91. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/38/5/865/496682>
90. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1998 Sep [cited 2022 Sep 29];62(3):725–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9729608/>
91. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Sep 29];56(4):1693–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22290943/>

ANEXOS

Anexo 1 - Genes de resistência detectados em *Klebsiella pneumoniae* 11955RM

Gene	AMR resistência	Antimicrobianos	Mecanismo de resistência
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF	Bomba de efluxo (MFS)	macrolídeos, aminoglicosídeos, cefalosporinas, tetraciclina, peptídeos, rifamicina	Bomba de efluxo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnE	Bomba de efluxo (MFS)	macrolídeos, aminoglicosídeos, cefalosporinas, tetraciclina, peptídeos, rifamicina	Bomba de efluxo
SHV-28	SHV beta-lactamase	carbapenênicos, cefalosporinas, penicilinas	Inativação
oqxA	Bomba de efluxo (RND)	fluoroquinolonas, glicilciclinas, tetraciclina, diaminopyrimidina, nitrofurantoína	Bomba de efluxo
OXA-9	OXA beta-lactamase	cefalosporinas, penicilinas	Inativação
TEM-1	TEM beta-lactamase	aztreonam, cefalosporinas, penicilinas, carbapenênicos	Inativação
QnrS1	quinolone resistance protein (qnr)	Fluoroquinolonas	Modificação do alvo
APH (3') -VI	APH (3')	Aminoglicosídeos	Inativação
NDM-1	NDM beta-lactamase	carbapenênicos, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas	Inativação
sul2	sulfonamide resistant sul	Sulfonamidas	Modificação do alvo
CTX-M-15	CTX-M beta-lactamase	Cefalosporinas	Inativação

tet(D)	Bomba de efluxo (MFS)	Tetraciclinas	Bomba de efluxo
OXA-1	OXA beta-lactamase	cefalosporinas, penicilinas	Inativação

Fonte: a autora

Anexo 2- Genes de resistência detectados em *Escherichia coli* 16211RM

gene	AMR resistência	Antimicrobianos	Mecanismo de resistência
msbA	Bomba de efluxo (ABC)	nitroimidazóis	Bomba de efluxo
Escherichia coli ampC beta-lactamase	ampC beta-lactamase	cefalosporinas, penicilinas	Inativação
mdtN	Bomba de efluxo (MFS)	Nucleosídeos	Bomba de efluxo
mdtP	Bomba de efluxo (MFS)	Nucleosídeos	Bomba de efluxo
TolC	Bomba de efluxo (ABC), Bomba de efluxo (MFS), Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas, glicilciclinas, cefamicinas, penicilinas, tetraciclinas, peptideos, aminocoumarinas, rifamicina, cloranfenicol, triclosan, penicilinas	Bomba de efluxo
bacA	undecaprenyl	Peptídeos	Modificação

	pyrophosphate related proteins		do alvo
AcrE	Bomba de efluxo (RND)	fluoroquinolonas, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas	Bomba de efluxo
AcrF	Bomba de efluxo (RND)	fluoroquinolonas, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas	Bomba de efluxo
evgS	Bomba de efluxo (MFS), Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, penicilinas, tetraciclinas	Bomba de efluxo
evgA	Bomba de efluxo (MFS), Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, penicilinas, tetraciclinas	Bomba de efluxo
mdtA	Bomba de efluxo (RND)	Aminocoumarinas	Bomba de efluxo
mdtB	Bomba de efluxo (RND)	Aminocoumarinas	Bomba de efluxo
baeS	Bomba de efluxo (RND)	aminoglicosídeos, aminocoumarinas	Bomba de efluxo
baeR	Bomba de efluxo (RND)	aminoglicosídeos, aminocoumarinas	Bomba de efluxo
Escherichia coli acrA	Bomba de efluxo (RND)	fluoroquinolonas, cefalosporinas, glicilciclinas, penam, tetraciclina, rifamicina, cloranfenicol, triclosan	Bomba de efluxo
acrB	Bomba de efluxo (RND)	fluoroquinolonas, cefalosporinas, glicilciclinas, penicilinas, tetraciclina, rifamicinas, cloranfenicol, triclosan	Bomba de efluxo
Escherichia coli ampH	ampC beta-lactamase	cefalosporinas, penicilinas	inativação

beta-lactamase			
sul2	sulfonamide resistant sul	Sulfonamidas	Modificação do alvo
cpxA	Bomba de efluxo (RND)	aminoglicosídeo, aminocoumarina	Bomba de efluxo
kdpE	kdpDE	Aminoglicosídeos	Bomba de efluxo
H-NS	Bomba de efluxo (MFS), Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas, tetraciclina	Bomba de efluxo
mdtH	Bomba de efluxo (MFS)	fluoroquinolonas	Bomba de efluxo
PmrF	pmr fosfoetanolamina transferase	Peptídeos	alteração de alvo
marA	Bomba de efluxo (RND), Porina com permeabilidade reduzida a beta-lactâmicos	fluoroquinolonas, aztreonam, carbapenêmicos, cefalosporinas, gliciliclinas, cefamicinas, penicilinas, tetraciclina, rifamicina, cloranfenicol, triclosan, penicilinas	Bomba de efluxo, redução da permeabilidade
emrB	Bomba de efluxo (MFS)	fluoroquinolonas	Bomba de efluxo
emrR	Bomba de efluxo (MFS)	Fluoroquinolonas	Bomba de efluxo
YojI	Bomba de efluxo (ABC)	Peptídeos	Bomba de efluxo
mdtE	Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, penicilinas	Bomba de efluxo

mdtF	Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, penicilinas	Bomba de efluxo
gadX	Bomba de efluxo (RND)	macrolídeos, fluoroquinolonas, penicilina	Bomba de efluxo
BRP(MBL)	Resistência a bleomicina	Glicopeptídeos	Inativação
NDM-1	NDM beta-lactamase	carbapenênicos, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas	Inativação
sulI	sulfonamidas	Sulfonamidas	Modificação do alvo
Erm (42)	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase	macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas	Modificação do alvo
catI	cloranfenicol acetiltransferase (CAT)	cloranfenicol	Inativação
CTX-M-15	CTX-M beta-lactamase	cefalosporinas	Inativação
tet(C)	Bomba de efluxo (MFS)	Tetraciclina	Bomba de efluxo
OXA-1	OXA beta-lactamase	cefalosporinas, penicilinas	Inativação
AAC (6') -Ib-cr	AAC (6')	fluoroquinolonas, aminoglicosídeos	Inativação
dfrA12	dfr trimethoprim dihidrofolato redutase	diaminopirimidinas	Modificação do alvo

Fonte: A autora.

Anexo 3 - Genes de resistência detectados em *Enterobacter hormachei* 20257RM

Gene	AMR resistência	antimicrobianos	Mecanismo de resistência
ACT-24	ACT beta-lactamase	carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas	Inativação
NDM-1	NDM beta-lactamase	carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas	Inativação

Fonte: a autora