

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

**LARISSA BAIL**

**Atividade antimicrobiana da plazomicina, ceftazidima-  
avibactam e imipenem-relebactam em *Enterobacterales*  
produtores de carbapenemases isolados em hospitais  
brasileiros**

**Curitiba**

**2022**

**LARISSA BAIL**

**Atividade antimicrobiana da plazomicina, ceftazidima-  
avibactam e imipenem-relebactam em *Enterobacterales*  
produtores de carbapenemases isolados em hospitais  
brasileiros**

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 grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keite da Silva Nogueira

CURITIBA

2022

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

Bail, Larissa

B154a Atividade antimicrobiana da plazomicina, ceftazidima avibactam e imipenem-  
2022 relebactam em enterobacterales produtores de carbapenemases isolados em  
hospitais brasileiros / Larissa Bail; orientador: Felipe Francisco Bondan Tuon ;  
co-orientadora: Keite da Silva Nogueira. – 2022.

156 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2022

Bibliografia: f. 135-156

1. Hospitais - Brasil. 2. RNA Ribossômico 16S. 3. Serratia marcescens.  
4. Anti-Infeciosos. 5. Enterobactérias. I. Tuon, Felipe Francisco Bondan.  
II. Nogueira, Keite da Silva. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 610.6981



**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 24 dias do mês de outubro de 2022 às 15:30, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese "Atividade antimicrobiana da plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam em Enterobacterales produtores de carbapenemases isolados em hospitais brasileiros" apresentado por Larissa Bail 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	
Prof. Dr. Dany Alberto Mesa Fiaga (FPP)	
Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro (UFSC)	
Profa. Dra. Milena Dropa (USP)	
Prof. Dr. Jaime Luis Lopes Rocha (PUCPR)	

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: <b>APROVADA</b>
Prof. Dr. Dany Alberto Mesa Fiaga	Conceito: <b>APROVADA</b>
Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro	Conceito: <b>APROVADA</b>
Profa. Dra. Milena Dropa	Conceito: <b>APROVADA</b>
Prof. Dr. Jaime Luis Lopes Rocha	Conceito: <b>APROVADA</b>

Parecer Final: **APROVADA**

Observações da Banca Examinadora:

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

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

*Esta tese foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratory of Emerging Infectious Diseases (LEID) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, coordenado pelo Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon. Este estudo teve o apoio da Achaogen, Merck e Pfizer.*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Heitor, por ser o responsável pela minha força para vencer mais esta etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que deixou meus problemas, lágrimas e tropeços pequenos diante da Sua presença.

Aos meus amados pais, Altayr e Soeli, meus maiores incentivadores nessa caminhada. Nunca mediram esforços para me ajudar e foi assim a minha vida inteira. Meus exemplos de honestidade, perseverança e do significado da palavra amor. Assumiram a minha jornada nos meus momentos de ausência, cuidaram do Heitor com tanto afeto que não tenho nem palavras para agradecer. Que sorte a minha por serem os meus pais, obrigada Deus pela vida deles.

À minha família, cada um ajudando de uma forma. Minha irmã Giova, minha parceira, que me socorria com o leva e traz do Heitor, sempre com sua risada larga e gostosa. Aos meus primos Zico, Bri e Marinoca, sempre dispostos a distrair o Heitor na minha ausência. E aí tem a turma da reza, tia Salete, meu avô João que, no auge dos seus 100 anos, sempre com uma lição de vida, meus primos queridos Dudu, Pri e JE, a turma dos States tio Jeam, Deva, Isabela e Mariana que, mesmo longe, sempre se preocuparam comigo. Vó Tida, que sempre orou por mim. Thiago, obrigada pela parceria e por todo amor que tem com o Heitor. Márcia, minha fiel escudeira, organizava tudo na minha ausência sempre com alegria e disposição. Minha gratidão eterna a vocês.

Carmen, ter feito esse doutorado na sua companhia foi meu maior presente. Quantas risadas nas nossas idas e vindas a Curitiba. Uma dirigia e a outra lia para conseguirmos estudar no carro também. Nossas sessões intermináveis de terapia, quando uma estava desanimada, a outra dava força. Nada teria sido tão leve e prazeroso sem você, minha irmã de coração. Julia, quem diria, a filha da Carmen que tinha apenas três anos quando eu a conheci. Me recebeu em sua casa em Curitiba e foi meu socorro para todos os perrengues com o computador. Obrigada por tudo e por tanto.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Francisco Tuon. Quanto conhecimento nos passou, de uma forma leve e atenta, apesar de ser uma das pessoas mais dinâmicas e atarefadas que eu conheço. Me aceitou como orientanda sem

mesmo me conhecer direito. Esse seu lado *workaholic* fez render várias publicações, ele não desiste nunca.

À minha co-orientadora, Keite da Silva Nogueira, que foi muito mais do que isso, foi e continuará sendo minha grande amiga e inspiração. Ela também deixou sua família para estar ao meu lado na bancada do HC em muitos momentos, com toda aquela paciência e carinho que fazem dela uma professora e profissional admirável e exemplar. Obrigada por me ouvir e me acolher nos momentos mais estressantes, sempre com esse teu jeito doce, mesmo também passando por vários momentos difíceis em sua vida.

À minha orientadora do mestrado, Dra. Libera Maria Dalla Costa, por ter aceitado o desafio de me iniciar na pesquisa e me transferir tanto conhecimento com dinamismo e amor.

À toda equipe do Lacen/PR que abriu suas portas e nos permitiu trabalhar com as amostras biológicas lá guardadas com capricho durante anos. Em especial a minha amiga e companheira de doutorado, Lavínia, que me ensinou muito sobre biologia molecular, mostrou o caminho das pedras, com seu jeito extrovertido e carinhoso. Ao Dr. Marcelo Pilonetto que nos ajudou com o sequenciamento das amostras, sempre calmo e com seu dom de professor. Aos chefes do Lacen/PR, em especial a Dra. Célia Fagundes da Cruz, que incentivou esta pesquisa.

A todos os meus amigos de Ponta Grossa, que me distraíam aos finais de semana, em especial aos meus grupos da Próxima Viagem, da Segunda Insana, do Ciclismo, do Café da Manhã, souberam entender meus momentos distante e nunca largaram minha mão.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa que permitiu meu afastamento durante mais de três anos para concluir meu doutorado. Aos meus colegas de departamento que assumiram minhas aulas, em especial a professora Elisângela Gueiber Montes, que se sobrecarregou em um dos momentos mais difíceis do ensino, a pandemia de COVID-19. Ao professor Airton Vicente Pereira que nos orientou com todo seu conhecimento em Química Farmacêutica para a padronização do teste de microdiluição em caldo.

Às minhas queridas amigas do Hospital de Clínicas, Adriane e Laura, que sempre com carinho me receberam e ajudaram quando precisei de socorro, muito obrigada.

Aos orientandos do LEID, pela parceria e incentivo. Em especial à Victoria Tasca Ribeiro que nos deu apoio e sempre se mostrou muito disponível para nos ajudar na bancada. Agradeço também a Paula pela sua dedicação ao LEID e a todos os orientandos.

Ao Dany Mesa, bioinformata do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, que fez as análises dos genomas. Mesmo sem te conhecer pessoalmente, admiro muito seu trabalho e serei eternamente grata pela ajuda em uma etapa desafiadora do meu trabalho.

Ao Instituto para Pesquisa do Câncer em Guarapuava, em nome da Dra. Kamila Peronni, que realizaram o sequenciamento de genoma completo das nossas amostras.

Ao André Bittencourt Lorusso e Helisson Faoro do Instituto Carlos Chagas, que fizeram a montagem e anotação dos genomas.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dr<sup>a</sup> Jussara Kasuko Palmeiro e Dr. Fábio Motta, por dedicarem seus tempos para realizar importantes contribuições para a minha tese. Muito obrigada!

Aos membros da minha banca de defesa, Dr<sup>a</sup> Jussara Kasuko Palmeiro, Dr<sup>a</sup> Milena Dropa, Dr. Dany Mesa e Dr. Jaime Rocha, por todas as considerações realizadas e que ajudaram muito a finalizar essa tese.

## EPÍGRAFE

*“Tudo vem no seu devido tempo. Nem cedo demais, nem tarde demais, mas no tempo propício para o nosso aprendizado, para o nosso amadurecimento.”*

*(Waan Oliver)*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química da plazomicina e locais de atuação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.....	38
Figura 1.2 - Locais alvo de metilação no sítio A de 16S-rRNA pelas metiltransferases.....	41
Figura 1.3 - Interação entre a molécula de plazomicina e os nucleotídeos do sítio A de 16S-rRNA das bactérias gram-negativas .....	43
Figura 1.4 - Estrutura química dos inibidores de beta-lactamases do grupo diazabiciclooctanos .....	45
Figura 1.5 - Mecanismos de inibição de serino-beta-lactamases pelo avibactam.....	46
Figura 1.6 – Representação conformacional esquemática da alça $\Omega$ e da sequência de aminoácidos em variantes de serino-beta-lactamases .....	48
Figura 1.7 – Mecanismo de regulação da expressão do gene <i>ampC</i> em bactérias gram-negativas .....	50
Figura 1.8 – Regulação da expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC e da porina OmpF em <i>E. coli</i> .....	54
Figura 1.9 - Bases genéticas da resistência antimicrobiana .....	57
Figura 2.1 – Clonalidade das amostras com CIM $\geq$ 4 mg/L para a plazomicina pela técnica de ERIC-PCR.....	72
Figura 3.1 – Pesquisa de MBLs do tipo NDM, IMP e VIM para 5 amostras resistentes ao CAZ/AVI através do teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5.....	98
Figura 4.1 – Análise filogenética das amostras de <i>Serratia marcescens</i> .....	114
Figura 4.2 – Alterações no gene <i>ompF</i> presentes nas amostras LEID3 e LEID4.....	126
Figura 4.3 – Comparação entre o conteúdo gênico das cepas avaliadas e cepa referência usando algoritmo BLAST .....	130

## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Primers utilizados na realização de 2 multiplex PCR simples para detecção de metiltransferases.....	65
Quadro 2.2 - Primers utilizados para o sequenciamento de metiltransferases .	66
Quadro 4.1 – Mutações presentes nos produtos gênicos AmpR, AmpD e SRT-2/AmpC em <i>S. marcescens</i> .....	120
Quadro 4.2 - Mutações presentes nos produtos gênicos GyrA, GyrB, ParC e ParE em <i>S. marcescens</i> .....	123
Quadro 4.3 - Mutações em porinas OmpF e OmpC encontradas nas amostras de <i>S. marcescens</i> .....	127
Quadro 4.4 – Mutações presentes nos produtos gênicos responsáveis pelo controle da expressão de bombas de efluxo AcrAB-TolC nas amostras de <i>S. marcescens</i> .....	129

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1 - Atividade da plazomicina e agentes comparadores contra 499 <i>Enterobacterales</i> produtores de carbapenemase isolados de 50 hospitais brasileiros (2013 a 2015).....	67
Tabela 2.2 – Distribuição da CIM para a plazomicina de acordo com a sensibilidade à gentamicina e amicacina utilizando os pontos de corte do CLSI... ..	70
Tabela 2.3 - Distribuição da CIM para a plazomicina em relação ao tipo de carbapenemase produzida pelo isolado .....	71
Tabela 2.4 - Características dos isolados de <i>Enterobacterales</i> produtores de carbapenemas com CIM $\geq 4$ mg/L para a plazomicina .....	73
Tabela 2.5 - Distribuição de 16S-rRNA metiltransferases em isolados clínicos de <i>Enterobacterales</i> não sensíveis à plazomicina de acordo com os pontos de corte do FDA.....	77
Tabela 3.1 – Atividade e perfil de sensibilidade de CAZ/AVI, IMI/REL e agentes comparadores contra <i>Enterobacterales</i> produtores de KPC, segundo as diretrizes do CLSI e EUCAST .....	95
Tabela 3.2 – Pesquisa de carbapenemase OXA-48 em amostras de <i>Enterobacterales</i> KPC positivas e não sensíveis ao IMI/REL segundo critérios de interpretação do CLSI e/ou EUCAST através do teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5.....	102
Tabela 4.1 – Características e concentração inibitória mínima dos isolados de <i>Serratia marcescens</i> selecionados para o sequenciamento de genoma completo.....	113
Tabela 4.2 – Características genômicas e genes de resistência detectados em <i>S. marcescens</i> através do sequenciamento de genoma completo... ..	116

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAC	Aminoglicosídeo N-acetiltransferase
AAD	Aminoglicosídeo adeniltransferase
AB	Ácido borônico
ACHN-490	Plazomicina
ANT	Aminoglicosídeo O-nucleotidiltransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APH	Aminoglicosídeo O-fosfotransferase
AVE1330A	Avibactam
BKC-1	<i>Brazilian Klebsiella carbapenemase</i>
BL	Beta-lactamase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CARE	<i>Combating Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae</i>
CAZ/AVI	Ceftazidima-avibactam
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
DBO	Diazabicyclooctano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DOS	Deoxiestreptamina
ECOFF	<i>Epidemiological cut-off value</i>
EDP-I	Fase I dependente de energia
EDP-II	Fase II dependente de energia
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMAs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
EPC	Enterobactérias produtoras de carbapenemases
ERC	Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction</i>
ESAC	AmpC de espectro estendido
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido

EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee On Antimicrobial Suseptibility Testing</i>
EV	Endovenosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOX	<i>Cefoxitin-hydrolyzing beta-lactamase</i>
GES	<i>Guiana extended-spectrum beta-lactamase</i>
GIM	<i>German imipenemase</i>
HABA	Ácido hidroxiaminobutírico
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IIAc	Infecção intra-abdominal complicada
IMI/NMC-A	<i>Imipenemase/non-metallo-carbapenemase-A</i>
IMI/REL	Imipenem-relebactam
IMP	<i>Imipenem-resistant Pseudomonas carbapenemases</i>
IPEC	Instituto para Pesquisa do Câncer
IPTM	Infecção de pele e tecidos moles
IRAs	Infecções relacionadas a assistência à saúde
ITU	Infecção do trato urinário
ITUc	Infecção do trato urinário complicada
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LEID	<i>Laboratory of Emerging Infectious Diseases</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metallo-beta-lactamase
MDC	Microdiluição em caldo
MK-7655	Relebactam
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM	<i>New Delhi metallo-beta-lactamase</i>
NXL104	Avibactam
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA $\beta$ N	Fenilalanina-arginil $\beta$ -naftilamida
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PAH	Pneumonia adquirida no hospital
PAV	Pneumonia associada a ventilação mecânica
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PD	farmacodinâmica
PK	farmacocinética
PMBN	Nonapeptídeo de polimixina B
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
SAH	S-adenosil-monocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SFC	<i>Serratia fonticola carbapenemase</i>
SHV	<i>Sulfhydryl variable lactamase</i>
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
SMART	<i>Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>
SME	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
SNV	<i>Single nucleotide variant</i>
SPM	<i>São Paulo metallo-beta-lactamase</i>
TEM	<i>Temoneira beta-lactamase</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIM	<i>Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>

## RESUMO

**Introdução:** *Enterobacteriales* produtores de carbapenemases (EPCs) são motivo de grande preocupação em várias partes do mundo devido à dificuldade do tratamento. Atualmente, vários novos agentes contra patógenos resistentes aos carbapenêmicos foram aprovados pelo FDA ou estão em estágio avançado de desenvolvimento. **Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana da plazomicina, ceftazidima-avibactam (CAZ/AVI), imipenem-relebactam (IMI/REL) e outros agentes antimicrobianos em EPCs isoladas em hospitais brasileiros. **Métodos:** a partir da análise de 4000 *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos, 499 amostras produtoras de carbapenemases ( $bla_{KPC-2} = 397$ ,  $bla_{NDM-1} = 81$ ,  $bla_{OXA-48-like} = 13$ ,  $bla_{IMP} = 3$ ,  $bla_{GES-like} = 2$ ,  $bla_{BKC-1} = 1$ ,  $bla_{VIM} = 1$  e  $bla_{KPC-2} + bla_{NDM-1} = 1$ ) foram selecionadas para determinação do perfil de sensibilidade à plazomicina e 299 amostras produtoras de  $bla_{KPC-2}$  foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade ao CAZ/AVI e IMI/REL. A presença de 16S-rRNA metiltransferases (16S-RMTase) foi investigada nas amostras com CIM  $\geq 4$  mg/L para a plazomicina e a presença de metalo-beta-lactamases e OXA-48-like foi investigada nas amostras com CIM  $\geq 16$  mg/L para CAZ/AVI e  $\geq 2$  mg/L para IMI/REL, respectivamente, pelo teste rápido imunocromatográfico NG-Test Carba 5. O sequenciamento de genoma completo (WGS) foi realizado para quatro amostras de *S. marcescens* produtoras de KPC que apresentaram resistência à plazomicina, CAZ/AVI ou IMI/REL que não apresentaram determinantes conhecidos de resistência. **Resultados:** A plazomicina foi ativa contra 86% das EPCs e apresentou CIM  $\leq 2$  mg/L para 86% das amostras KPC-2 positivas, 84% das NDM-1 positivas e 92% das OXA-48-like positivas. Com base nos pontos de corte do EUCAST, a sensibilidade à tigeciclina, colistina, ampicacina e gentamicina foi de 76%, 67%, 62% e 19%, respectivamente. A prevalência de 16S-RMTase entre os 499 isolados de EPCs foi elevada (10,8%). RmtB-1 foi a 16S-RMTase prevalente entre as EPCs (75,9%), principalmente em *K. pneumoniae* produtora de KPC-2. Outras 16S-RMTases detectadas foram ArmA (13%), RmtD-1 (1,8%), RmtD-2 (5,5%) e RmtC (3,7%). Entre as 299 amostras de *Enterobacteriales*  $bla_{KPC-2}$  positivas, CAZ/AVI apresentou a maior taxa de sensibilidade (98%), seguido de IMI/REL (96% e 91%, de acordo com EUCAST e CLSI, respectivamente). Entre as cinco amostras resistentes ao CAZ/AVI, o teste imunocromatográfico identificou a presença de NDM associada à KPC em três amostras e elucidou os altos níveis de resistência ao CAZ/AVI. A análise através de WGS permitiu-nos identificar mutações gênicas que podem estar relacionadas com a resistência aos novos antimicrobianos. Estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência. **Conclusão:** A plazomicina pode ser considerada uma droga promissora na terapia antimicrobiana para EPCs em nosso país, incluindo isolados produtores de NDM-1. CAZ/AVI e IMI/REL são alternativas valiosas para o tratamento das infecções causadas por *Enterobacteriales* produtores de KPC, especialmente no Brasil, onde essa enzima é endêmica e as opções terapêuticas são limitadas.

**Palavras-chave:** plazomicina, ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam, 16S-rRNA metiltransferases, *Serratia marcescens*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (EPCs) are a major problem in many parts of the world due to the difficulty of treatment. Currently, several new agents against carbapenem-resistant pathogens have been approved by the FDA or are in an advanced stage of development. **Objective:** To evaluate the antimicrobial activity of plazomycin, ceftazidime-avibactam (CAZ/AV), imipenem-relebactam (IMI/REL) and other antimicrobial agents in EPCs, isolated in Brazilian hospitals. **Methods:** from the analysis of 4000 carbapenem-resistant *Enterobacterales*, 499 reproducible carbapenemases ( $bla_{KPC-2} = 397$ ,  $bla_{NDM-1} = 81$ ,  $bla_{OXA-48-like} = 13$ ,  $bla_{IMP} = 3$ ,  $bla_{GES-like} = 2$ ,  $bla_{BKC-1}$ ,  $bla_{VIM} = 1$  and  $bla_{KPC-2} + bla_{NDM-1}$ ) were selected for plazomycin sensitivity profile determination and 299 were screened for CAZ/AVI and IMI/REL sensitivity. The presence of 16S-rRNA methyltransferases (16S-RMTase) was investigated in samples with MIC  $\geq 4$  mg/L for plazomycin and the presence of metallo-beta-lactamases and OXA-48-like was investigated in samples with MIC  $\geq 16$  mg/L for CAZ/AVI and  $\geq 2$  mg/L for IMI/REL, respectively, by the rapid immunochromatographic test NG-Test Carba 5. Whole genome sequencing (WGS) was performed for four KPC-producing *S. marcescens* samples that showed resistance to plazomycin, CAZ/AVI, or IMI/REL that had no known determinants of resistance. **Results:** Plazomycin was active against 86% of EPCs and had a MIC  $\leq 2$  mg/L for 86% of KPC-2 positive samples, 84% for NDM-1 positive and 92% for OXA-48 positive. Based on the EUCAST cut-off points, the sensitivity to tigecycline, colistin, amikacin, and gentamicin was 76%, 67%, 62%, and 19%, respectively. The prevalence of 16S-RMTase among the 499 EPC isolates was highest (10.8%). RmtB-1 was the 16S-RMTase prevalent among EPCs (75.9%), mainly in *K. pneumoniae* producing KPC-2. Other 16S-RMTases detected were ArmA (13%), RmtD1 (1.8%), RmtD-2 (5.5%) and RmtC (3.7%). Among the 299  $bla_{KPC-2}$  positive samples, CAZ/AVI had the highest sensitivity rate (98%), followed by IMI/REL (96% and 91%, according to EUCAST and CLSI, respectively). Among the five CAZ/AVI resistant samples, the immunochromatographic test identified the presence of KPC-associated NDM in three samples and elucidated the high levels of CAZ/AVI resistance. Analysis through WGS allowed us to identify gene mutations that may be related to resistance to new antimicrobials. Future studies are needed for a better understanding of resistance mechanisms. **Conclusion:** Plazomycin can be considered a promising drug for antimicrobial therapy for EPCs in our country, including NDM-1-producing isolates. CAZ/AVI and IMI/REL are valuable alternatives for the treatment of infections caused by KPC-producing *Enterobacterales*, especially in Brazil, where this enzyme is endemic and therapeutic options are limited.

**Keywords:** plazomycin, ceftazidime-avibactam, imipenem-relebactam, 16S-rRNA methyltransferases, *Serratia marcescens*.

## RESUMO POPULAR

O tratamento de bactérias resistentes a quase todos os antibióticos tornou-se um desafio em todas as partes do mundo. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou essas bactérias uma ameaça global e as incluiu em uma lista de prioridades críticas para as quais são necessárias pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos com urgência. Plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam surgem nesse cenário como opções de tratamento importantes, pois apresentam potente atividade contra enterobactérias produtoras de KPC, a principal enzima que degrada os antibióticos carbapenêmicos em nosso país. O presente estudo avaliou a eficácia da plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam contra diferentes enterobactérias produtoras de carbapenemases. A plazomicina mostrou-se ativa contra 86% das EPCs testadas. A prevalência de metiltransferases (modificações que geram alterações no sítio de ligação da plazomicina) entre os isolados de EPCs foi elevada (10,8%) e a coexistência de metiltransferases e carbapenemases é preocupante devido às opções limitadas de tratamento e à característica endêmica de KPC no Brasil. Entre as 299 amostras KPC positivas, ceftazidima-avibactam foi o antibiótico que apresentou a maior taxa de sensibilidade (98%), seguido por imipenem-relebactam. O uso de teste rápido imunocromatográfico identificou três amostras coprodutoras de NDM entre as amostras KPC positivas resistentes à ceftazidima-avibactam, um dado preocupante pois a enzima NDM é mais resistente às novas opções de tratamento. Métodos diagnósticos rápidos são de fundamental importância para garantir a eficácia do tratamento com esses agentes. A análise do genoma de quatro amostras de *S. marcescens* permitiu-nos identificar alterações que podem estar relacionadas com a resistência aos novos antimicrobianos. Estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência. Com base nesses achados, plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam podem ser consideradas importantes opções terapêuticas para bactérias com elevado perfil de resistência em nosso país.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE QUADROS.....	ii
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iv
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
RESUMO POPULAR .....	ix
SUMÁRIO.....	x
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
1.1 ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES .....	27
<b>1.1.1 Classificação das carbapenemases .....</b>	<b>28</b>
1.2 NOVAS OPÇÕES TERAPÊUTICAS APROVADAS PELO FDA PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>ENTEROBACTEREALES</i> PRODUTORES DE CARBAPENEMASES .....	31
<b>1.2.1 Plazomicina.....</b>	<b>32</b>
1.2.1.1 Mecanismo de ação .....	34
1.2.1.2 Mecanismos de resistência.....	36
1.2.1.2.1 Produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.....	36
1.2.1.2.2 Produção de 16S-rRNA metiltransferases .....	39
<b>1.2.2 Ceftazidima-avibactam .....</b>	<b>44</b>
1.2.2.1 Mecanismo de ação .....	45
1.2.2.2 Mecanismos de resistência.....	47
<b>1.2.3 Imipenem-relebactam .....</b>	<b>51</b>

1.2.3.1 Mecanismo de ação .....	52
1.2.3.2 Mecanismos de resistência .....	52
1.3 USO DE NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA PARA PESQUISA DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	56
<b>1.3.1 Sequenciamento de segunda geração ou de leituras curtas (<i>short-reads</i>).....</b>	<b>58</b>
<b>1.3.2 Sequenciamento de terceira geração ou de leituras longas (<i>long-reads</i>) e em tempo real (<i>real-time</i>) .....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PLAZOMICINA E DETECÇÃO DE GENES PRODUTORES DE 16S-rRNA METILTRANSFERASES EM ENTEROBACTERALES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES.....</b>	<b>61</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	61
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	62
2.2.1 Isolados .....	62
2.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima .....	63
2.2.3 Seleção de amostras para tipagem molecular por ERIC-PCR .....	63
2.2.4 Detecção de genes codificadores de 16S-rRNA metiltransferases	64
2.2.5 Sequenciamento de genes codificadores de 16S-rRNA metiltransferases.....	65
2.2.6 Análise estatística.....	66
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
2.4 CONCLUSÃO .....	80
2.5 ARTIGOS PUBLICADOS .....	81
2.5.1 Antimicrobial activity of plazomicina against Enterobacteriaceae-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers. ....	81
2.5.2 Distribution of genes encoding 16S-rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing <i>Enterobacteriales</i> in Brazil.....	86
<b>CAPÍTULO 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM E IMIPENEM-RELEBACTAM EM ENTEROBACTERALES PRODUTORES DE KPC..</b>	<b>90</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	90

3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	91
<b>3.2.1 Isolados</b> .....	<b>91</b>
<b>3.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima</b> .....	<b>91</b>
<b>3.2.3 Detecção de metalo-beta-lactamases e OXA-48-like em amostras resistentes ao CAZ/AVI e IMI/REL</b> .....	<b>92</b>
<b>3.2.4 Análise estatística</b> .....	<b>92</b>
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
3.4 CONCLUSÃO .....	104
3.5 ARTIGO PUBLICADO .....	106
<b>3.5.1 Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and KPC-producing Enterobacterales.</b> .....	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO 4. ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM SERRATIA MARCESCENS PRODUTORA DE KPC RESISTENTES À PLAZOMICINA, CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM E/OU IMPENEM-RELEBACTAM...</b>	<b>109</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	109
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	110
<b>4.2.1 Isolados</b> .....	<b>110</b>
<b>4.2.2 Sequenciamento de genoma completo e análises de bioinformática</b> .....	<b>111</b>
<b>4.2.3 Análise filogenética dos quatro isolados de <i>S. marcescens</i></b> .....	<b>112</b>
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	114
<b>4.3.1 Genes de resistência</b> .....	<b>118</b>
4.3.1.1 Resistência aos aminoglicosídeos .....	118
4.3.1.2 Resistência aos beta-lactâmicos .....	119
4.3.1.3 Resistência às fluorquinolonas .....	121
4.3.1.4 Resistência às tetraciclinas .....	123
4.3.1.5 Resistência às polimixinas .....	123
4.3.1.6 Outros genes de resistência .....	124
4.3.1.7 Alterações em porinas OmpF e OmpC .....	125

4.3.1.8 Alterações em bombas de efluxo.....	128
4.4 CONCLUSÃO .....	131
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>135</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento nos casos de infecções causadas por *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) tornou-se motivo de grande preocupação em várias partes do mundo (BONOMO et al., 2018). A presença desses microrganismos no ambiente hospitalar tem sido um desafio constante no que diz respeito ao controle da disseminação e ao tratamento dos pacientes infectados (BASSETTI et al., 2019a).

As ERCs possuem, como principal mecanismo de resistência, a produção de enzimas capazes de inativar todos os representantes da classe dos carbapenêmicos, conhecidas como carbapenemases. Uma ampla variedade de enzimas já foi identificada, com especial atenção para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), codificada em plasmídeo e de fácil disseminação entre *Enterobacterales* (VAN DUIN; DOI, 2017; YOO, 2018). Pacientes infectados por KPC apresentam índices de mortalidade superiores a 40% (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018). A disseminação global de ERCs aumentou consideravelmente nas últimas décadas, expandindo-se para outras espécies de *Enterobacterales* além de *K. pneumoniae* (BABIKER et al., 2021).

Microrganismos produtores de carbapenemases são geralmente resistentes a vários antimicrobianos e as opções terapêuticas são muito limitadas (PETTY et al., 2018). Até a década passada, polimixinas, aminoglicosídeos e tigeciclina eram as únicas alternativas disponíveis; no entanto, casos de resistência simultânea a esses antimicrobianos são cada vez mais relatados em todo o mundo (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020). Esse cenário resultou em uma colaboração global para intensificar o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos contra microrganismos considerados ameaças pela OMS, como é o caso das ERCs (TERRENI; TACCANI; PREGNOLATO, 2021).

Atualmente, vários novos agentes com atividade contra patógenos resistentes aos carbapenêmicos foram aprovados ou estão em estágio avançado de desenvolvimento clínico (DOI, 2019). Entre eles, a plazomicina, um aminoglicosídeo semissintético de última geração derivado da sisomicina e ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo as produtoras de carbapenemases (AGGEN et al., 2010; CASTANHEIRA et al., 2018a;

WALKTY et al., 2019). Uma das principais vantagens frente aos demais aminoglicosídeos é sua toxicidade reduzida e, ao contrário dos outros antimicrobianos da mesma classe, sua atividade *in vitro* não é afetada pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) produzidas pela maioria das *Enterobacterales* (ABDUL-MUTAKABBIR et al., 2019; CASS et al., 2011; COX et al., 2018).

Outras opções são beta-lactâmicos em combinação com novos inibidores de beta-lactamases (avibactam, relebactam e vaborbactam), que demonstraram alta eficácia *in vitro* e boa tolerabilidade em ensaios clínicos (BASSETTI et al., 2018; KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020). Esses novos inibidores possuem estabilidade variável contra as beta-lactamases e particularidades sobre seus mecanismos de ação e farmacocinética, estendendo e recuperando a atividade antimicrobiana de alguns beta-lactâmicos (NOVAL et al., 2020; PATERSON; ISLER; STEWART, 2020).

Um dos principais desafios na busca por novos inibidores de beta-lactamases está em encontrar aquele que seja igualmente eficaz contra todas as classes de enzimas produzidas pelas bactérias (THEURETZBACHER et al., 2020). Até o momento, nenhum dos novos inibidores disponíveis para uso clínico em nosso país possui essa capacidade e ainda são esperados novos antimicrobianos capazes de inativar as EPCs por diferentes mecanismos de ação (VÁZQUEZ-UCHA et al., 2020).

Para organizar os diferentes tópicos abordados, esta tese será apresentada em quatro capítulos, sendo que o capítulo 1 contempla uma revisão da literatura; o capítulo 2 apresenta a atividade antimicrobiana da plazomicina e a detecção de genes produtores de 16S-rRNA metiltransferases em *Enterobacterales* produtores de carbapenemases; o capítulo 3 avalia a atividade antimicrobiana de ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam em *Enterobacterales* produtores de KPC; e o capítulo 4 faz uma análise genética em quatro amostras de *Serratia marcescens* produtor de *bla*<sub>KPC-2</sub> resistente a plazomicina, ceftazidima-avibactam e/ou imipenem-relebactam.

## 2 JUSTIFICATIVA

O tratamento de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos tornou-se um desafio em todas as partes do mundo e o desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento desses microrganismos é uma necessidade constante (NOVAL et al., 2020). Plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam surgem nesse cenário como opções terapêuticas importantes, pois apresentam potente atividade contra *Enterobacterales* produtores de KPC, sendo essa a carbapenemase mais frequente em nosso país (SAMPAIO; GALES, 2016). Dessa forma, torna-se necessário conhecer a atividade desses novos antimicrobianos frente às EPCs brasileiras e os mecanismos de resistência apresentados por tais microrganismos para avaliar a sua indicação e utilização como terapia em nossa região.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana da plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam em *Enterobacterales* produtores de carbapenemases isoladas em hospitais brasileiros.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a taxa de sensibilidade da plazomicina, ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam e agentes comparadores segundo as diretrizes do CLSI/FDA e EUCAST.
- Determinar a prevalência de metiltransferases em amostras com CIM  $\geq$  4 mg/L para a plazomicina e correlacionar com a produção de carbapenemases.
- Investigar as variantes dos genes codificadores de metiltransferases por meio de sequenciamento pelo método de Sanger.
- Avaliar o desempenho do teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa de metalo-beta-lactamases em amostras de *Enterobacterales* produtores de KPC resistentes à ceftazidima-avibactam e de OXA-48-like em amostras resistentes ao imipenem-relebactam.
- Identificar genes e mutações envolvidos na resistência à plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam através do sequenciamento de segunda geração pela plataforma Illumina.

## CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES

Na microbiologia, a década de 80 foi marcada pelo surgimento das primeiras enzimas capazes de degradar cefalosporinas de terceira geração em *Enterobacterales* (SIROT et al., 1988). Essas enzimas ficaram conhecidas como beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e o uso de carbapenêmicos passou a ser largamente difundido. Como era de se esperar, o surgimento de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) foi a consequência, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), devido ao uso elevado de antimicrobianos, a necessidade de dispositivos invasivos e comorbidades dos pacientes (BUSH; BRADFORD, 2020).

Segundo pesquisa realizada pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY em 2017, a frequência de ERCs vem aumentando e apresenta-se de forma muito variada entre os continentes (SADER et al., 2019). Nos Estados Unidos, são responsáveis por mais de 13.000 infecções nosocomiais e contribuem para mais de 1.000 mortes anualmente (TAMMA et al., 2021).

Em 2017, a OMS considerou as ERCs uma ameaça global e as incluiu em uma lista de prioridade crítica para as quais são necessárias pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos com urgência (TACCONELLI et al., 2018). O Brasil está entre os seis países que apresentam taxa de resistência aos carbapenêmicos superior a 10%, um dado preocupante e que coloca nosso país sob ameaça de falta de opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por ERCs (DIAS et al., 2021; SADER et al., 2019).

*Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são consideradas importantes reservatórios de genes de resistência aos carbapenêmicos e, como essas bactérias estão presentes na microbiota intestinal de humanos, animais, no meio ambiente e em alimentos, a adaptabilidade à pressão seletiva, a capacidade de mutação e a disseminação horizontal mediada por plasmídeos podem ocorrer entre os diferentes nichos (MELETIS, 2016).

A resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacterales* pode ser mediada tanto pela produção de carbapenemases quanto pela hiperprodução de ESBL ou de cefalosporinase AmpC associadas com impermeabilidade da

membrana ou hiperexpressão de bombas de efluxo. A produção de carbapenemases é o mecanismo mais preocupante pelo seu amplo espectro de atividade e pela sua disseminação global (ELSHAMY; ABOSHANAB, 2020).

### 1.1.1 Classificação das carbapenemases

As carbapenemases são enzimas que hidrolisam carbapenêmicos, encontram-se subdivididas nas classes moleculares A, B e D de Ambler e variam significativamente em sua estrutura (AMBLER, 1980; MATLOCK et al., 2021; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016). Essas enzimas são facilmente transferidas através de elementos genéticos móveis e, frequentemente, vêm acompanhadas de resistência aditiva ou sinérgica a múltiplas classes de antimicrobianos, até mesmo a drogas tipicamente reservadas como última linha terapêutica como as polimixinas, aminoglicosídeos e tigeciclina (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020).

As enzimas de classe C de Ambler são consideradas cefalosporinases segundo Bush & Jacoby (2010), classificação que leva em consideração a degradação de substratos (penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas) e efeitos nos inibidores de beta-lactamases (BUSH; JACOBY, 2010). Algumas variantes podem diminuir a sensibilidade aos carbapenêmicos e, por esta razão, são denominadas AmpC de espectro estendido (ESAC) (NORDMANN; MAMMERI, 2007). CMY-2, CMY-10, CMY-19, CMY-37, DHA-1 e ADC-68 são exemplos de mutantes encontradas em plasmídeos, que apresentam certa atividade em carbapenêmicos (LEE et al., 2016; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020).

As enzimas das classes A, C e D são conhecidas como serino-beta-lactamases por possuírem uma serina em seu sítio catalítico ativo, enquanto que as da classe B são conhecidas como metalo-beta-lactamases (MBL), pois necessitam de zinco como cofator para sua atividade catalítica (BUSH; JACOBY, 2010; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016).

A primeira carbapenemase descrita foi uma serino-carbapenemase pertencente à classe A, identificada no cromossomo de *Serratia marcescens* nos anos 80 no continente europeu. Essa enzima ficou conhecida como SME (*Serratia marcescens* enzyme) (YANG; WU; LIVERMORE, 1990). No entanto, a principal representante dessa classe é a KPC (*Klebsiella pneumoniae*

carbapenemase), descrita pela primeira vez em 2001 no estado da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, em um isolado de *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001). Atualmente, é considerada endêmica na China, Itália, Grécia, Estados Unidos e em alguns países da América do Sul (CUI; ZHANG; DU, 2019; SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019). KPC-2 e KPC-3 são as mais isoladas e bem caracterizadas entre mais de 100 variantes (NAAS et al., 2017).

No Brasil, a primeira carbapenemase encontrada em *Enterobacterales* foi uma KPC-2 em *K. pneumoniae* isolada em Recife, Pernambuco, em 2006 (MONTEIRO et al., 2009). Atualmente, é a principal carbapenemase identificada e endêmica em nosso país (SAMPAIO; GALES, 2016). Em *K. pneumoniae* geralmente é encontrada em diferentes linhagens internacionais como ST258 (mais comum), ST101 e ST15, tendo *bla<sub>KPC</sub>* localizado em plasmídeos e inserido no transposon Tn4401 (MARTINS et al., 2020; SILVEIRA et al., 2021).

Outras serino-carbapenemases de classe A descritas, porém menos frequentes, são IMI/NMC-A (*imipenemase/non-metallo carbapenemase-A*), SFC (*Serratia fonticola carbapenemase*) e algumas variantes de GES (*Guiana extended-spectrum beta-lactamase*), que podem apresentar atividade de carbapenemase (GARCÍA-BETANCUR et al., 2021; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020). Em 2015, Nicoletti et al. identificaram em *K. pneumoniae* isolada de amostras de três pacientes na cidade de São Paulo uma nova carbapenemase mediada por plasmídeo que ficou conhecida como *Brazilian Klebsiella carbapenemase* (BKC-1) (NICOLETTI et al., 2015). Desde sua descoberta não houve relatos de detecção em outras partes do mundo e outros isolados brasileiros são raros (MARTINS et al., 2016).

A classe D é representada pelas oxacilinas e as enzimas OXA-48-like, OXA-23-like, OXA-181-like, OXA-40-like e OXA-58-like apresentam atividade de carbapenemases (NORDMANN; POIREL, 2019). O primeiro isolado produtor de OXA-48-like foi detectado em 2001 na Turquia em *K. pneumoniae*, endêmico desde então no Oriente Médio e no norte da África (MELETIS, 2016; POIREL et al., 2004). Casos esporádicos do gene *bla<sub>OXA-48-like</sub>* entre *Enterobacterales* são registrados em nosso país (BONOMO et al., 2018). Essas enzimas já foram descritas como uma ameaça fantasma por alguns autores, pois não possuem padrão característico de sensibilidade às

cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos, o que dificulta sua identificação laboratorial (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

As bactérias produtoras de MBL fazem parte da classe B de Ambler e inativam todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, com exceção do aztreonam. Emergiram no Japão e na Itália nos anos 90, a partir de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (LAURETTI et al., 1999; WATANABE et al., 1991). As principais MBL são *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM), *São Paulo metallo-beta-lactamase* (SPM), *Imipenem-resistant Pseudomonas carbapenemases* (IMP), *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase* (VIM), *German imipenemase* (GIM) e *Seoul imipenemase* (SIM) (SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019; TOLEMAN et al., 2002).

Em 2008, Yong et al. isolaram pela primeira vez *K. pneumoniae* produtor de NDM em um paciente sueco que viajou para a Índia (YONG et al., 2009). Menos de 5 anos depois, a primeira NDM brasileira foi detectada no cromossomo de *Providencia rettgeri* em um paciente diabético admitido em um hospital de Porto Alegre no Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Apresenta aproximadamente 40 variantes e no Brasil há relatos apenas do gene *bla<sub>NDM-1</sub>* (NAAS et al., 2017). Atualmente é endêmica na Índia, Paquistão, China e Bangladesh (CUI; ZHANG; DU, 2019). As demais MBL são mais frequentes em bactérias gram-negativas não fermentadoras da glicose e SPM está disseminada em *P. aeruginosa* em nosso país (KALLUF et al., 2017; KHUNTAYAPORN; YAMPRAYOONSWAT, 2019).

O programa de vigilância global *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (SMART) avaliou 1.493 amostras de *Enterobacterales* de 55 países isoladas entre 2008 e 2014 e *bla<sub>KPC</sub>* foi o gene mais isolado (53,18%), seguido por *bla<sub>OXA-48-like</sub>* (20,09%) e *bla<sub>NDM</sub>* (19,42%). Os dados apresentados refletem uma distribuição global e a prevalência das carbapenemases difere consideravelmente dependendo da localização geográfica dos isolados (KARLOWSKY et al., 2017).

As carbapenemases apresentam comportamento distinto frente aos antimicrobianos. Saber se um isolado clínico de *Enterobacterales* é produtor de carbapenemase e identificar o tipo de carbapenemase produzida é de

fundamental importância para orientar as decisões de manejo do tratamento (DOI, 2019).

## 1.2 NOVAS OPÇÕES TERAPÊUTICAS APROVADAS PELO FDA PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *ENTEROBACTERALES* PRODUTORES DE CARBAPENEMASES

O tratamento das infecções causadas por *Enterobacterales* produtores de carbapenemases (EPCs) sempre foi um desafio e o uso de antimicrobianos que há anos fazem parte do arsenal terapêutico são ainda utilizados. Aminoglicosídeos, polimixinas, e tigeciclina são alguns exemplos; no entanto, estão geralmente associados com baixa eficácia (devido à resistência e aos perfis farmacocinético e farmacodinâmico) e alta toxicidade (HEO, 2021). A fosfomicina também apresenta sensibilidade elevada frente às EPCs, mas seu uso é direcionado principalmente para o tratamento de infecções do trato urinário (ITUs) (SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019).

Na tentativa de melhorar a eficácia do tratamento de infecções causadas por ERCs, estratégias como a inclusão de um segundo antimicrobiano, infusão prolongada, dosagem aumentada e maior número de doses têm sido amplamente estudadas e mostram utilidade relevante no aumento da probabilidade de atingir o alvo terapêutico, das quais a inclusão de um segundo agente antimicrobiano tem o maior impacto (ALBIERO et al., 2016).

Os carbapenêmicos continuam sendo utilizados para o tratamento de infecções por ERCs. Em isolados com concentração inibitória mínima (CIM)  $\leq 8$  mg/L, um esquema de alta dosagem em infusão prolongada pode ser considerado quando não houver outras opções terapêuticas (SHEU et al., 2019). Uma alternativa é a administração de dois carbapenêmicos diferentes (BULIK; NICOLAU, 2011). Geralmente, a combinação consiste em uma dose inicial de ertapenem seguida de infusão prolongada com meropenem ou doripenem durante 3 ou 4 horas com doses adicionais de 2 g de meropenem a cada 8 horas. Essa terapia é eficaz contra ERCs porque o ertapenem pode desempenhar um papel sacrificial, preferencialmente hidrolisado devido à sua maior afinidade com KPC, permitindo que o segundo carbapenêmico

mantenha-se em alta concentração para o efeito terapêutico (SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019).

O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e de novos inibidores de beta-lactamases é uma importante estratégia adotada para o combate à resistência apresentada por *Enterobacterales* produtores de carbapenemases (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2020). No entanto, nenhum antimicrobiano que possua um novo sítio de ação na bactéria foi desenvolvido nos últimos 20 anos (ARMSTRONG; MILLER, 2010; OTTO, 2017; YIGIT et al., 2001).

Entre as novas opções terapêuticas aprovadas encontram-se a plazomicina e novos inibidores de beta-lactamases associados com beta-lactâmicos, como ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam, que serão avaliados nesta tese (KARAIKOS et al., 2022).

### 1.2.1 Plazomicina

A plazomicina (anteriormente ACHN-490) é um novo aminoglicosídeo semissintético derivado da sisomicina e descrito pela primeira vez em 2009 (ENDIMIANI et al., 2009). Possui atividade *in vitro* contra *Enterobacterales*, *Staphylococcus* spp. e alguns bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose como *Pseudomonas* spp. No entanto, sua atividade é mínima ou ausente para espécies de *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Stenotrophomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Em bactérias anaeróbias gram-negativas ou gram-positivas como *Clostridium* spp., plazomicina mostrou-se inefetiva por utilizar a via aeróbia em seu mecanismo de ação (SHAEER et al., 2019).

A plazomicina possui baixa ligação a proteínas plasmáticas (20%) e 97,5% da droga é recuperada na urina de forma inalterada. A dose e administração aprovadas para uso da plazomicina é de 15 mg/Kg/dia na forma endovenosa (EV) em infusão de 30 minutos nos pacientes com função renal normal ou leve disfunção renal, com o uso de doses mais baixas (7,5 mg/Kg/dia) e monitoramento da terapia em pacientes com disfunção renal moderada a severa (KOMIRENKO et al., 2018). Esse esquema de dose única garante uma maior concentração e área acima da curva em relação à CIM

quando comparado com doses múltiplas diárias e reduz a nefrotoxicidade (CASS et al., 2011; CLARK; BURGESS, 2020).

Um estudo pré-clínico avaliou a eficácia da plazomicina como monoterapia ou em associação com meropenem e tigeciclina em um modelo de sepse causada por *Enterobacterales*. A coadministração de meropenem ou tigeciclina pode levar a uma melhora na sobrevida, corroborando com os achados do estudo clínico NCT01970371 - *Combating Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae* (CARE) de fase III e apoiando o papel da plazomicina no manejo da sepse causada por *Enterobacterales*, incluindo aquelas causadas por isolados resistentes aos carbapenêmicos (ABDELRAOUF et al., 2018; TANG; LAI, 2020).

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos amplamente utilizados na prática clínica. O primeiro representante da classe é a estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus* e descrita pela primeira vez em 1944 por Schatz e Waksman para o tratamento da tuberculose (SCHATZ; BUGIE; WAKSMAN, 2005). Desde então, vários aminoglicosídeos foram descobertos a partir de espécies de *Actinomicetos* como *Streptomyces* e *Micromonospora*, ou através de modificações estruturais na molécula originando antimicrobianos semissintéticos, aumentando o espectro de ação do grupo e consequentemente sua versatilidade (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

A estrutura química dos aminoglicosídeos deu nome à classe, pois apresentam dois ou mais amino-açúcares ligados a um anel aminociclitol por pontes glicosídicas. O anel aminociclitol pode ser uma estreptidina, uma estreptamina ou uma deoxiestreptamina (DOS). Os aminoglicosídeos estão divididos em quatro subclasses estruturais dependendo do anel aminociclitol e da posição das pontes glicosídicas: (1) 2-DOS 4,6 dissustituídas (p.ex. amicacina, gentamicina, tobramicina, canamicina, sisomicina, arbecacina, plazomicina); (2) 2-DOS 4,5 dissustituídas (p.ex. neomicina B, paromomicina, ribostamicina); (3) DOS monossustituída (p.ex. apramicina); e (4) não DOS, que apresenta estreptidina como núcleo (p.ex. estreptomicina) e os que apresentam uma estreptamina como núcleo (p.ex. espectinomicina) (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016; JANA; DEB, 2006).

Após a descoberta da estreptomicina, novas opções foram sendo disponibilizadas, como a neomicina em 1949, a gentamicina em 1963, a

tobramicina em 1967 e a amicacina em 1976 (ZHANEL et al., 2012). Apresentam atividade em uma ampla variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas. No entanto, efeitos adversos como nefrotoxicidade e ototoxicidade e o surgimento de antimicrobianos com menos efeitos colaterais (p. ex. cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos e beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases) fizeram diminuir o seu uso ao final dos anos 80 (AVENT et al., 2011).

Nos últimos anos, o surgimento de bactérias gram-negativas multirresistentes fez ressurgir o uso clínico dos aminoglicosídeos (SERIO et al., 2018). Os problemas com a toxicidade foram minimizados com o uso de aminoglicosídeos em doses únicas diárias mais elevadas e intervalos maiores, mantendo ou até aumentando a sua eficácia (DRUSANO, 2007). A terapia otimizada e individualizada através da dosagem da concentração sanguínea em intervalos estabelecidos aumentou a segurança na administração (AVENT et al., 2011). Além disso, o efeito sinérgico da terapia combinada entre um aminoglicosídeo e um antimicrobiano com ação em parede celular, como os beta-lactâmicos, mostrou aumentar o espectro de ação dos aminoglicosídeos (KRAUSE et al., 2016).

#### 1.2.1.1 Mecanismo de ação

Os aminoglicosídeos são moléculas hidrofílicas e altamente polares; no entanto, sua entrada na célula através de porinas é prejudicada pelo tamanho aumentado. A absorção através do trato gastrointestinal é muito pequena e, por essa razão, são utilizados apenas de forma parenteral, tópica ou inalatória. Atuam em ribossomos inibindo a síntese proteica e, dentre todos os antimicrobianos que agem da mesma forma, são os únicos bactericidas (SERIO et al., 2018).

A difusão através da membrana externa de gram-negativos é a principal forma de entrada na célula e acontece em três estágios distintos. No primeiro estágio ou de ligação iônica, ocorre uma interação eletrostática entre a carga positiva dos aminoglicosídeos com a carga negativa das moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos, ocasionando o deslocamento de cátions divalentes e a ruptura das pontes de magnésio do LPS, com

consequente aumento da permeabilidade e acesso ao espaço periplasmático (BECKER; COOPER, 2013). A passagem pela membrana interna está relacionada com o transporte de elétrons, denominada fase I dependente de energia (EDP-I ou segundo estágio) e apenas uma pequena quantidade de aminoglicosídeos conseguem chegar ao citosol; pode ser bloqueada ou inibida por pH baixo, anaerobiose, cátions divalentes e hiperosmolaridade. Esse processo que utiliza a cadeia transportadora de elétrons dependente de oxigênio e nitrogênio está presente apenas em bactérias aeróbias, o que torna as bactérias anaeróbias obrigatórias intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos (ELJAALY et al., 2019). No citosol, os aminoglicosídeos ligam-se à subunidade 30S através de um outro processo denominado fase II dependente de energia (EDP-II ou terceiro estágio). Nesse momento, proteínas de membrana alteradas são formadas, causando danos à membrana interna e permitindo a entrada de uma maior quantidade do antimicrobiano para dentro da célula (MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999).

Análises do mecanismo de ação antibacteriano indicam que os aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina e espectinomicina, se ligam na hélice 44 através de pontes de hidrogênio ao sítio A da subunidade 30S do RNA ribossomal (rRNA) nas bactérias, resultando em uma mudança conformacional nos nucleotídeos A1492 e A1493, que são altamente conservados. Como consequência, o ribossomo permite a ligação de um anticódon (tRNA) não cognato ao códon (mRNA), prejudicando a fidelidade na tradução proteica. Podem também inibir tanto a translocação do complexo mRNA-tRNA durante o processo de alongamento como o início da transcrição (ARENZ; WILSON, 2016; VINAL; CONN, 2017; WILSON, 2014). Ao mesmo tempo, a ligação à hélice 69 na subunidade 50S também desempenha um papel no mecanismo de ação, inibindo a translocação e reciclagem do ribossomo, com subsequente morte celular (FOSSO; LI; GARNEAU-TSODIKOVA, 2014; LIN et al., 2018). A desestabilização da membrana interna devido à inserção de proteínas alteradas e a completa inibição da atividade ribossomal por excesso de aminoglicosídeos na célula parecem ser as principais razões para sua característica bactericida (BECKER; COOPER, 2013)

### 1.2.1.2 Mecanismos de resistência

A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos pode ser conferida por diferentes mecanismos como (1) produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs); (2) metilação do sítio alvo por 16S-rRNA metiltransferases (16S-RMTases); (3) mutações cromossomais na subunidade 30S do ribossomo; e (4) hiperexpressão de bombas de efluxo ou redução da permeabilidade da membrana (GALANI et al., 2019b).

As alterações que diminuem a entrada de aminoglicosídeos na célula bacteriana e resultam em resistência geralmente ocorrem em conjunto com outro mecanismo e podem elevar a CIM do antimicrobiano (ARMSTRONG; MILLER, 2010). A hiperexpressão de bombas de efluxo podem, por si só, aumentar em até quatro vezes a CIM dos aminoglicosídeos, porém, este mecanismo está mais associado com microrganismos não fermentadores de glicose como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (AGGEN et al., 2010).

#### 1.2.1.2.1 Produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

A produção de EMAs é o mecanismo de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos mais frequente e mais de 100 tipos de enzimas já foram reportadas (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). Essas enzimas são capazes de acetilar, adenilar ou fosforilar grupos amina ( $\text{NH}_3$ ) ou hidroxila (OH) da molécula de aminoglicosídeo, dividindo-as em aminoglicosídeo *N*-acetiltransferases (AACs), aminoglicosídeo *O*-nucleotidiltransferases (ANTs) ou também conhecidas como adeniltransferases (AADs) e aminoglicosídeo *O*-fosfotransferases (APHs). EMAs ainda são subdivididas de acordo com a posição no aminoglicosídeo que a enzima modifica, seguidas de um número romano que identifica o perfil de resistência e, em alguns casos, uma letra minúscula quando a mesma posição é modificada por múltiplas enzimas (KRAUSE et al., 2016; WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020). A presença de um cofator é necessária para a atividade dessas enzimas que, no caso das APHs e ANTs, é a adenosina trifosfato (ATP) e, para as AACs, o cofator é a acetil coenzima A (ROMANOWSKA; REUTER; TRYLSKA, 2013).

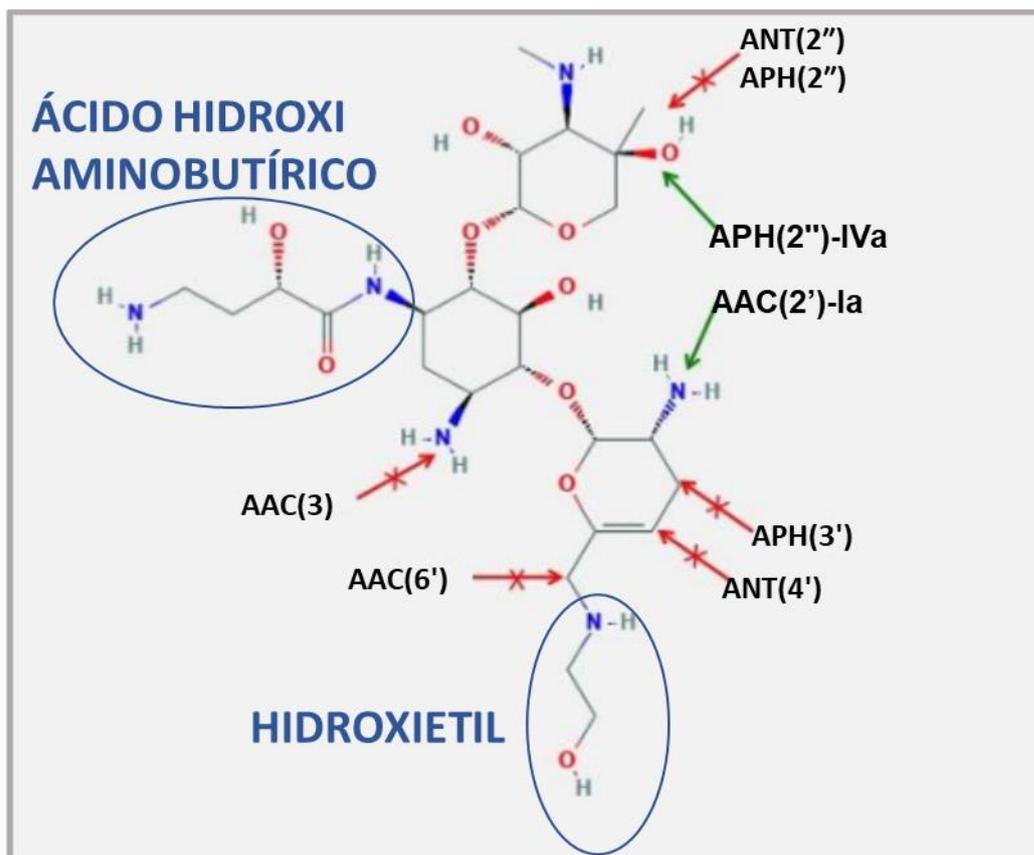
A concentração inibitória mínima dos aminoglicosídeos difere dependendo do tipo de EMA que está sendo produzida, como por exemplo AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(3)-IV e ANT(2'')-I, que conferem resistência à gentamicina e APH(3)-VI e AAC(6')-I, que resultam em resistência à amicacina. AAC(3)-II, AAC(6')-I e ANT(2'')-I são consideradas predominantes em *Enterobacterales* (ABDUL-MUTAKABBIR et al., 2019; ARMSTRONG; MILLER, 2010).

Duas espécies entre *Enterobacterales* possuem enzimas cromossômicas que conferem resistência aos aminoglicosídeos intrinsecamente. *Providencia stuartii* codifica AAC(2')-I e confere resistência à gentamicina e tobramicina. *Serratia marcescens* codifica AAC(6')-I e confere baixos níveis de resistência à tobramicina e amicacina (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

Entre as EPCs, mais de 90% produzem ao menos um tipo de EMA, o que explica a grande diversidade no perfil de sensibilidade dessas bactérias aos aminoglicosídeos (ALMAGHRABI et al., 2014). EMAs que conferem alto nível de resistência à amicacina são APH(3')-VI e ANT(4'); no entanto, são infrequentes. AAC(6')-Ib parece conferir resistência intermediária à amicacina (BREMNER et al., 2014). Em *Enterobacterales*, AAC(6')-Ib-cr pode estar presente tanto em plasmídeos como em cromossomos e pode induzir simultaneamente resistência a aminoglicosídeos e fluorquinolonas (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

Algumas modificações químicas foram realizadas na molécula de sisomicina para bloquear a ação das EMAs e, com isso, aumentar a atividade da plazomicina. Em ambas, sisomicina e plazomicina, a ausência do grupamento hidroxila (OH) nas posições C3 e C4 confere atividade contra APH(3') e ANT(4', 4''), EMAs que geram resistência à amicacina. A substituição na posição C1 por ácido hidroxí-aminobutírico (HABA), também encontrada na molécula de amicacina, acrescenta proteção contra AAC(3) e ANT(2''), enzimas que inibem gentamicina e tobramicina, e contra APH(2''), que confere resistência à gentamicina, tobramicina e amicacina. O substituinte hidroxietil na posição C6, exclusivo da plazomicina, bloqueia a ação de AAC(6'), presente em várias *Enterobacterales* e que inativa gentamicina, amicacina e tobramicina, sem reduzir a potência da droga (Figura 1.1) (CLARK; BURGESS, 2020).

Figura 1.1 - Estrutura química da plazomicina e locais de atuação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.



Fonte - Adaptado de BILINSKAYA; LINDER; KUTI, (2020).

Legenda - As circunferências em azul indicam os substituintes hidroxietil e ácido hidroxibutírico (este último também presente em amicacina) na molécula da plazomicina. As setas em vermelho indicam o local das modificações estruturais que permitem o bloqueio das EMAs. As setas em verde indicam o sítio de ligação das enzimas capazes de elevar a CIM da plazomicina.

Entre as EMAs, a única que apresenta atividade contra a plazomicina é AAC(2')-I, cromossômica em *Providencia stuartii*, e em espécies de *Mycobacterium* spp. e *Acinetobacter baumannii* (AÍNSA et al., 1997; COX et al., 2018; LIN et al., 2015). A enzima APH(2'')-IVa também apresenta atividade contra plazomicina porém, é encontrada somente em *Enterococcus* spp. onde o tratamento com esse antimicrobiano não é considerado uma opção (COX et al., 2018).

Em um estudo realizado com isolados de *K. pneumoniae*, a presença de AAC(6')-Ib em associação com outras EMAs resultou claramente em CIMs de

gentamicina, tobramicina e plazomicina significativamente maiores, bem como resistência à gentamicina. A adição de AAC(3)-IV na combinação de APH(3')-Ia e AAC(6')-Ib também resultou em CIMs elevadas de gentamicina, tobramicina e plazomicina. Esses achados sugerem que as modificações químicas presentes na molécula de plazomicina podem não conferir total proteção na coprodução de EMAs (ALMAGHRABI et al., 2014).

#### 1.2.1.2.2 Produção de 16S-rRNA metiltransferases

Embora a produção de EMAs seja o mecanismo de resistência mais frequente, a aquisição de 16S-RMTases é considerado o mais importante clinicamente, pois confere altos níveis de resistência a todos os aminoglicosídeos utilizados na terapêutica de infecções, exceto estreptomicina. A metilação pós transcrição do sítio A de 16S-rRNA ocorre pela adição de um grupo metila (CH<sub>3</sub>) na posição N-7 do nucleotídeo G1405, conferindo resistência aos aminoglicosídeos DOS 4,6 dissustituídos (p.ex. gentamicina, amicacina, tobramicina e plazomicina) ou na posição N-1 do nucleotídeo A1408, cuja metilação inativa todas as subclasses de aminoglicosídeos. Utilizam S-adenosil-metionina (SAM) como cofator e produzem S-adenosil-monocisteína (SAH) como produto da reação (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016; WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020).

Os primeiros relatos de metiltransferases em isolados clínicos são mais recentes do que EMAs e foram descritos em 2003. Um dos trabalhos detectou RmtA no Japão em um clone hospitalar de *P. aeruginosa* que circulava em 1997 e outro encontrou uma ArmA na França em *K. pneumoniae* isolada em 2000 (GALIMAND; COURVALIN; LAMBERT, 2003; YOKOYAMA et al., 2003). No entanto, Golebiewski et al (2007) publicaram um trabalho de sequenciamento do plasmídeo pCTX-M3 de *Citrobacter freundii* que circulava na Polônia em 1996 e encontraram o gene *armA* juntamente com *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (GOŁEBIEWSKI et al., 2007). Atualmente, RmtA encontra-se restrita quase que exclusivamente no leste asiático, Japão e Coreia do Sul (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020).

Desde então, dez genes são conhecidos por produzirem metiltransferases, e são subdivididos entre os que metilam G1405, sendo eles

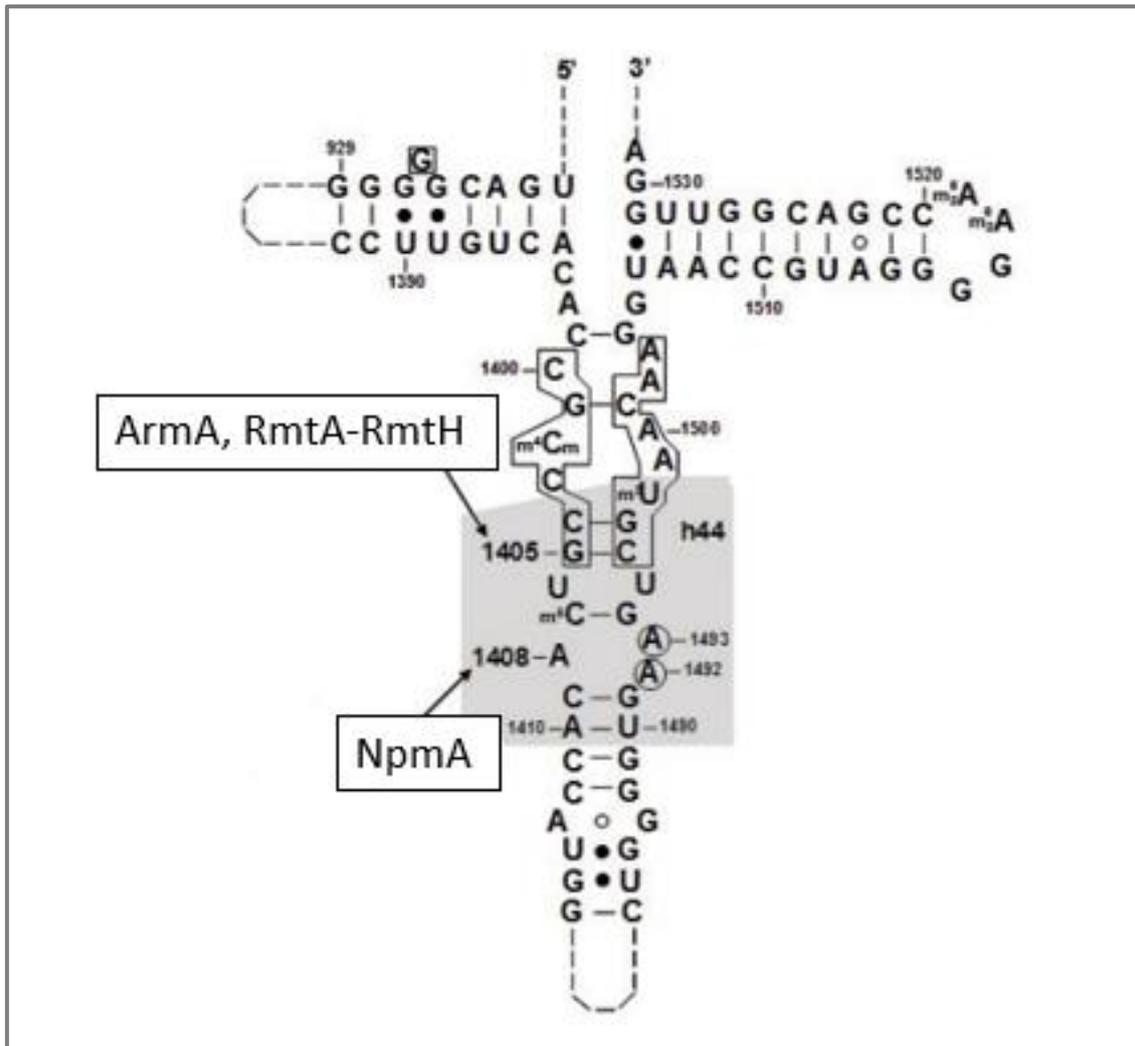
*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* e *rmtH*, e *npmA*, o único subtipo que metila A1408 (Figura 1.2). São similares às 16S-RMTases produzidas intrinsecamente por *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp., bactérias que precisavam proteger seus ribossomos da ação dos aminoglicosídeos por elas produzidos (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). No entanto, a origem de 16S-RMTases a partir de bactérias produtoras de aminoglicosídeos é improvável devido à presença muito inferior de nucleotídeos GC nas espécies patogênicas do que nas espécies intrinsecamente produtoras de metiltransferases (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020).

Um recente estudo realizado através de sequenciamento de genoma completo de amostras hospitalares de *Clostridioides difficile* encontrou o gene *npmA* em alguns isolados e sugere que esta associação possa ser um reservatório de resistência aos aminoglicosídeos (MARSH et al., 2019). O caráter plasmidial das metiltransferases proporcionou sua disseminação, principalmente entre microrganismos gram-negativos (COSTELLO et al., 2019).

Em geral, 16S-RMTases são encontradas em bactérias produtoras de carbapenemases ou ESBL (BUENO et al., 2013; LEE et al., 2014; SHEN et al., 2019; TADA et al., 2017). Na América do Sul, a primeira metiltransferase (RmtD) foi descrita em um isolado brasileiro de *P. aeruginosa* produtor de metalo-beta-lactamase SPM-1 isolado em 2005 de um paciente hospitalizado (DOI; ARAKAWA, 2007). Três variantes de RmtD já foram descritas, RmtD1 e RmtD2 em *Enterobacteriales* e *P. aeruginosa*, principalmente em países da América do Sul como Argentina, Chile e Brasil (BALLABEN et al., 2018; FRITSCHKE et al., 2008; TIJET et al., 2011) e RmtD3 em *P. aeruginosa* no sudeste asiático e na Polônia (TADA et al., 2017; URBANOWICZ et al., 2019)

Outra metiltransferase praticamente restrita à América do Sul é RmtG. O primeiro relato aconteceu em amostras de *K. pneumoniae* isoladas entre os anos de 2010 e 2011 no Brasil e coprodutoras de KPC e CTX-M (BUENO et al., 2013). Posteriormente, foi descrita no Chile, Peru, Colômbia e Estados Unidos (HU et al., 2014; LEE et al., 2014). Em 2018, RmtG foi descrita na Suíça em *K. pneumoniae* coprodutora de KPC isolada de um paciente brasileiro hospitalizado no país (MANCINI et al., 2018a).

Figura 1.1 - Locais alvo de metilação no sítio A de 16S-rRNA pelas metiltransferases.



Fonte - Adaptado de MORIĆ et al., (2010).

Legenda - Local alvo G1405 para ArmA e RmtA-RmtH e A1408 para NpmA estão indicados pelas setas. A base da hélice 44 está sombreada. Os nucleotídeos do sítio A (A1492 e A1493) importantes para a interação códon-anticódon são mostrados em círculos. Os nucleotídeos do sítio P, responsáveis pela ligação do tRNA, estão enquadrados por linha preta contínua.

RmtB e RmtC foram identificadas pela primeira vez no Japão nos anos 2000 em *Serratia marcescens* e *Proteus mirabilis*, respectivamente (DOI et al., 2004; WACHINO et al., 2006). Em RmtB, são relatados quatro genes codificadores de variantes, *rmtB-1* (NG\_048058.1), *rmtB-2* (NG\_048059.1), *rmtB-3* (NG\_051535.1) e *rmtB-4* (NG\_051536.1), todos já encontrados em amostras de *Enterobacterales* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=rmtb>, acesso eletrônico em 31/05/2022). Atualmente, RmtB, RmtC e ArmA são

consideradas as principais metiltransferases pela prevalência e por sua ampla distribuição geográfica (COSTELLO et al., 2019; WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020).

RmtF possui duas variantes (RmtF-1 e RmtF-2), é a mais prevalente depois de RmtB, RmtC e ArmA e geralmente está associada com a produção de NDM (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020). O primeiro caso descrito foi em *K. pneumoniae* isolada de um paciente hospitalizado na Ilha La Réunion em 2011 (GALIMAND; COURVALIN; LAMBERT, 2012) e atualmente encontra-se distribuída em todos os continentes, com exceção da América do Sul (LEE et al., 2014; MANCINI et al., 2018b; RUBIN et al., 2014; SHI et al., 2020; SIDJABAT et al., 2015; TAYLOR et al., 2018; WANGKHEIMAYUM et al., 2020).

RmtE foi identificada em 2010 nos Estados Unidos em um estudo realizado com amostras comensais de *E. coli* bovina (DAVIS et al., 2010). Desde então, há poucos relatos na literatura das duas variantes descritas (RmtE-1 e RmtE-2) (LEE et al., 2014; XIA et al., 2016; ZHAO et al., 2017). RmtH aparece descrita pela primeira vez em 2013 isolada de *K. pneumoniae* em ferida de um paciente iraquiano e, posteriormente, em *K. pneumoniae* isolada de hemocultura de paciente recém-nascido no Líbano (BEYROUTHY et al., 2017; O'HARA et al., 2013).

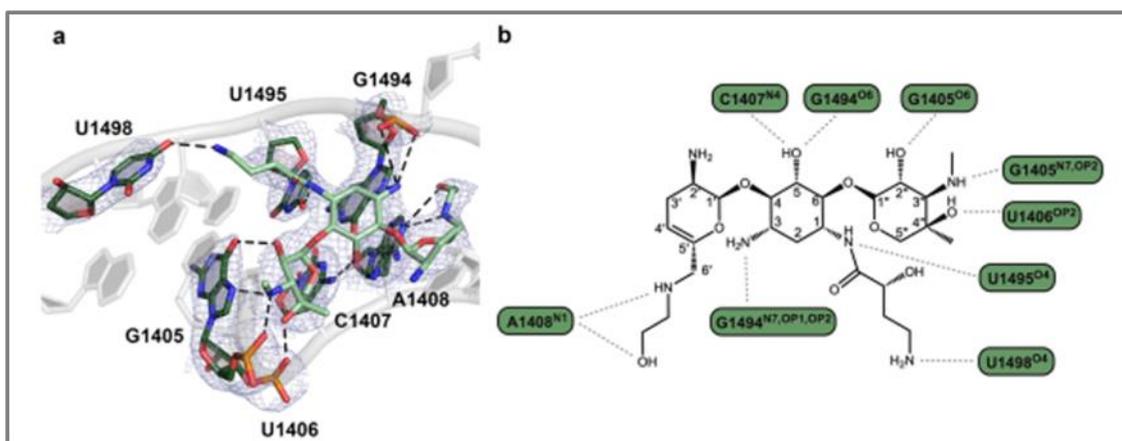
NpmA é a única entre as metiltransferases capaz de atuar na posição N-1 do nucleotídeo A1408 e conferir panresistência aos aminoglicosídeos. O primeiro relato em amostra clínica dessa enzima foi em um isolado de *E. coli* em 2007 no Japão, em um trabalho que utilizou a resistência à apramicina como marcador para sua detecção (WACHINO et al., 2007). Desde então, raros trabalhos têm encontrado NpmA em isolados clínicos (YEGANEH SEFIDAN; MOHAMMADZADEH-ASL; GHOTASLOU, 2019; ZHAO et al., 2017). Essa baixa disseminação de um gene de resistência aos aminoglicosídeos de amplo espectro parece ser explicada pela presença de sequências de inserção no gene *npmA* e fácil ruptura dos plasmídeos carreadores. Parece provável que a presença do gene *npmA* seja desfavorável para o crescimento e sobrevivência de bactérias patogênicas (ISHIZAKI et al., 2018).

No Brasil, há relatos em isolados clínicos de RmtB-1, RmtD-1, RmtD-2, RmtG e ArmA em *Enterobacterales* (BUENO et al., 2016; CASSU-CORSI et al., 2018; FRITSCHÉ et al., 2008; PASSARELLI-ARAUJO et al., 2019; QUILES et

al., 2015) e de RmtC em *K. pneumoniae* em amostra ambiental no Rio de Janeiro (CAMPANA et al., 2017). No entanto, estudos mostrando a prevalência das metiltransferases ainda são escassos em nosso país.

Ao contrário das EMAs, que praticamente não possuem ação sobre a molécula de plazomicina, a presença de 16S-RMTases é capaz de inativar todos os aminoglicosídeos, incluindo a plazomicina (SARAVOLATZ; STEIN, 2020). A figura 1.3 representa a interação entre a molécula de plazomicina e o sítio A de 16S-rRNA em bactérias gram-negativas.

Figura 1.3 - Interação entre a molécula de plazomicina e os nucleotídeos do sítio A de 16S-rRNA das bactérias gram-negativas.



Fonte: Adaptado de GOLKAR et al., (2021).

Legenda: (a) Cristalografia indicando a interação entre as bases ribossômicas do sítio A (representadas por bastões verde escuro) e a molécula de plazomicina (representada por bastões verde claro). As pontes de hidrogênio estão representadas como linhas tracejadas pretas. (b) Representação bidimensional das pontes de hidrogênio entre a plazomicina e o sítio A ribossômico.

Uma característica importante e que auxilia na diferenciação entre EMAs e 16S-RMTases é o perfil de resistência por elas produzidos. EMAs possuem afinidades diferentes pelos aminoglicosídeos e, dependendo da classe ou das associações entre elas na mesma bactéria, podem inativar um, dois ou todos os aminoglicosídeos de uso clínico. No entanto, a CIM desses antimicrobianos geralmente não é muito elevada. Já a expressão de genes que conferem a produção de 16S-RMTases eleva as CIMs de todos os aminoglicosídeos a concentrações superiores a 256 mg/L. A única exceção ao grupo é a

metiltransferase NpmA, onde o fenótipo de resistência à gentamicina e amicacina é similar ao produzido por EMAs (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020).

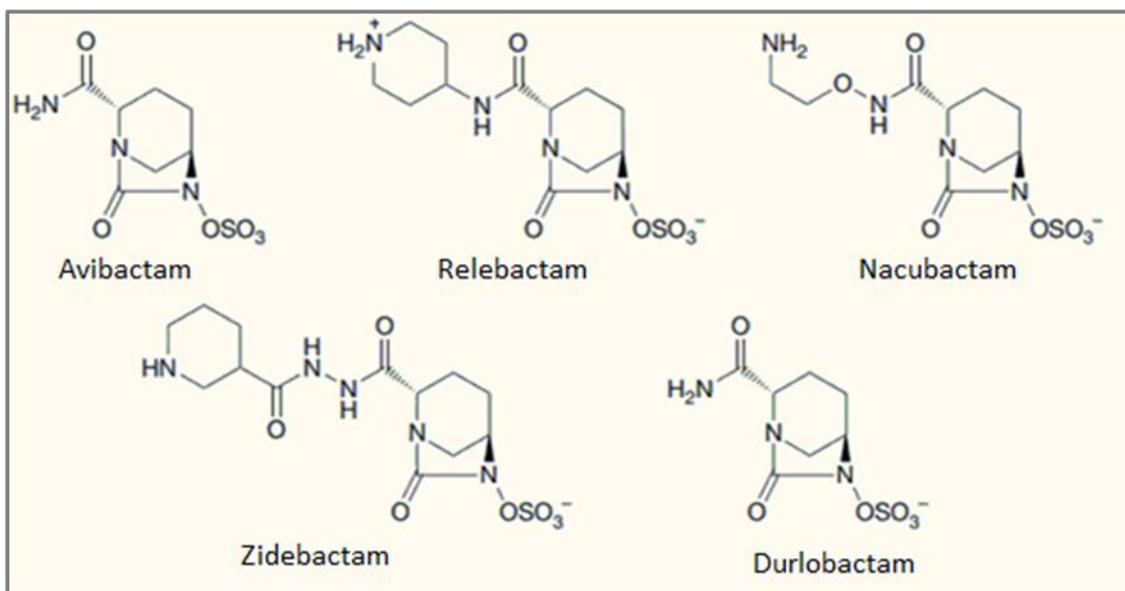
Em 2018, o FDA aprovou o uso da plazomicina para o tratamento de infecções do trato urinário complicadas (ITUc), incluindo pielonefrite aguda, em pacientes onde as alternativas para o tratamento são limitadas ou ausentes. Estudos em pacientes com infecções da corrente sanguínea não apresentaram evidências de segurança e efetividade suficientes para aprovar seu uso nessas situações (THEURETZBACHER; PAUL, 2018; ZEMDRI, 2018).

### 1.2.2 Ceftazidima-avibactam

O primeiro membro dos inibidores sintéticos de beta-lactamases não beta-lactâmicos desenvolvido para uso clínico em meados dos anos 90 foi o avibactam (anteriormente AVE1330A e NXL104) e pertence ao grupo dos diazabicyclooctanos (DBOs) (COLEMAN, 2011). Posteriormente, outros representantes como relebactam, nacubactam, zidebactam e durlobactam foram incluídos no grupo e suas estruturas químicas estão representadas na Figura 1.4 (DINGLE; PITOUT, 2022; EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2020).

Ceftazidima-avibactam (CAZ/AVI) representa a primeira associação entre um beta-lactâmico e um inibidor de beta-lactamase DBO. Inibe de forma eficiente a maioria das beta-lactamases de classe A, incluindo as carbapenemases do tipo KPC e BKC-1, as enzimas de classe C codificadas por cromossomo e plasmídeo e algumas beta-lactamases de classe D, incluindo OXA-10 e OXA-48 (KARAIKOS et al., 2019a; KRISHNAN et al., 2015; MARTINS et al., 2022). Não apresenta atividade contra *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *S. aureus* (MSSA e MRSA), *Enterococcus spp.* e anaeróbios (DOI, 2019).

Figura 1.4 - Estrutura química dos inibidores de beta-lactamases do grupo diazabicyclooctanos.

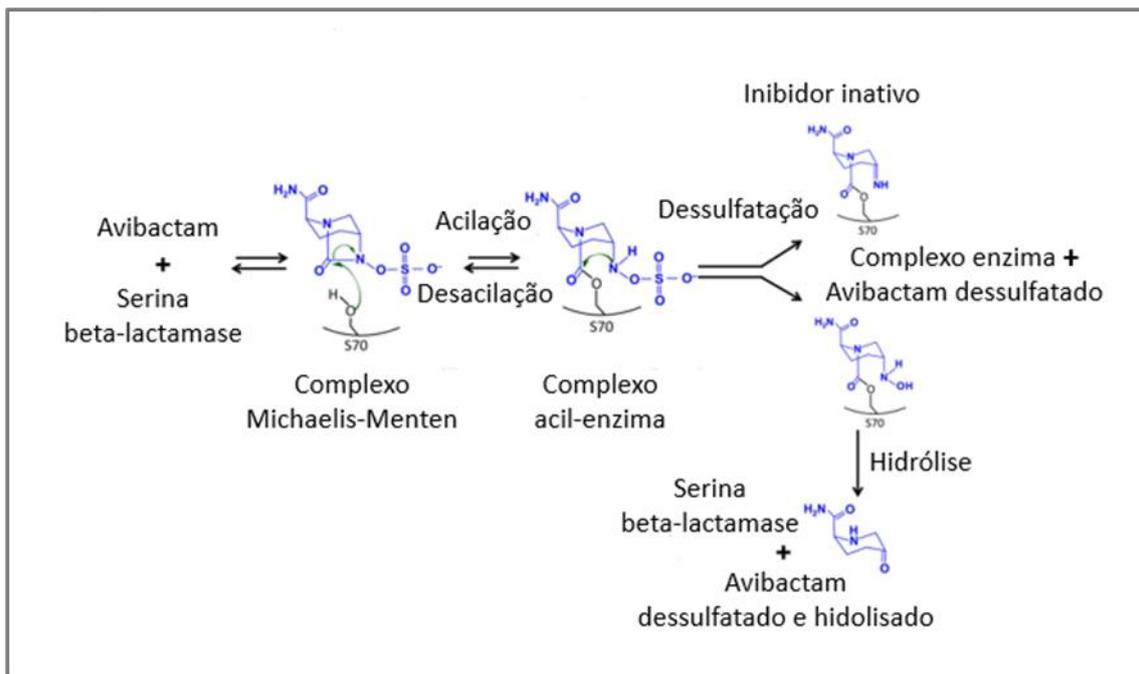


Fonte - Adaptado de Bush e Bradford (2019).

### 1.2.2.1 Mecanismo de ação

Avibactam possui um mecanismo de ação diferente dos inibidores beta-lactâmicos (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (ZASOWSKI; RYBAK; RYBAK, 2015). O núcleo DBO do avibactam forma uma ligação covalente com a hidroxila na serina (Ser70) do sítio ativo da beta-lactamase e, diferentemente dos inibidores beta-lactâmicos, forma uma ligação carbamato ao fazer a transição para acil-enzima após a abertura do anel DBO (KARAIKOS et al., 2019b; KRISHNAN et al., 2015; NOVAL et al., 2020). A quebra desse complexo pode acontecer por desacilação para resultar na regeneração do avibactam intacto capaz de religação e novamente na enzima ativa ou por dessulfatação lenta, resultando no complexo enzima + avibactam dessulfatado. Esse complexo ainda pode sofrer hidrólise e resultar no avibactam dessulfatado e hidrolisado, o que impede sua reutilização, e na enzima ativa (Figura 1.5). A desacilação é observada em beta-lactamases de classes C e A (exceto KPC); também ocorre nas enzimas da classe D, mas a uma taxa muito menor. Nas enzimas do tipo KPC, a dessulfatação ocorre principalmente (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2020).

Figura 1.5 – Mecanismos de inibição de serino-beta-lactamases pelo avibactam.



Fonte - Adaptado de EGOROV (2020).

Legenda - A molécula química na cor azul representa o avibactam.

Avibactam é capaz de se ligar covalentemente não apenas à beta-lactamase, mas também a algumas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) bacterianas como PBP2 de *E. coli* e *H. influenzae*, PBPs 2 e 3 de *P. aeruginosa* e *S. aureus* e a PBP3 de *S. pneumoniae* (TUON; ROCHA; FORMIGONI, 2017). No entanto, possui baixa atividade antibacteriana devido à fraca inibição das PBPs (ASLI et al., 2016). Em *P. aeruginosa*, a sensibilidade é influenciada pela coexistência de vários mecanismos de resistência que interferem na expressão de porinas, bombas de efluxo ou de enzimas beta-lactamases (WANG et al., 2020a).

Avibactam necessita de um número bem menor de moléculas para inibir cada molécula de beta-lactamase (1 a 5 moléculas de avibactam por beta-lactamase, em comparação com os inibidores beta-lactâmicos que requerem dezenas até centenas de moléculas) (WANG et al., 2016). Além disso, possui meia-vida longa, tamanho e peso molecular pequenos, polaridade, interação com aminoácidos importantes próximos aos sítios catalíticos ativos das beta-

lactamases e baixo potencial para indução de resistência (GIURAZZA et al., 2021).

### 1.2.2.2 Mecanismos de resistência

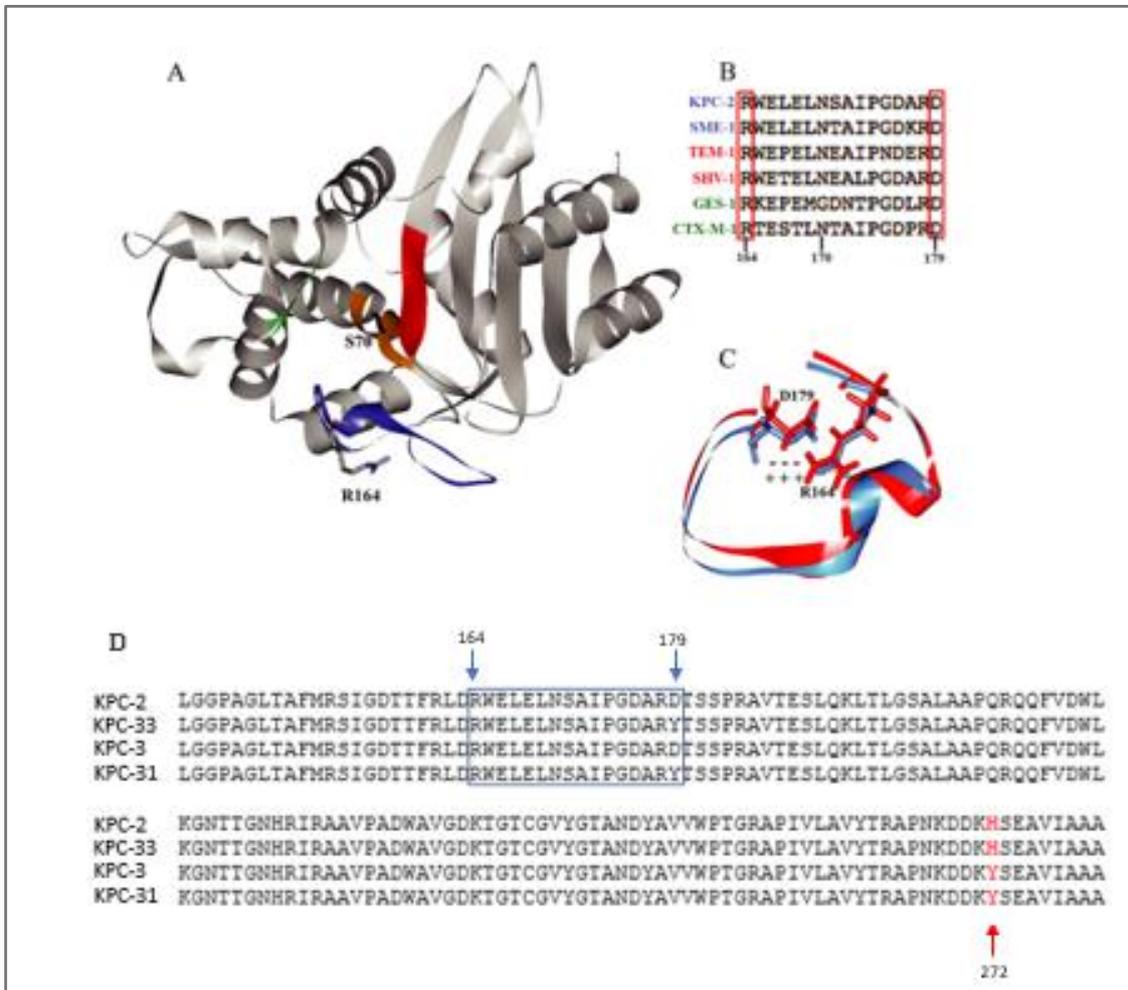
O mecanismo mais comum de resistência adquirida ao CAZ/AVI é a produção de carbapenemases da classe B (p. ex. NDM, IMP, VIM) ou de enzimas da classe D (oxacilinasas não OXA-10 e OXA-48). Mutações em enzimas da classe A podem surgir em aproximadamente 10% dos isolados e representam o principal mecanismo de resistência detectado após o tratamento com o antimicrobiano (DOI, 2019). O ácido aspártico presente na posição 179 da alça  $\Omega$  das beta-lactamases forma uma ponte salina com a asparagina na posição 164, que a estabiliza (Figura 1.6-A, B e C). A substituição desses aminoácidos resulta em uma flexibilidade da alça, aumentando a afinidade do sítio ativo das beta-lactamases (Ser70) pela ceftazidima e impedindo a ligação do avibactam (MOREIRA; CAIERÃO, 2021).

Diferentes substituições na alça  $\Omega$  da enzima KPC já foram identificadas. A principal é a troca de um ácido aspártico por tirosina na posição 179 (D179Y) em KPC-2 (variante KPC-33) e KPC-3 (variante KPC-31), representadas na Figura 1.6-D (MENDES et al., 2022; MOREIRA; CAIERÃO, 2021). Esse mecanismo resulta em isolados com alto nível de resistência ao CAZ/AVI e, interessantemente, com diminuição na CIM dos carbapenêmicos, podendo chegar até a restabelecer sua sensibilidade (GIDDINS et al., 2018). Em *K. pneumoniae*, PBP3 é o principal alvo de ceftazidima, cefepima e aztreonam, enquanto PBP2 é o principal alvo dos carbapenêmicos. O bloqueio completo de ambas as PBPs, obtido com a associação de CAZ/AVI com um carbapenêmico, pode ter um efeito sinérgico (SUTARIA et al., 2018).

A pressão seletiva causada pelo tratamento com CAZ/AVI resultou em uma população heterogênea de isolados selvagens e mutantes em um estudo realizado por Castanheira et al. (2018) e sugere um desafio significativo para o manejo de isolados produtores de KPC que desenvolvem resistência ao CAZ/AVI durante a terapia (CASTANHEIRA et al., 2018b). Portanto, a sensibilidade aos carbapenêmicos em cepas resistentes ao CAZ/AVI tornaria a combinação de CAZ/AVI e carbapenêmicos uma opção terapêutica

interessante. Em outro estudo, a associação de CAZ/AVI com um carbapenêmico pareceu impedir a seleção de cepas mutantes *in vitro* (COMPAIN; ARTHUR, 2017).

Figura 1.6 – Representação conformacional esquemática da alça  $\Omega$  e da sequência de aminoácidos em variantes de serino-beta-lactamases.



Fonte - Adaptado de LEVITT et al., (2012).

Legenda - (A) Estrutura da KPC-2, evidenciando o sítio catalítico da enzima (Ser70) e a Arg-164 (R164) na alça  $\Omega$  (em azul). (B) Alinhamento da sequência das alças  $\Omega$  de KPC-2 com outras carbapenemases de classe A (azul), penicilinasas (vermelho) e cefalosporinasas (verde). Observa-se a estrita conservação de Arg-164 e Asp-179. (C) Sobreposição da alça  $\Omega$  de TEM-1 (vermelho) e KPC-2 (azul), mostrando a ponte salina entre Arg-164 e Asp-179. (D) Sequência de aminoácidos da alça  $\Omega$  (representada pela caixa azul) das enzimas KPC-2, KPC-33, KPC-3 e KPC-31. A seta e os aminoácidos destacados em vermelho indicam a posição da mutação que difere KPC-2 e KPC33 de KPC-3 e KPC-31.

Cepas resistentes ao CAZ/AVI com mutações fora da alça  $\Omega$ , como é o caso da KPC-4, KPC-8 e KPC-23, e mutações em CTX-M-14, CTX-M-15 e SHV também já foram descritas (HAIDAR et al., 2017; MUELLER et al., 2019b; WANG et al., 2020b). A seleção de cepas mutantes é provavelmente a consequência da dosagem insuficiente de antimicrobiano na presença de uma alta carga bacteriana (MATESANZ; MENSA, 2021).

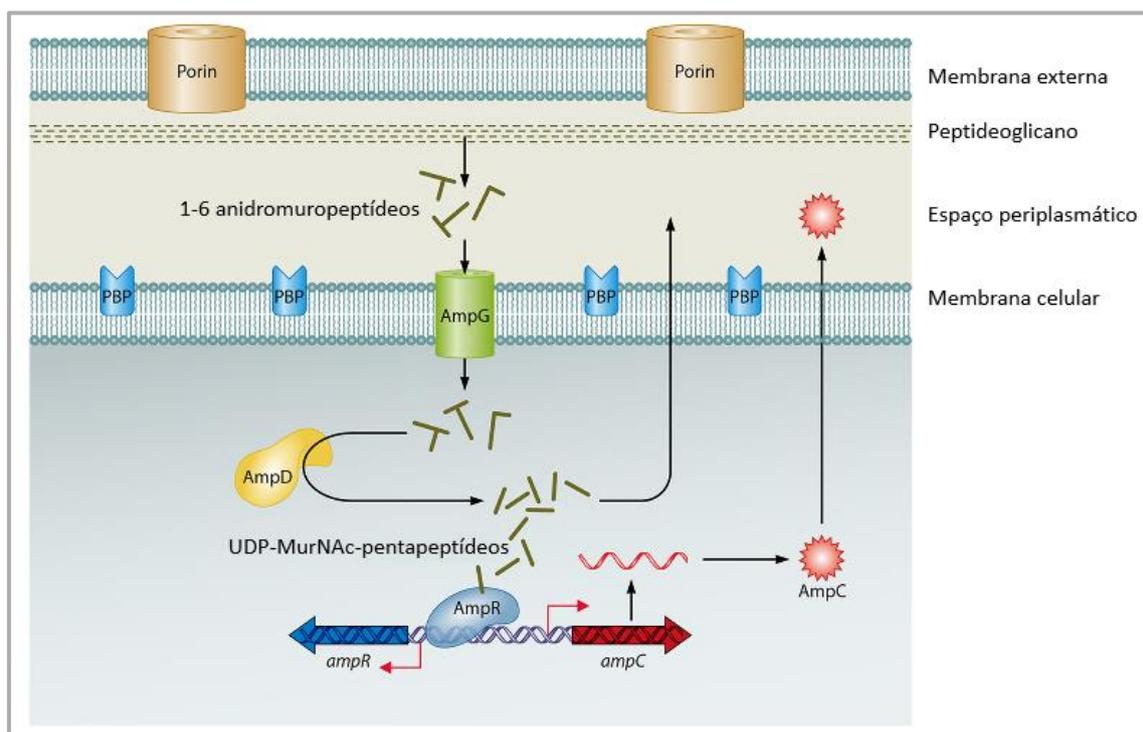
A resistência ao CAZ/AVI também já foi descrita em isolados *bla*<sub>KPC</sub> selvagens. A superexpressão do gene *bla*<sub>KPC</sub> resultou em um número aumentado da enzima e demonstrou correlação com a resistência de baixo nível (CUI et al., 2020). Tal fato pode ser explicado por mutações na região promotora do gene ou por aumento no número de cópias de plasmídeos portadores de *bla*<sub>KPC</sub> e/ou regiões duplicadas do gene no mesmo plasmídeo, onde a quantidade de avibactam administrada torna-se insuficiente (CUI et al., 2020). Nesses casos, o aumento na concentração de avibactam na formulação clínica pode contornar a resistência de baixo nível ao CAZ/AVI (ZHANG et al., 2019).

Hiperexpressão ou mutações no gene *ampC* estão envolvidas na resistência ao CAZ/AVI em *Enterobacterales* (LIVERMORE et al., 2018; XU et al., 2021). Para a hiperexpressão, já foram identificadas mutações nas enzimas reguladoras do gene *ampC*, como AmpR (regulador), AmpG (permease), e AmpD (amidase) (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). O mecanismo de regulação da expressão de *ampC* está representado na Figura 1.7. Os produtos (1,6-anidromuropeptídeos) gerados pela degradação do peptidoglicano no espaço periplasmático são internalizados através da permease AmpG. O gene *ampD* codifica uma amidase citoplasmática que hidrolisa os 1,6-anidromuropeptídeos para produzir os pentapeptídeos UDP-MurNac, que serão exportados para o periplasma e incorporados ao peptidoglicano, para completar o processo de reciclagem da parede celular. Uma pequena quantidade de pentapeptídeos UDP-MurNac interagem com a proteína reguladora AmpR, que funciona como um regulador negativo da expressão de *ampC*, e promove a expressão do gene *ampC* em pequena quantidade (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Mutações no gene *ampD* são a causa mais comum de hiperprodução constitutiva de *ampC* em isolados clínicos, devido ao acúmulo de 1,6-

anidromuropeptídeos no citoplasma que interagem em grande quantidade com *ampR* e hiperexpressam *ampC* (HEMARAJATA et al., 2018). Várias espécies bacterianas, incluindo *E. coli* e *Shigella* spp., possuem o gene *ampC* cromossômico, mas não possuem o seu repressor *ampR*, tornando o gene não induzível. Nesses casos, a beta-lactamase AmpC é geralmente produzida em níveis baixos e raramente contribui para a resistência aos beta-lactâmicos (BUSH; BRADFORD, 2020).

Figura 1.7 – Mecanismo de regulação da expressão do gene *ampC* em bactérias gram-negativas.



Fonte – Adaptado de LISTER; WOLTER; HANSON, (2009).

Legenda - Durante a reciclagem da parede celular, os 1,6-anidromuropeptídeos são removidos da parede celular e transportados para o citoplasma através da permease AmpG. Os 1,6-anidromuropeptídeos são clivados por AmpD para gerar tripeptídeos livres, que são posteriormente convertidos em pentapeptídeos UDP-MurNAc. UDP-MurNAc-pentapeptídeo interage com AmpR ligado à região intergênica *ampR-ampC*, criando uma conformação que reprime a transcrição de *ampC*. Baixos níveis basais de AmpC são produzidos, e a enzima está localizada no espaço periplasmático.

Avibactam pode ser afetado por mudanças na expressão de porinas e por mecanismos de efluxo devido à sua estrutura (peso molecular,

hidrofilicidade e cargas), aumentando a CIM de CAZ/AVI (CAVALLINI et al., 2021; WANG et al., 2020b). No entanto, esses mecanismos não parecem efetivos sozinhos (CASTANHEIRA et al., 2018b). Em 2015, foi descrito o primeiro isolado resistente ao CAZ/AVI em *K. pneumoniae* *bla*<sub>KPC-3</sub> sem mutações porém com perda da porina OmpK35, em um paciente sem tratamento prévio com CAZ/AVI (HUMPHRIES et al., 2015). Um estudo realizado com uma amostra selvagem de *K. pneumoniae* ST258 produtor de KPC-3 demonstrou que, além de mutação adicional na porina OmpK36, um aumento no número de cópias de *bla*<sub>KPC-3</sub> resultou em resistência ao CAZ/AVI (NELSON et al., 2017).

Outro mecanismo descrito que eleva a CIM de CAZ/AVI é a alteração em PBPs, sítios de ligação da droga, que podem ser ocasionadas por mutações ou aquisição de genes alterados. A inserção dos aminoácidos treonina-isoleucina-prolina-tirosina em PBP3 elevou a CIM do CAZ/AVI em *E. coli* de  $\leq 1$  para 2–8 mg/L, alterações que não elevaram a CIM para valores de resistência (WANG et al., 2020a).

Ceftazidima-avibactam foi aprovada pelo FDA em 2015 para o tratamento de infecções complicadas do trato urinário e intra-abdominais e pneumonias hospitalares (incluindo pneumonias associadas à ventilação mecânica), pela *European Medicines Agency* (EMA) na Europa em 2016 para infecções causadas por organismos gram-negativos aeróbicos com opções de tratamento limitadas e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil em 2018, para infecções complicadas do trato urinário e intra-abdominais e pneumonias hospitalares (incluindo pneumonias associadas à ventilação mecânica) (BASSETTI et al., 2022; MOREIRA; CAIERÃO, 2021).

### 1.2.3 Imipenem-relebactam

Relebactam (anteriormente MK - 7655) é mais um novo inibidor de beta-lactamase do grupo DBO que, em combinação com imipenem-cilastatina, possui a finalidade de restaurar a atividade do imipenem. Embora relebactam não possua atividade antibacteriana intrínseca, pode proteger o imipenem da degradação por beta-lactamases da Ambler classe A de Ambler (por exemplo, KPC) e classe C (por exemplo, AmpC) (HEO, 2021). Possui ação em *P.*

*aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos quando o mecanismo é impermeabilidade da membrana combinado com hiperexpressão de *ampC* (KULENGOWSKI; BURGESS, 2019; YAHAV et al., 2021). Além disso, imipenem é um pobre substrato para bombas de efluxo comuns em *P. aeruginosa*, o que o torna uma importante opção terapêutica para esses isolados (TAMMA; HSU, 2019).

#### 1.2.3.1 Mecanismo de ação

Imipenem, como outros beta-lactâmicos, liga-se competitivamente em PBPs, formando um complexo covalente acil-enzima. Diferentes beta-lactâmicos têm afinidades variadas pelas PBPs. Entre as bactérias gram-negativas mais relevantes clinicamente, como *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*, imipenem geralmente apresenta maior afinidade para PBP 2, seguido por 1a, 1b e 3 (SMITH; RYBAK; CLAEYS, 2020).

Relebactam contém o mesmo núcleo DBO bicíclico que avibactam, porém, apresenta um anel piperidina adicional no carbono 2 de sua cadeia lateral que fornece uma carga positiva à molécula em pH fisiológico, prevenindo a extrusão de relebactam (BLIZZARD et al., 2014; VÁZQUEZ-UCHA et al., 2020). Assim como avibactam, liga-se covalentemente ao sítio ativo de serino-beta-lactamases. Após a acilação entre a carbonila de relebactam e a serina do sítio ativo da beta-lactamase, o complexo acil-enzima é estabilizado pela formação de ligações de hidrogênio com resíduos do sítio catalítico conservados. Uma reação de desacilação é capaz de regenerar tanto o relebactam ativo quanto a beta-lactamase. Ao contrário do avibactam, relebactam pode sofrer dessulfatação, porém de maneira muito mais lenta e limitada (SMITH; RYBAK; CLAEYS, 2020). Embora a dessulfatação de relebactam seja visivelmente mais lenta, limitando a relevância clínica imediata deste mecanismo, variantes de KPC capazes de suportar uma dessulfatação mais rápida podem surgir com o uso de DBO (TOOKE et al., 2019).

#### 1.2.3.2 Mecanismos de resistência

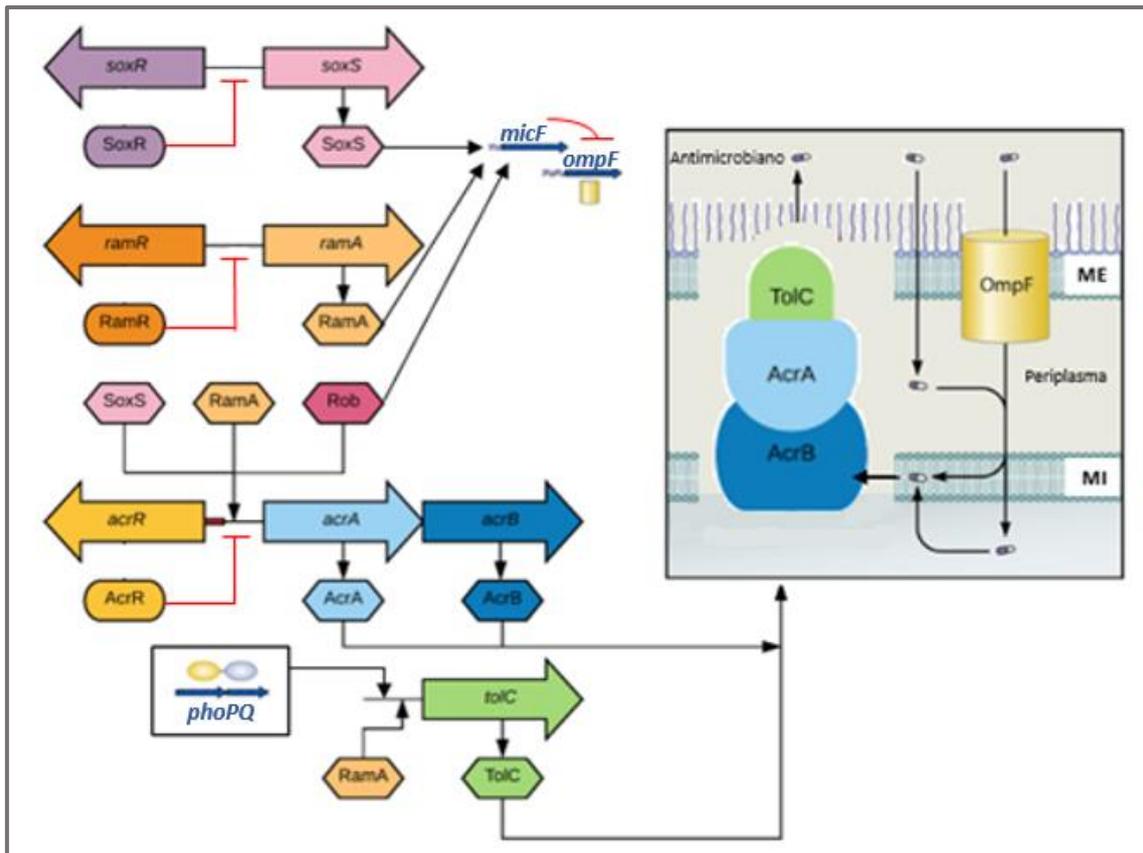
Da mesma forma que CAZ/AVI, não possui atividade contra isolados produtores de MBL, *A. baumannii* e *S. maltophilia* (DOI, 2019). Isolados produtores de carbapenemases do tipo OXA-48 são resistentes ao IMI/REL, resultando em um espectro de inibição mais restrito do que CAZ/AVI (VÁZQUEZ-UCHA et al., 2020).

A compreensão sobre os eventos genéticos que levam à aquisição de resistência ao IMI/REL ainda é muito limitada (VÁZQUEZ-UCHA et al., 2020). A diminuição da permeabilidade da membrana por alterações em porinas e a hiperexpressão de bombas de efluxo como AcrAB-TolC e MexAB-OprM são considerados os principais mecanismos de resistência (MASHALY; MASHALY, 2021a; PAPP-WALLACE et al., 2020). A regulação da expressão de bombas de efluxo e porinas envolve uma cascata de vias complexas de reguladores como SoxR, RamR, AcrR, MicF, além de sistemas de dois componentes como PhoPQ, entre outros (Figura 1.8) (GRIMSEY et al., 2020; LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015). Alterações mutacionais desses reguladores podem levar a níveis alterados na expressão de AcrAB-TolC e OmpF.

RamA é um regulador transcricional global que altera significativamente as propriedades de superfície microbiana, incluindo a biossíntese de lipídeo A, facilitando a evasão do microrganismo da resposta imune inata do hospedeiro. Mutações ou deleções no repressor RamR e na região autorreguladora proximal a *ramA*, levam à superexpressão de RamA e resultam em um nível mais alto de expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC e de *micF*, que consequentemente diminuem os níveis de OmpF (DE MAJUMDAR et al., 2015). Essas alterações em RamR podem desempenhar um papel fundamental na predisposição para o surgimento de um fenótipo multirresistente (MOLITOR et al., 2018).

Isolados de *K. pneumoniae* produtores de *bla*<sub>KPC</sub> com mutações em porinas OmpK35 e OmpK36 apresentaram valores de CIM para IMI/REL mais elevados, embora ainda considerados sensíveis quando os critérios interpretativos do CLSI para imipenem foram utilizados (CANVER et al., 2019). Altos níveis de expressão de *bla*<sub>KPC</sub> associados com alterações em porinas também podem conferir resistência ao IMI/REL (BALABANIAN et al., 2018).

Figura 1.8 - Regulação da expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC e da porina OmpF em *E. coli*.



Fonte - Adaptado de LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, (2015) e GRIMSEY et al., (2020).

Legenda - A transcrição dos genes *acrAB-tolC* não acontece de forma agrupada geneticamente, mas é frequentemente regulada por genes comuns em vários níveis. O repressor local AcrR reprime a expressão de *acrAB* diretamente. O transcrito *micF* inibe a tradução do mRNA da porina OmpF. O sistema regulador de dois componentes PhoPQ pode aumentar a expressão de *acrAB-tolC*. As linhas vermelhas mostram a repressão da transcrição de genes relevantes pelos repressores SoxR, RamR, AcrR, e pelo gene *micF*. As setas pretas revelam a ativação da expressão gênica pelos ativadores SoxS, RamA, Rob, AcrA, AcrB e TolC. No geral, sob várias condições, esses múltiplos mecanismos de regulação podem juntos produzir isolados multirresistentes, permitindo simultaneamente a diminuição do influxo (via porina OmpF) e aumento da extrusão (via AcrAB-TolC) de agentes antimicrobianos.

Resistência ao IMI/REL foi observada em KPC-3 com alteração V239G em *K. pneumoniae*. No entanto, mutações nos genes *ramR* e *ompK36* estavam associadas à variante (SATAPOOMIN; DULYAYANGKUL; AVISON, 2022). KPC-3 com substituição V239G não apresenta maior sensibilidade aos carbapenêmicos, cefalosporinas de última geração e aztreonam como KPC-3

com substituição D179Y, mutação que leva à resistência ao CAZ/AVI. Assim, o surgimento dessa variante do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> deve ser observado com cautela (SATAPOOMIN; DULYAYANGKUL; AVISON, 2022).

Para a tribo *Proteeae* (*P. mirabilis*, *Providência* spp. e *M. morgani*), as CIMs para imipenem parecem ser intrinsecamente superiores a outros carbapenêmicos (meropenem, ertapenem ou doripenem) (SHI et al., 2020; YANG; SHENG; HSUEH, 2020). Particularmente, *P. mirabilis* possui diminuição da sensibilidade ao imipenem principalmente devido à fraca afinidade pelas PBPs ou pela perda de porinas (GIRLICH et al., 2020).

IMI/REL foi aprovado pelo FDA em 2019 ([https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/212819s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/212819s000lbl.pdf)) para o tratamento de infecções do trato urinário e intra-abdominais complicadas em adultos, além de pneumonia bacteriana adquirida em hospital e pneumonia bacteriana associada à ventilação mecânica e pelo EMA em 2020 (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/recarbrio>) para o tratamento de infecções por gram-negativos quando as opções terapêuticas são limitadas ou ausentes (BASSETTI et al., 2022).

Segundo as diretrizes da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) para o tratamento de ERCs publicada em 2021, CAZ/AVI, IMI/REL e meropenem-vaborbactam (novo inibidor de beta-lactamase derivado de ácido borônico) passaram a ser considerados antimicrobianos de primeira escolha para infecções dentro e fora do trato urinário, principalmente quando causadas por KPC. As opções de tratamento para NDM e outras metalo-beta-lactamases preferidas são CAZ/AVI em combinação com aztreonam ou cefiderocol (novo antimicrobiano híbrido composto de uma cefalosporina e de um sideróforo) como monoterapia, e, para OXA-48-like, CAZ/AVI é a opção preferida e cefiderocol uma opção alternativa (TAMMA et al., 2021).

Embora vários agentes antimicrobianos tenham sido aprovados nos últimos 10 anos para o tratamento de infecções causadas por ERCs, esse avanço significativo no arsenal terapêutico veio acompanhado do rápido surgimento de cepas resistentes e, infelizmente, a resistência a qualquer nova opção antimicrobiana inevitavelmente surgirá (MA et al., 2020; PAPP-WALLACE et al., 2020). A identificação de alterações genéticas que desencadeiam a resistência ganhou um grande aliado com a chegada das

novas tecnologias que fazem o sequenciamento de genoma completo e utilizam ferramentas de bioinformática para sua interpretação e serão discutidas a seguir.

### 1.3 USO DE NOVAS TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA PARA PESQUISA DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

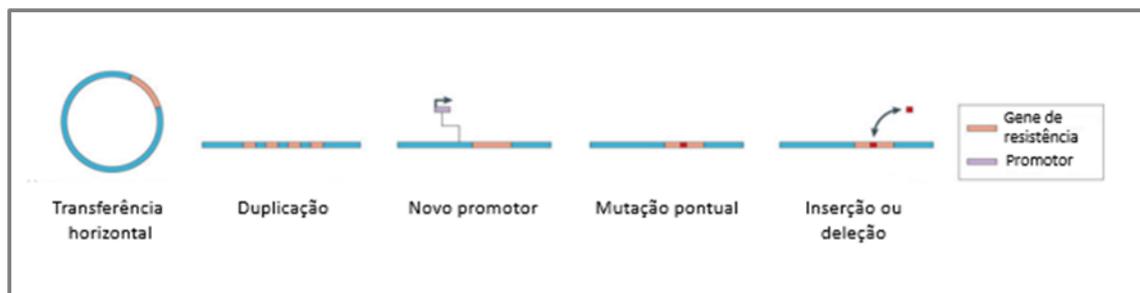
O avanço nas tecnologias de sequenciamento de DNA observado nos últimos anos representou um importante e fundamental aliado no rastreamento e compreensão da disseminação de mecanismos de resistência antimicrobiana (OTTO, 2017). O aumento da disponibilidade dos dados de sequências bacterianas produziu evidências genéticas detalhadas anteriormente indisponíveis e os custos continuamente decrescentes tornaram o sequenciamento uma ferramenta de vigilância de resistência antimicrobiana viável (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

Em 2005, com a introdução de novas tecnologias de sequenciamento de DNA ou *Next Generation Sequencing* (NGS), os princípios da enzimologia utilizados por Sanger, Nicklen e Coulson (1977) foram agregados à capacidade aprimorada de geração e armazenamento de dados (MCCOMBIE; MCPHERSON; MARDIS, 2019). Abordagens NGS realizam milhões a bilhões de reações de sequenciamento simultaneamente e utilizam algoritmos computacionais aprimorados para organizar os dados genômicos gerados (KUMAR; COWLEY; DAVIS, 2019). O sequenciamento de genoma completo ou *Whole Genome Sequencing* (WGS) está se tornando uma das principais aplicações das novas tecnologias de sequenciamento de DNA (SHENDURE; AIDEN, 2012).

Esses avanços alcançados na área da genômica proporcionaram uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência antimicrobiana codificados geneticamente, como alterações em promotores ou duplicação de genes existentes, mutações pontuais, inserções ou deleções, ou a aquisição de novos genes via transferência horizontal (Figura 1.9) (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019). Dados sem precedentes sobre a distribuição global e disseminação de genes de resistência antimicrobiana entre amostras humanas, animais e ambientais ajudaram-nos a entender como diferentes

*habitats* e filogenias afetam a evolução da resistência em todo o mundo (POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016).

Figura 1.9 - Bases genéticas da resistência antimicrobiana.



Fonte – Adaptado de BOOLCHANDANI (2019).

Várias metodologias e ferramentas foram desenvolvidas para utilizar o NGS na detecção de determinantes genéticos de resistência antimicrobiana (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019). Apesar das grandes diferenças entre os métodos, o fluxo de trabalho segue basicamente três grandes etapas: preparação de amostras, sequenciamento de ácidos nucleicos e análise de dados (KUMAR; COWLEY; DAVIS, 2019). De forma breve, o DNA é extraído da amostra bacteriana, fragmentado no comprimento apropriado para a plataforma de sequenciamento, marcado com códigos de barras únicos e sequenciado. Cada fragmento sequenciado constitui uma *read* e a sobreposição das *reads* geram trechos mais longos de sequências de DNA contíguas, chamados de *contigs* (BLAKE; CHOI; DANTAS, 2021).

Ferramentas de bioinformática específicas como FastQC são utilizadas para avaliar a qualidade dos dados gerados antes da montagem do genoma. A montagem *de novo* desses dados é realizada utilizando programas como Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008), SPAdes (BANKEVICH et al., 2012) e Unicycler (WICK et al., 2017). A verificação da qualidade de uma montagem utiliza outras ferramentas, como o QUAST (GUREVICH et al., 2013), capaz de analisar o tamanho e número de *contigs*, porcentagem de bases não resolvidas, conteúdo GC e cobertura total do genoma. Após a montagem, o genoma é anotado utilizando programas como Prokka (SEEMANN, 2014), *Rapid Annotation using Subsystem Technology* – RAST (AZIZ et al., 2008), entre outros, e a visualização dos dados gerados no formato *draft* ou genoma

completo pode ser feita em programas como PATRIC ou Artemis. Atualmente, tecnologias de NGS são classificadas em sequenciamento de segunda geração (leituras curtas) e sequenciamento de terceira geração (leituras longas) (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; BOONE, 2019).

### 1.3.1 Sequenciamento de segunda geração ou de leituras curtas (*short-reads*)

As abordagens de sequenciamento de leituras curtas são realizadas através de sequenciamento por síntese (SBS) ou sequenciamento por ligação (SBL). As abordagens SBS utilizam uma polimerase e um sinal, como um fluoróforo ou uma mudança na concentração iônica, e identificam a incorporação de um nucleotídeo ao DNA analisado. Outra forma de SBS é a que realiza o sequenciamento por mudança de pH após a incorporação de nucleotídeos. Nas abordagens SBL, uma sonda ligada a um fluoróforo hibridiza um fragmento de DNA e é ligado a um oligonucleotídeo adjacente para geração de imagens. O espectro de emissão do fluoróforo identifica a base ou bases complementares em posições específicas dentro da sonda (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

As plataformas da companhia Illumina realizam o sequenciamento de leituras curtas por síntese (SBS), gerando milhões de fragmentos de DNA de forma simultânea com comprimento de leitura (read) variando de 150 a 300 bp utilizando biblioteca do tipo *paired-end*. O grande volume de *reads* produzido afeta diretamente a montagem posterior do genoma, devido à sua natureza combinatória, o que torna complexa a reconstrução de uma sequência original completa. Embora a utilização de dados do Illumina gere resultados fragmentados do genoma, essa tecnologia é capaz de fornecer um rascunho de alta precisão e rendimento, e é considerada a plataforma mais utilizada até hoje (JEON et al., 2021; LIU et al., 2012).

Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores acoplam-se aos primers fixados na superfície da *flowcell*, em seguida os adaptadores se ligam a outros primers formando uma ponte. As fitas duplas amplificadas permanecem próximas, formando *clusters*, que irão conter milhares de cópias do mesmo fragmento de DNA cada um deles. As fitas duplas de DNA são convertidas em fita simples após aplicação de uma enzima de linearização. A síntese da nova

fitas ocorre pelo sequenciamento base-a-base após adição de desoxinucleotídeos marcados com fluorescência cliváveis e de uma região bloqueadora removível que são adicionados à placa (LIU et al., 2012).

Desde o lançamento do sequenciador MiSeq em 2011, novos aparelhos Illumina foram disponibilizados, como o HiSeq2500 em 2012, o NextSeq 500 em 2014, HiSeq X Ten, HiSeq 3000 e os sistemas HiSeq 4000 em 2015 e NovaSeq em 2017, sempre com o objetivo de reduzir o custo e o tempo de sequenciamento, aumentar a capacidade (*throughput*) de dados e qualidade dos resultados (ZHONG et al., 2020).

### 1.3.2 Sequenciamento de terceira geração ou de leituras longas (*long-reads*) e em tempo real (*real-time*)

Dois tipos de tecnologias de sequenciamento altamente paralelas que produzem leituras longas estão disponíveis comercialmente. Os aparelhos das empresas Oxford Nanopore Technologies (ONT) e Pacific Biosciences (PacBio) produzem *reads* com muitos milhares de bases e usam sequenciamento de molécula única ou *single-molecule sequencing* (SMS), embora com métodos de detecção muito diferentes (LEVY; BOONE, 2019).

Lançado em 2014 pela ONT, o MinION é um sequenciador portátil sem síntese ativa de DNA que usa uma grade de nanoporos biológicos e uma membrana de polímero eletricamente resistente (KONO; ARAKAWA, 2019). Uma grande vantagem do sistema ONT em cenários clínicos é sua capacidade de analisar dados em tempo real, onde a detecção rápida de mutações específicas pode fornecer informações epidemiológicas, como a relação de cepas em um surto ou a detecção de genes de resistência, que impactam diretamente no manejo inicial do tratamento de infecções (QUAINOO et al., 2017).

Ao contrário das leituras curtas, o sequenciamento Nanopore fornece leituras longas, porém, de qualidade inferior, normalmente levando a montagens completas propensas a erros ( $\approx 5\%$  na nomeação das bases) (FENG et al., 2015). Tais erros podem dificultar estudos de genômica comparativa ou fornecer resultados enganosos na análise de variantes. Na tentativa de superar as deficiências de ambos os sequenciadores, abordagens

híbridas que combinam leituras curtas e longas surgiram como métodos confiáveis para obter genomas bacterianos completos altamente precisos (SHARON et al., 2021).

Desde o início de 2020, vivemos uma realidade delicada e preocupante com a pandemia de COVID-19. O uso de antimicrobianos, tanto em pacientes ambulatoriais quanto internados, aumentou consideravelmente. Essa realidade nos fará enfrentar uma nova pandemia, a da resistência antimicrobiana (BIANCO et al., 2022). A estimativa é de que, até o ano de 2050, a pandemia da resistência possa matar 10 milhões de pessoas anualmente contra 700.000 por ano atualmente se nada for feito (SINGHAL, 2022). O desenvolvimento de novos antimicrobianos e o estudo genético dos mecanismos de resistência bacteriana são armas imprescindíveis nessa luta eminente.

## **CAPÍTULO 2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PLAZOMICINA E DETECÇÃO DE GENES PRODUTORES DE 16S-rRNA METILTRANSFERASES EM *ENTEROBACTERALES* PRODUTORES DE CARBAPENEMASES**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

O atual perfil de resistência antimicrobiana de bactérias gram-negativas tem sido um importante desafio para o tratamento de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (EICHENBERGER; THADEN, 2019; POP-VICAS; OPAL, 2014; YUSUF et al., 2021). No Brasil, *Enterobacterales* é considerada uma importante etiologia em IRAS, e aproximadamente 50% das infecções causadas por *K. pneumoniae* são resistentes aos carbapenêmicos pela produção de enzimas carbapenemases (DIAS et al., 2021; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A carbapenemase mais prevalente entre *Enterobacterales* em nosso país é a KPC-2 (AREND et al., 2015). No entanto, relatos de infecções por NDM, IMP, VIM, GES e OXA-48 são cada vez mais frequentes (SAMPAIO; GALES, 2016). As opções disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales* produtores de carbapenemases (EPCs) são aminoglicosídeos, fosfomicina, polimixinas e tigeciclina. O uso de aminoglicosídeos e polimixinas é limitado devido à nefrotoxicidade; a fosfomicina intravenosa não está disponível em nosso país; e a tigeciclina não é indicada para infecções graves (MORRILL et al., 2015).

A plazomicina é um aminoglicosídeo de última geração com atividade potente contra *Enterobacterales*, incluindo isolados produtores de carbapenemases (HAIDAR et al., 2016; RODRÍGUEZ-AVIAL et al., 2015; ZHANG; KASHIKAR; BUSH, 2017). Nefrotoxicidade e ototoxicidade foram observadas com a plazomicina, porém, documentadas em quantidades menores comparada aos outros aminoglicosídeos sistemicamente disponíveis, embora relativamente poucos pacientes tenham sido expostos à plazomicina até o momento (ABDUL-MUTAKABBIR et al., 2019).

Modificações estruturais na molécula da plazomicina permitem sua atividade na presença da maioria das EMAs, o mecanismo mais comum de

resistência aos aminoglicosídeos. No entanto, a produção de 16S-rRNA metiltransferases (16S-RMTases) impede sua ação antimicrobiana (DOI, 2019). Até o momento, não há nenhum estudo avaliando a atividade da plazomicina e sua correlação com a prevalência de 16S-RMTases em cepas brasileiras de EPCs.

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade da plazomicina contra *Enterobacterales* produtores de carbapenemases e investigar a prevalência de 16S-RMTases em amostras não sensíveis à plazomicina coletadas em diferentes hospitais brasileiros.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Isolados

O presente estudo teve início com a análise de 4000 *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos consecutivamente isoladas em 50 hospitais brasileiros nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, entre janeiro de 2013 e outubro de 2015. Das 4000 amostras analisadas, 499 foram selecionadas para a pesquisa, baseadas na maior diversidade de identificação bacteriana, origem geográfica, tipo de carbapenemase detectada, período de coleta e tipo de amostra clínica, priorizando amostras de sangue, trato respiratório inferior, líquido e urina. Apenas um isolado por paciente foi selecionado, entre eles *Klebsiella* spp. (n=372), *Enterobacter* spp. (n=73), *Escherichia coli* (n=18), *Serratia* spp. (n=13), *Citrobacter* spp. (n=10), *Morganella morgannii* (n=6), *Providencia* spp. (n=4), *Proteus* spp. (n=2), *Edwardsiella hoshinae* (n=1) e *Raoutella planticola* (n=1).

Entre os genes de carbapenemases estudados foram *bla<sub>KPC-2</sub>* (n=397), seguido por *bla<sub>NDM-1</sub>* (n=81), *bla<sub>OXA-48-like</sub>* (n=13), *bla<sub>IMP</sub>* (n=3) e *bla<sub>GES-like</sub>* (n=2). Outros genes foram identificados em apenas um isolado cada: *bla<sub>BKC-1</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*. Um isolado apresentou dois genes produtores de carbapenemase (*bla<sub>KPC-2</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*).

### 2.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM para sulfato de colistina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI), tigeciclina (Sigma-Aldrich), meropenem (Sigma-Aldrich), amicacina (Sigma-Aldrich), gentamicina (Sigma-Aldrich) e plazomicina (Achaogen, South San Francisco, CA) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (MDC), conforme o documento do CLSI (2015). Devido à resistência intrínseca ou baixa atividade, colistina não foi testada para *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *M. morgani* e tigeciclina não foi testada para *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *M. morgani*. Os pontos de corte segundo CLSI/FDA e EUCAST foram utilizados quando disponíveis (FDA, 2019; CLSI, 2017; EUCAST, 2017). Os testes foram realizados em triplicata e as cepas controle utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 2.2.3 Seleção de amostras para tipagem molecular por ERIC-PCR

Possíveis clones foram pesquisados em amostras (mesma espécie e cidade/hospital) não sensíveis (CIM  $\geq$  4 mg/L) à plazomicina (FDA, 2019) utilizando a técnica *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR) (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Os primers ERIC1 e ERIC2 liofilizados foram hidratados para atingir a concentração final de 100 pmol/ $\mu$ L. O DNA foi obtido através da suspensão de uma alçada bacteriana em 200  $\mu$ L de Chelex® 100 (Bio-Rad) a 5% e posterior fervura a 94°C por 15 minutos e centrifugação em microcentrífuga por 5 minutos. Então, 2  $\mu$ L da suspensão de DNA foi adicionado a 23  $\mu$ L da PCR Mastermix, resultando em um volume final da reação de 25  $\mu$ L. A PCR Mastermix foi preparada com 19,5  $\mu$ L de água MIILI-Q estéril, 2,8  $\mu$ L de tampão da enzima, 2,5  $\mu$ L de cloreto de magnésio a 50 mM, 0,6  $\mu$ L de dNTP a 12,5 mM, 1,25  $\mu$ L de primer ERIC1 (*forward*), 1,25  $\mu$ L de primer ERIC2 (*reverse*) e 0,25  $\mu$ L de Taq DNA polimerase. Os parâmetros cíclicos utilizados foram os mesmos, uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, 52°C por 60 segundos e 72°C por 8 minutos, e uma extensão final a 72°C por 16 minutos. Os produtos de

amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE 1X (tris base, ácido bórico e EDTA), ajustando o aparelho para 90V, e tempo de corrida de aproximadamente 4 horas. Um transiluminador com lâmpada ultravioleta foi utilizado para visualização dos produtos no gel. A interpretação dos resultados foi realizada segundo os critérios de Tenover e cols (1995) (TENOVER et al., 1995). Os isolados foram designados geneticamente indistinguíveis se seus padrões de restrição tinham o mesmo número de bandas e as bandas correspondentes eram de mesmo tamanho aparente. Isolados foram considerados intimamente relacionados se as alterações resultaram em duas a três bandas diferentes e possivelmente relacionados quando apresentaram diferenças de quatro a seis bandas. Isolados foram considerados não relacionados quando sete ou mais bandas diferentes estavam presentes.

#### 2.2.4 Detecção de genes codificadores de 16S-rRNA metiltransferases

A detecção de genes codificadores de 16S-RMTases foi realizada em amostras não sensíveis ( $CIM \geq 4$  mg/L) à plazomicina (FDA, 2019). Duas multiplex PCR foram realizadas como descrito previamente por Corrêa et al (2014) (CORRÊA et al., 2014) para detectar os genes codificadores de 16S-rRNA metiltransferases *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* e *npmA* e suas características estão representadas no Quadro 2.1.

Todos os primers liofilizados foram hidratados para atingir a concentração final de 100 pmol/ $\mu$ L. O DNA foi obtido através da suspensão de uma alçada bacteriana em 200  $\mu$ L de Chelex® 100 (Bio-Rad) a 5% e posterior fervura a 94°C por 15 minutos e centrifugação em microcentrífuga a 2000 rpm por 5 minutos. Então, 2  $\mu$ L da suspensão de DNA foi adicionado a 23  $\mu$ L da PCR Mastermix, resultando em um volume final da reação de 25  $\mu$ L. A PCR Mastermix da multiplex 1 foi preparada com 20,75  $\mu$ L de água MIILI-Q estéril, 2,5  $\mu$ L de tampão da enzima, 1  $\mu$ L de cloreto de magnésio, 0,5  $\mu$ L de dNTP a 12,5 mM, 1  $\mu$ L de primer mix e 0,125  $\mu$ L de Taq DNA polimerase. Para a Master Mix da multiplex 2 utilizamos 18,75  $\mu$ L de água MIILI-Q estéril, 2,5  $\mu$ L de tampão, 2  $\mu$ L de cloreto de magnésio, 0,5  $\mu$ L de dNTP a 12,5 mM, 1  $\mu$ L de primer mix e 0,125  $\mu$ L de Taq DNA polimerase. Os parâmetros cíclicos

utilizados para as duas multiplex foram os mesmos, sendo uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 25 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 25 segundos, e uma extensão final a 72°C por 3 minutos. Um resultado positivo foi posteriormente confirmado por PCR simples com os primers utilizados na multiplex PCR. Os controles utilizados foram cepas sequenciadas e armazenadas em um banco de bactérias do *Laboratory of Emerging Infectious Diseases* (LEID1: *rmtD*; LEID86: *rmtB*; LEIDA39: *rmtC* e LEIDA35: *armA*).

Quadro 2.1– Primers utilizados na realização de duas multiplex PCR simples para detecção de metiltransferases.

MULTIPLEX 1			
Gene	Direção	Sequências	Tamanho do produto
<i>rmtA</i>	Forward	5'-AAACTATTCCGCATGGTTC-3'	88 pb
	Reverse	5'-TCATGTACACAAGCTCTTCC-3'	
<i>rmtC</i>	Forward	5'-CAGGGGTTCCAACAAGT-3'	246 pb
	Reverse	5'-AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA-3'	
<i>rmtD</i>	Forward	5'-TCGTTTCAGCACGTAAAACA-3'	652 pb
	Reverse	5'-CAGCGCGAAATTCAAAAAGG-3'	
<i>rmtG</i>	Forward	5'-ACGGAATGCCGCGGAAGTA-3'	381 pb
	Reverse	5'-TCTCCGCAAGCAGATCGCCG-3'	
<i>rmtH</i>	Forward	5'-ATGACCATTGAACAGGCAGC-3'	464 pb
	Reverse	5'-AGGGCAAAGGTAAAATCCCA-3'	
MULTIPLEX 2			
Gene	Direção	Sequências	Tamanho do produto
<i>armA</i>	Forward	5'-ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC-3'	101 pb
	Reverse	5'-ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3'	
<i>rmtB</i>	Forward	5'-ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3'	171 pb
	Reverse	5'-AAGTATATAAGTTCTGTTCCG-3'	
<i>npmA</i>	Forward	5'-GGGCTATCTAATGTGGTG-3'	229 pb
	Reverse	5'-TTTTTATTTCCGCTTCTTCGT-3'	
<i>rmtE</i>	Forward	5'-GATGCCGTGTCTGTTACGCCG-3'	446 pb
	Reverse	5'-ACGTGAACCCACGAGTCCTGC-3'	
<i>rmtF</i>	Forward	5'-CGATCCTACTGGGCTCCAT-3'	314 pb
	Reverse	5'-GGCATAGTGCTTTTCCATGC-3'	

Fonte - O autor.

Legenda – pb: pares de bases.

## 2.2.5 Sequenciamento de genes codificadores de 16S-rRNA metiltransferases

O sequenciamento genético para confirmação e detecção de variantes foi realizado por metodologia automatizada de Sanger (1977) nos isolados que apresentaram banda para os genes pesquisados nas duas multiplex PCR

(SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Os primers foram construídos utilizando a ferramenta *online* Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e estão descritos no Quadro 2.2.

Os parâmetros cíclicos utilizados para a PCR foram uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 40 segundos, 55°C (*armA* e *rmtB*) e 53°C (*rmtC* e *rmtD*) por 40 segundos, 72°C por 45 segundos, uma extensão final a 72°C por 7 minutos e uma imersão final a 4°C. As concentrações de DNA foram quantificadas utilizando o NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e ajustadas para obtenção de 20 ng/μL. Os amplicons foram purificados utilizando reagentes ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) e sequenciados usando BigDye® terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com os protocolos do fabricante. Os produtos do sequenciamento foram purificados com Big Dye XTerminator (Applied Biosystems, Foster City, CA) e caracterizados por eletroforese capilar em um Analisador Genético ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências foram alinhadas pelo programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* e comparadas com os genes 16S-RMTases obtidos no GenBank utilizando a ferramenta BLAST para nucleotídeos.

Quadro 2.2 - Primers utilizados para o sequenciamento de metiltransferases.

Gene	Direção	Sequências	Temperatura de anelamento
<i>armA</i>	Forward	5'-GGTTGTTTCCATTTCTGAGA-3'	55°C
	Reverse	5'-CTCATTCCCTATAACCTTCG-3'	
<i>rmtC</i>	Forward	5'-GCCAAAGTACTCACAAGTGG-3'	55°C
	Reverse	5'-GATCATTCTCGAACTTAAC-3'	
<i>rmtD</i>	Forward	5'-GGACACGATCGAGCGCATAT-3'	53°C
	Reverse	5'-TCCATGCCGACGTTGCG-3'	
<i>rmtB</i>	Forward	5'- CAACGATGCCCTCACCTCCA -3'	53°C
	Reverse	5'-TAAGTTCTGTTCCGATGGTC -3'	

Fonte - O autor.

## 2.2.6 Análise estatística

A comparação das CIMs para cada antimicrobiano entre as diretrizes do CLSI e EUCAST foi realizada pelo teste Qui-quadrado entre isolados sensíveis e não sensíveis. O nível de significância considerado foi  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi realizada usando IBM SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*K. pneumoniae* produtor de KPC é a principal EPC relatada no Brasil e, neste estudo, compôs 328 (82,6%) dos 397 isolados produtores de KPC. Entre os isolados produtores de NDM, 34 eram *Klebsiella* spp. e 32 *Enterobacter* spp. Notavelmente, o primeiro relato de NDM no Brasil foi em 2013 e, embora essa enzima estivesse pouco difundida em nosso país, sua detecção vem aumentando consideravelmente (HANSEN, 2021; WINK et al., 2021).

O perfil de sensibilidade para os antimicrobianos testados está representado na Tabela 2.1. Com base nos pontos de corte do EUCAST, a sensibilidade à tigeciclina, colistina, amicacina, gentamicina e meropenem foi de 76%, 67%, 62%, 19% e 3%, respectivamente. A utilização dos pontos de corte do CLSI resultou em taxas de sensibilidade mais altas para os antimicrobianos, exceto meropenem. Houve diferença estatística significativa para a tigeciclina, amicacina e meropenem entre os critérios do CLSI e EUCAST. Diferenças entre os pontos de corte para a amicacina entre as duas diretrizes afetam consideravelmente a interpretação da atividade dos aminoglicosídeos, como observado em outro estudo, e devem ser avaliadas com cautela (FLEISCHMANN; GREENWOOD-QUAINTANCE; PATEL, 2020).

TABELA 2.1 - Atividade da plazomicina e agentes comparadores contra 499 *Enterobacterales* produtoras de carbapenemase isoladas de 50 hospitais brasileiros (2013 a 2015).

ANTIMICROBIANO / N° DE ISOLADOS	CIM (mg/L)			SENSIBILIDADE (%)		Valor de $p^a$
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Range	CLSI	EUCAST	
Plazomicina (499)	0.5	64	≤0.125 - >64	86 <sup>b</sup>	-	-
Meropenem (499)	128	256	≤0.5 - >256	1	3	0.0421
Colistina (474)	0.5	64	≤0.125 - >64	-	67	-
Tigeciclina (487)	0.5	2	≤0.03 - 16	95 <sup>b</sup>	76	< 0.0001
Gentamicina (499)	64	>64	0.25 - >64	22	19	0.2424
Amicacina (499)	16	>512	≤1 - >512	77	62	< 0.0001

Fonte - A autora.

Legenda - S: Sensível; NS: Não Sensível. <sup>a</sup> O valor P denota a diferença entre o perfil de sensibilidade pelo EUCAST e CLSI para os diferentes antimicrobianos testados. <sup>b</sup> Pontos de corte segundo FDA.

Tigeciclina tem sido utilizada para o tratamento das ERCs e a terapia combinada pode oferecer uma vantagem sobre a monoterapia no que diz respeito à mortalidade de pacientes críticos com infecções graves (WANG et al., 2017). No presente estudo, a tigeciclina teve a maior sensibilidade contra os isolados.

A não sensibilidade à colistina contra os isolados deste estudo foi elevada (33%), mesmo excluindo isolados com resistência intrínseca. A taxa de resistência e heterorresistência às polimixinas está aumentando e é importante ressaltar que testes clínicos convencionais muitas vezes não são capazes de detectar isolados heterorresistentes, o que pode ser uma causa significativa de falha inexplicada no tratamento com essas drogas (BAND et al., 2021). A colistina tem sido associada a uma alta incidência de insuficiência renal aguda em estudos de coorte retrospectivos e prospectivos (KWON et al., 2015; RIGATTO et al., 2016; TUON et al., 2014).

Em nosso estudo, a plazomicina apresentou maior potência e atividade (CIM<sub>50/90</sub> 0,5/64 mg/L) do que os outros aminoglicosídeos testados (CIM<sub>50/90</sub> 64/>64 e CIM<sub>50/90</sub> 16/>512 mg/L para gentamicina e amicacina, respectivamente). Uma exceção ao grupo foram *Enterobacterales* não fermentadores da lactose como *Proteus* spp., *Morganella morganii* e *Providencia* spp. que exibiram valores de CIM<sub>50/90</sub> ligeiramente maiores, resultados também encontrados por outro autor (CASTANHEIRA et al., 2020a). Nossos achados são consistentes com estudos anteriores que mostraram que a plazomicina é altamente ativa contra isolados clínicos multirresistentes de *Enterobacterales*, incluindo isolados produtores de KPC e ESBL (WALKTY et al., 2014; ZHANG; KASHIKAR; BUSH, 2017). Em um estudo realizado por Thwaites et al. (2018), plazomicina e colistina foram os agentes bactericidas mais ativos; tigeciclina teve potente atividade, mas foi amplamente bacteriostática contra *Enterobacterales* multirresistentes. Esses resultados reforçam o potencial clínico da plazomicina contra isolados com fenótipos de resistência desafiadores (THWAITES et al., 2018a, 2018b).

Os pontos de corte para a plazomicina atualmente disponíveis segundo o FDA são  $\leq 2$  mg/L (sensível), 4 mg/L (intermediário) e  $\geq 8$  mg/L (resistente) (FDA, 2019). Em nosso estudo, a plazomicina teve CIM  $\leq 4$  mg/L para 88% dos isolados e CIM  $\leq 2$  mg/L para 86% dos isolados. Em um estudo realizado com

87 amostras de *Enterobacterales* produtores de KPC isoladas entre 2014 e 2015 em hospitais nos Estados Unidos, 98,9% apresentaram CIM  $\leq$  4 mg/L para a plazomicina (CASTANHEIRA et al., 2018c).

Segundo o CLSI, entre as 387 amostras resistentes à gentamicina em nosso estudo, 84% tinham CIM  $\leq$  4 mg/L para a plazomicina e 50% entre as 114 amostras resistentes à amicacina também foram inibidas com CIM  $\leq$  4 mg/L para a plazomicina. Cento e um (20,2%) isolados eram não sensíveis à gentamicina e amicacina e, em 44 (43,6%) deles, a CIM para a plazomicina foi  $\leq$  4 mg/L (Tabela 2.2). Nossos dados revelam uma sensibilidade inferior para a plazomicina quando comparados com os dados obtidos por Castanheira et al. (2018), onde a CIM para a plazomicina foi  $\leq$  4 mg/L para 96,6% dos isolados não sensíveis à gentamicina e 64,3% dos isolados não sensíveis à amicacina. Esse fato pode ser explicado pela diversidade de mecanismos de resistência que estão associados com as carbapenemases testadas no estudo (LEE et al., 2022).

Utilizando os pontos de corte do EUCAST (2017), das 499 amostras analisadas, 22 (4,4%) foram resistentes a todos os antimicrobianos testados e a plazomicina considerada sensível (CIM  $\leq$  2 mg/L) em 11 (50%) desses isolados. A potente atividade *in vitro* da plazomicina que se traduz em rápida morte bacteriana em concentrações mais baixas pode ser uma vantagem para um novo agente antibacteriano, pois isso evita o recrescimento bacteriano e, presumivelmente, o surgimento de resistência (THWAITES et al., 2018a).

Analisando as três principais carbapenemases testadas, observou-se que a plazomicina apresentou CIM  $\leq$  2 mg/L para 86% (n=342) das 397 amostras KPC-2 positivas, 84% (n=68) das 81 amostras NDM-1 positivas e 92% (n=11) das 12 amostras OXA-48 positivas. Um estudo realizado com 277 amostras de *Enterobacterales* multirresistentes isolados nos Estados Unidos, Canadá e Singapura encontrou um perfil de sensibilidade diferente. Entre as amostras com o gene *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>, a sensibilidade para a plazomicina foi de 94,9%, 35,7% e 50%, respectivamente (FLEISCHMANN; GREENWOOD-QUAINTANCE; PATEL, 2020). A distribuição da CIM para a plazomicina em relação ao tipo de carbapenemase produzida em nosso estudo pode ser vista na Tabela 2.3.

Tabela 2.2 – Distribuição da CIM para a plazomicina de acordo com a sensibilidade à gentamicina e amicacina utilizando os pontos de corte do CLSI.

AMINOGLICOSÍDEOS	CIM DA PLAZOMICINA (mg/L)									
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64
Gentamicina S (N=112)	8	28	33	20	18	5	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	7%	32%	62%	79%	96%	100%	100%	100%	100%	100%
Gentamicina NS (N=387)	45	111	95	46	24	5	3	0	0	58
Percentagem cumulativa	12%	40%	65%	76%	83%	84%	85%	85%	85%	100%
Amicacina S (N=385)	43	124	111	61	34	8	3	0	0	1
Percentagem cumulativa	11%	43%	72%	88%	97%	99%	100%	100%	100%	100%
Amicacina NS (N=114)	10	15	17	5	8	2	0	0	0	57
Percentagem cumulativa	9%	22%	37%	41%	48%	50%	50%	50%	50%	100%
Gentamicina NS/Amicacina NS (N=101)	9	12	12	4	6	1	0	0	0	57
Percentagem cumulativa	9%	21%	33%	37%	42%	43%	43%	43%	43%	100%
Gentamicina NS/Amicacina S (N=286)	36	99	83	42	18	4	3	0	0	1
Percentagem cumulativa	13%	47%	76%	91%	97%	99%	100%	100%	100%	100%
Gentamicina S/Amicacina NS (N=13)	1	3	5	1	2	1	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	8%	31%	69%	77%	92%	100%	100%	100%	100%	100%
Gentamicina S/Amicacina S (N=99)	7	25	28	19	16	4	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	7%	32%	61%	80%	96%	100%	100%	100%	100%	100%

Fonte – O autor.

Legenda – CIM: concentração inibitória mínima; S: Sensível; NS: Não Sensível; N: número de isolados.

Tabela 2.3 - Distribuição da CIM para a plazomicina em relação ao tipo de carbapenemase produzida pelo isolado.

CARBAPENEMASE	CIM DA PLAZOMICINA (mg/L)										
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
KPC-2 (N=397)	30	123	111	49	29	6	0	0	0	9	40
Percentagem cumulativa	8%	39%	66%	79%	86%	87%	87%	87%	87%	90%	100%
NDM-1 (N=81)	20	13	13	12	10	3	3	0	0	7	0
Percentagem cumulativa	25%	41%	57%	72%	84%	88%	91%	91%	91%	100%	100%
OXA-48-LIKE (N=13)	2	1	2	5	2	0	0	0	0	0	1
Percentagem cumulativa	15%	23%	38%	77%	92%	92%	92%	92%	92%	92%	100%
IMP-1 (N=3)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	0%	33%	67%	67%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
GES-LIKE (N=2)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	0%	50%	50%	50%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
VIM-1 (N=1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
BKC-1 (N=1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Percentagem cumulativa	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
NDM-1+KPC-2 (N=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Percentagem cumulativa	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
<b>Total (N=499)</b>	<b>53</b>	<b>139</b>	<b>128</b>	<b>66</b>	<b>42</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>42</b>
<b>Percentagem cumulativa</b>	<b>11%</b>	<b>38%</b>	<b>64%</b>	<b>77%</b>	<b>86%</b>	<b>88%</b>	<b>88%</b>	<b>88%</b>	<b>88%</b>	<b>91%</b>	<b>100%</b>

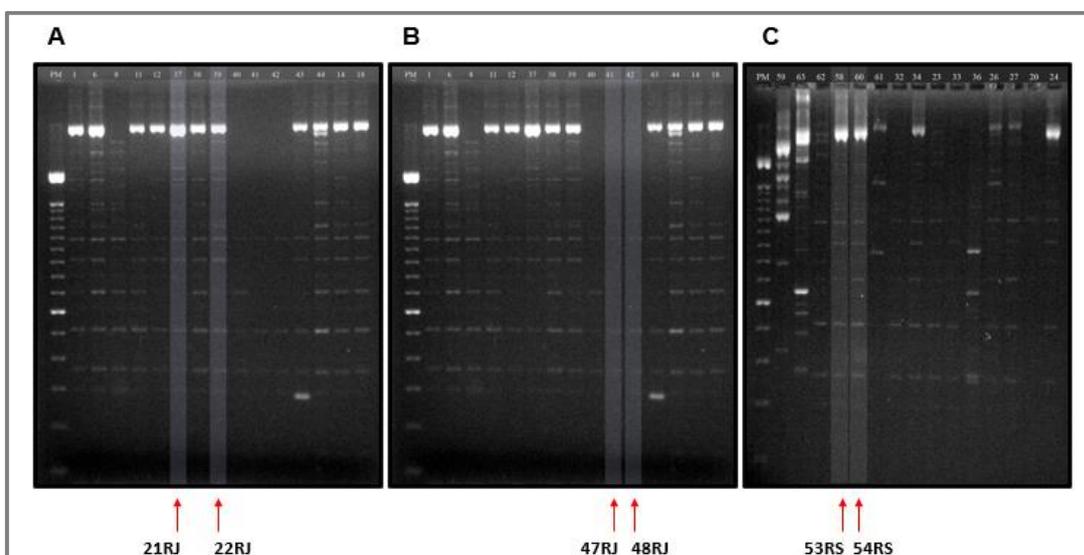
Fonte – A autora.

Legenda – CIM: concentração inibitória mínima; N: número de isolados.

A disseminação de *bla*<sub>NDM</sub> em países onde sua prevalência é elevada deve-se a plasmídeos do tipo IncA/C, e muitos desses plasmídeos também carregam vários genes de resistência a outros antimicrobianos, incluindo 16S-rRNA metiltransferases (LEE et al., 2016). Essa característica elevaria a CIM da plazomicina, pois a droga é inativa frente às metiltransferases. Curiosamente, nossos achados mostraram uma sensibilidade de 84% para a plazomicina em *Enterobacterales* produtores de NDM. No Brasil, um novo transposon chamado Tn3000 nos plasmídeos IncFIik e IncX3 está envolvido na transmissão do gene *bla*<sub>NDM</sub>. Nesses plasmídeos, a sensibilidade aos aminoglicosídeos é variável, sugerindo que o mecanismo de resistência é a presença de EMAs e não 16S-rRNA metiltransferase (CAMPOS et al., 2015).

A prevalência de 16S-RMTases nas amostras com CIM  $\geq 4$  mg/L para a plazomicina foi investigada. Uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 perdeu a viabilidade durante o estudo. A clonalidade pela técnica de ERIC-PCR foi realizada para 36 amostras que eram da mesma espécie e cidade/hospital e excluiu 3 isolados (todos *K. pneumoniae* produtores de KPC-2) (Figura 2.1). Sessenta e sete amostras (51 KPC, 13 NDM, 1 KPC + NDM, 1 OXA-48-like e 1 GES-like) não clonais foram testadas (Tabela 2.4).

Figura 2.1 - Clonalidade das amostras com CIM  $\geq 4$  mg/L para a plazomicina por ERIC-PCR.



Fonte - A autora.

Legenda – A: clonalidade entre as amostras 21RJ e 22RJ; B: clonalidade entre as amostras 47RJ e 48RJ; C: clonalidade entre as amostras 53RS e 54RS.

Tabela 2.4 - Características de *Enterobacterales* produtores de carbapenemases com CIM  $\geq$  4 mg/L para a plazomicina.

ISOLADO <sup>a</sup>	AMOSTRA CLÍNICA	ESPÉCIE BACTERIANA	CARBAPENEMASE	CIM (mg/L)			
				PLZ	GEN	AMI	MEM
01RS	Swab retal	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	4	64	2	16
02RS	Swab retal	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	4	>64	4	32
03RS	ND	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	4	64	4	64
04SP	ND	<i>Serratia marcescens</i>	GES-like	4	64	256	256
05RJ	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	4	0.5	8	256
06SP	ND	<i>Proteus mirabilis</i>	KPC	4	2	>512	8
07SP	ND	<i>Morganella morganii</i>	KPC	4	2	$\leq$ 1	4
08RS	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	4	64	4	128
09PR	Sangue	<i>Escherichia coli</i>	KPC	4	1	4	4
10PR	Urina	<i>Escherichia coli</i>	KPC	4	0.5	4	4
11RS	Aspirado traqueal	<i>Providencia rettgeri</i>	NDM	8	32	8	64
12RS	Ferida cirúrgica	<i>Morganella morganii</i>	NDM	8	64	2	64
13RS	Swab retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	8	64	2	256
14RS	Líquor	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	64	>64	>512	2
15RS	Swab retal	<i>Morganella morganii</i>	NDM	64	>64	>512	16
16RS	Abscesso cutâneo	<i>Morganella morganii</i>	NDM	64	>64	>512	8
17RS	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	64	>64	>512	32
18RS	Urina	<i>Escherichia coli</i>	NDM	64	>64	>512	64
19SP	ND	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	64	>64	512	64
20PR	Ferida de pele	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	>512	64
21RJ	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	512	>256
22RJ <sup>b</sup>	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	512	>256
23RJ	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	256	>256
24SP	ND	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	64	>64	>512	128
25PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	>512	256

Continua

## Continuação

ISOLADO <sup>a</sup>	AMOSTRA CLÍNICA	ESPÉCIE BACTERIANA	CARBAPENEMASE	CIM (mg/L)			
				PLZ	GEN	AMI	MEM
26PR	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	>512	1
27PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	>64	>512	128
28PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
29PR	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KPC	>64	>64	>512	64
30PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
31PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
32PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	>256
33PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
34PR	Líquor	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
35PR	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
36PR	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	16
37PR	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	512	4
38PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
39PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	32
40PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	32
41PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	32
42PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
43PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	128
44PR	Urina	<i>Escherichia coli</i>	KPC	>64	>64	>512	8
45PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	>256
46RJ	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	128
47RJ	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	128
48RJ <sup>b</sup>	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	128
49RJ	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
50RJ	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	128

Continua

## Continuação

ISOLADO <sup>a</sup>	AMOSTRA CLÍNICA	ESPÉCIE BACTERIANA	CARBAPENEMASE	CIM (mg/L)			
				PLZ	GEN	AMI	MEM
51SP	ND	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC + NDM	>64	>64	>512	64
52RS	Sangue	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48-like	>64	>64	>512	4
53RS <sup>b</sup>	Swab retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
54RS	Swab retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
55RS	Swab retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
56PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	8
57PR	Urina	<i>Escherichia coli</i>	KPC	>64	>64	>512	32
58PR	Abscesso	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KPC	>64	>64	>512	128
59PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
60PR	Sangue	<i>Providencia stuartii</i>	KPC	>64	>64	>512	8
61PR	Sangue	<i>Providencia stuartii</i>	KPC	>64	>64	>512	4
62PR	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
63RS	Aspirado traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
64PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
65PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	256
66PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	128
67PR	Urina	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KPC	>64	>64	>512	>256
68PR	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
69PR	Sangue	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	>64	>64	>512	64
70PR	Aspirado traqueal	<i>Serratia marcescens</i>	KPC	>64	>64	>512	256

Fonte: A autora.

Legenda - <sup>a</sup> Letras indicam os estados do Brasil: RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; PR, Paraná; SP, São Paulo. <sup>b</sup> Isolados excluídos pela técnica *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC PCR). CIM: concentração inibitória mínima; PLZ: plazomicina; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; ND: não disponível.

Entre as 67 amostras analisadas, 13 foram negativas para 16S-RMTases. Todas apresentavam CIM para a plazomicina de 4 mg/L ou 8 mg/L e demonstravam sensibilidade a pelo menos um dos outros dois aminoglicosídeos, com exceção da amostra de *S. marcescens* *bla*<sub>GES-like</sub>. As demais 54 amostras apresentaram resistência de alto nível aos três aminoglicosídeos testados, com CIM de plazomicina  $\geq 64$  mg/L, CIM de gentamicina  $> 64$  mg/L e CIM de amicacina variando entre 256 e  $\geq 512$  mg/L. O ensaio de multiplex PCR revelou a presença de apenas um tipo de 16S-RMTase em todas as 54 amostras. Considerando o total de 499 *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases estudado, a prevalência de metiltransferases foi de 10,8%.

O gene *rmtB* foi encontrado em 41 (75,9%) isolados (40 KPC e 1 OXA-48-like), seguido por *armA* em 7 (13%) isolados (6 NDM e 1 KPC), *rmtD* em 4 (7,4%) isolados KPC e *rmtC* em 2 (3,7%) isolados, um *K. pneumoniae* *bla*<sub>NDM-1</sub> e um *E. cloacae* coabrigando os genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub>. O sequenciamento por metodologia de Sanger dos genes de metiltransferases confirmou a identificação feita por PCR convencional. Todos os 41 genes *rmtB* foram classificados como *rmtB1* e, entre os quatro genes *rmtD*, três eram *rmtD2* (2 *K. pneumoniae* e um *S. marcescens*) e um *rmtD1* (*K. pneumoniae*). Os genes *rmtD* e *rmtB1* estavam mais associados com *bla*<sub>KPC-2</sub>, enquanto *armA* e *rmtC* estavam presentes principalmente em isolados produtores de NDM. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.5.

No Brasil, a associação entre *rmtB1* e *bla*<sub>KPC-2</sub> já foi anteriormente descrita em plasmídeos de alto peso molecular e maior disseminação. Entre 1.052 *Enterobacterales*, 22 (2,1%) abrigavam 16S-RMTases e 20 eram *K. pneumoniae* coabitando os genes *rmtB1*, *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Esses isolados pertenciam ao clone ST258, o que poderia explicar em parte a disseminação de *rmtB1* em nosso país (CASSU-CORSI et al., 2018). Além da expansão clonal, diferentes tipos de plasmídeos (Inc FIB, FIIS, I, T, X, N, Y, L/M, FIA) codificando 16S-RMTase têm contribuído para a disseminação dessas enzimas (WANGKHEIMAYUM et al., 2017).

Tabela 2.5 – Distribuição de 16S-rRNA metiltransferases em isolados clínicos de *Enterobacteriales* não sensíveis à plazomicina de acordo com os pontos de corte do FDA.

ESPÉCIE E CARBAPENEMASE	16S-RMTases	CIM DA PLAZOMICINA (mg/L)						TOTAL
		4	8	16	32	64	>64	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (N=41)								
KPC	<i>rmtB1</i>					5	27	32
KPC	<i>rmtD1</i>					1		1
KPC	<i>rmtD2</i>						2	2
KPC	<i>armA</i>						1	1
KPC	-	2						2
NDM	<i>armA</i>					1		1
NDM	<i>rmtC</i>					1		1
NDM	-		1					1
<i>Enterobacter cloacae</i> (N=8)								
KPC	<i>rmtB1</i>						1	1
NDM	<i>armA</i>					2		2
OXA-48-like	<i>rmtB1</i>						1	1
KPC + NDM	<i>rmtC</i>						1	1
NDM	-	3						3
<i>Escherichia coli</i> (N=5)								
KPC	<i>rmtB1</i>						2	2
NDM	<i>armA</i>					1		1
KPC	-	2						2

Continua

Continuação

ESPÉCIE E CARBAPENEMASE	16S-RMTases	CIM DA PLAZOMICINA (mg/L)						TOTAL
		4	8	16	32	64	>64	
<i>Morganella morganii</i> (N=4)								
NDM	<i>armA</i>					2		2
NDM	-		1					1
KPC	-	1						1
<i>Klebsiella aerogenes</i> (N=3)								
KPC	<i>rmtB1</i>						3	3
<i>Providencia stuartii</i> (N=2)								
KPC	<i>rmtB1</i>						2	2
<i>Serratia marcescens</i> (N=2)								
GES-like	-	1						1
KPC	<i>rmtD2</i>						1	1
<i>Providencia rettgeri</i> (N=1)								
NDM	-		1					1
<i>Proteus mirabilis</i> (N=1)								
KPC	-	1						1
<b>Total</b>		<b>10</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>41</b>	<b>67</b>

Fonte: A autora.

Legenda – 16S-RMTases: 16S-rRNA metiltransferases; CIM: concentração inibitória mínima; N: número de isolados.

NDM é a carbapenemase mais associada com a produção de metiltransferases entre *Enterobacterales* (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). Taylor et al. (2018) identificaram 762 *Enterobacterales* panresistentes aos aminoglicosídeos no Reino Unido e na Irlanda com um ou mais genes de 16S-RMTase (*armA*, 44,6%; *rmtC*, 19,2%; *rmtF*, 18,0%; *rmtB*, 11,4%) e a maioria (93,4%; 712/762) eram produtores de carbapenemases (*bla*<sub>NDM-1</sub> = 83,1%; *bla*<sub>OXA-48-like</sub> = 23,7% e *bla*<sub>KPC</sub> = 1,6%) (TAYLOR et al., 2018). Entre os 82 isolados positivos para o gene *bla*<sub>NDM</sub> em nosso estudo, apenas 8 (9,8%) coabrigavam 16S-RMTase. Em um hospital do nordeste da Índia, Wangkheimayum et al. (2017) encontraram as mesmas 16S-RMTases do nosso estudo, além de RmtA; no entanto, RmtC e a associação de 16S-RMTases com *bla*<sub>NDM</sub> foram predominantes (91% e 30%, respectivamente) (WANGKHEIMAYUM et al., 2017).

O gene *rmtC* foi encontrado em uma amostra de *E. cloacae* produtora de KPC + NDM e em uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de NDM. Essa metiltransferase não havia sido relatada em isolados clínicos de *Enterobacterales* em nosso país até o momento. O primeiro relato foi em um isolado de *P. mirabilis* no Japão em 2003 (WACHINO et al., 2006). Posteriormente, essa enzima foi encontrada em outros países, geralmente em associação com NDM (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). RmtC foi encontrado em *Acinetobacter baumannii* no Uruguai e no Brasil. Os 2 isolados clínicos uruguayos abrigavam OXA-23 e OXA-51 e 6 isolados brasileiros coproduziam ArmA e RmtB 16S-RMTases (DA PAZ PEREIRA et al., 2020).

RmtD e RmtG são outras 16S-RMTases já detectadas em estudos anteriores no Brasil e são normalmente encontradas na América do Sul (FRITSCHÉ et al., 2008; PASSARELLI-ARAUJO et al., 2019). Em nosso estudo, encontramos 3 RmtD-2, 1 RmtD-1 e nenhuma RmtG. *rmtD1* foi descrito pela primeira vez em *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e, posteriormente, em *K. pneumoniae* e outras espécies de *Enterobacterales* no Brasil (DOI; ARAKAWA, 2007). A variante *rmtD2* foi relatada em *E. aerogenes* na Argentina e em *K. pneumoniae* produtor de KPC-2 no Brasil (BUENO et al., 2016; TIJET et al., 2011). Um gene *rmtD2* em nosso estudo foi identificado em *S. marcescens* de um paciente paraguaio transferido para um hospital brasileiro, associação não relatada em nosso país até onde sabemos. Poucos estudos

utilizando sequenciamento de genoma completo em isolados de *S. marcescens* são encontrados na literatura, justificando um maior aprofundamento na investigação molecular desse isolado (WANG et al., 2021).

## 2.4 CONCLUSÃO

A plazomicina foi ativa contra 86% das EPCs (CIM  $\leq$  2 mg/L) testadas neste estudo. Analisando as três principais carbapenemases, observou-se que a plazomicina apresentou CIM  $\leq$  2 mg/L para 86% das amostras KPC positivas, 84% das amostras NDM positivas e 92% das amostras OXA-48-like positivas. Com base nos pontos de corte do EUCAST, a sensibilidade à tigeciclina, colistina, amicacina e gentamicina foi de 76%, 67%, 62% e 19%, respectivamente. A utilização dos pontos de corte do CLSI resultou em taxas de sensibilidade mais altas para os antimicrobianos, exceto meropenem. Houve diferença estatística significativa para a tigeciclina, amicacina e meropenem entre os critérios do CLSI e EUCAST.

A prevalência de metiltransferases entre os 499 isolados de EPCs foi elevada (10,8%). Estudos sobre a disseminação de 16S-RMTases no Brasil ainda são escassos. RmtB-1 foi a mais detectada entre as amostras positivas para metiltransferases (75,9%), principalmente em *K. pneumoniae* produtora de KPC. Outras 16S-RMTases detectadas foram ArmA (13%), RmtD-1 (1,8%), RmtD-2 (5,5%) e RmtC (3,7%). A coexistência de 16S-RMTase e EPCs é preocupante devido às opções limitadas de tratamento e à característica endêmica de KPC no Brasil.

Com base nesses achados, a plazomicina pode ser considerada uma droga promissora na terapia antimicrobiana para EPCs em nosso país, incluindo isolados produtores de NDM, carbapenemase que vem demonstrando aumento crescente entre nossos isolados.

## 2.5 ARTIGOS PUBLICADOS

## 2.5.1 Antimicrobial activity of plazomicina against Enterobacteriaceae-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 90 (2018) 228–232



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

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



## Antimicrobial activity of plazomicin against Enterobacteriaceae-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers



Andreza Francisco Martins <sup>a</sup>, Larissa Bail <sup>c</sup>, Carmen Antonia Sanches Ito <sup>c</sup>, Keite da Silva Nogueira <sup>c,f</sup>, Tanise Vendruscolo Dalmolin <sup>b</sup>, Amanda Silva Martins <sup>b</sup>, Jaime Luis Lopes Rocha <sup>d</sup>, Alisa W. Serio <sup>g</sup>, Felipe Francisco Tuon <sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>b</sup> Bacterial Resistance Laboratory, IABRESIS

<sup>c</sup> Division of Microbiology, Universidade Estadual de Ponta Grossa

<sup>d</sup> Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

<sup>e</sup> Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

<sup>f</sup> Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná

<sup>g</sup> Achaogen, South San Francisco, CA, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 July 2017

Received in revised form 2 November 2017

Accepted 3 November 2017

Available online 10 November 2017

## Keywords:

Carbapenemase  
Aminoglycosides  
Enterobacteriaceae  
Gentamicin  
Amikacin

## ABSTRACT

Plazomicin is a next-generation aminoglycoside with activity against Enterobacteriaceae, including carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE). The aim of this study was to evaluate the activity of plazomicin against CPE (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganello* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp.) from different Brazilian hospitals. A total of 4000 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates were collected from clinical samples in 50 Brazilian hospitals during 2013–2015. Of these, 499 carbapenem-resistant isolates (CLSI criteria) were selected for further evaluation via broth microdilution to assess for the activity of plazomicin, colistin, tigecycline, meropenem, amikacin, and gentamicin. Additionally, the isolates were assessed for the presence of carbapenemase genes (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>BEC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub>) by polymerase chain reaction (PCR). When PCR was positive to *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub>, the carbapenemase genes were sequenced. *bla*<sub>KPC</sub> was the most prevalent carbapenemase gene found (*n* = 397), followed by *bla*<sub>NDM</sub> (*n* = 81), *bla*<sub>OXA-48</sub> (*n* = 12), and *bla*<sub>IMP-1</sub> (*n* = 3). Other genes were identified in only 1 isolate each: *bla*<sub>BEC-1</sub>, *bla*<sub>GES-10</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>OXA-370</sub>, and *bla*<sub>VIM-1</sub>. One isolate had 2 carbapenemase genes (*bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub>). Thirty-three percent of the isolates were nonsusceptible to colistin, 24% to tigecycline, 97% to meropenem, 51% to amikacin, and 81% to gentamicin (via EUCAST criteria). The plazomicin MIC<sub>50/90</sub> was 0.5/64 mg/L, with 85% of MICs ≤ 2 mg/L and 87% of MICs ≤ 4 mg/L. Elevated MICs to plazomicin were not associated with a specific carbapenemase or bacterial species. The MICs of plazomicin against CPE were lower than those of other aminoglycosides. Plazomicin is a promising drug for the treatment of CPE infections.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The current antimicrobial resistance profile of Gram-negative bacteria has been an important challenge to the treatment of health-care-associated infections (HAIs) (Nordmann et al., 2011). In this context, the most common pathogens of HAI are *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacteriaceae*. In Brazil, *Enterobacteriaceae* has been the predominant etiology of HAI, and 50% of them are

carbapenem resistant, followed by *Acinetobacter* and *Pseudomonas* (Nordmann et al., 2009; Toledo et al., 2012).

The options available for treatment of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) infections are aminoglycosides, fosfomicin, polymyxins, and tigecycline. Aminoglycoside and polymyxin use is limited due to concerns over nephrotoxicity, intravenous fosfomicin is not available in Brazil, and tigecycline is not indicated for severe infections and resistance has increased. In Brazil, the most common CPE is *Klebsiella pneumoniae*, and the main carbapenemase is *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) type 2/KPC-2 (Arend et al., 2015). However, there are also some reported cases of infections due

\* Corresponding author. Tel.: +55-41-30601869.  
E-mail address: felipe.tuon@puccpr.br (F.F. Tuon).

to *Enterobacteriaceae* carrying New Delhi metallo- $\beta$ -lactamases (NDM), Imipenem (IMP), Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (VIM), Guiana extended spectrum (GES), and oxacillinase-48-type (OXA-48) in Brazil (Sampaio and Gales, 2016).

Plazomicin is a next-generation aminoglycoside derived from sisomicin and contains structural modifications that allow it to retain activity in the presence of common aminoglycoside resistance mechanisms. Plazomicin has potent activity against *Enterobacteriaceae*, including multidrug resistant isolates. Authors have previously evaluated the activity of plazomicin against collections of contemporary CPE from clinical isolates (Galani et al., 2012; Haidar et al., 2016; Livermore et al., 2011; Rodríguez-Avilal et al., 2015; Walkty et al., 2014; Zhang et al., 2017). These studies demonstrated that plazomicin was active against most strains, including KPC-producing strains. However, there is no study evaluating plazomicin activity against carbapenemase-producing Brazilian strains of *Enterobacteriaceae*.

The aim of this study is to evaluate the plazomicin activity against CPE from different Brazilian hospitals.

## 2. Methods

### 2.1. Isolates

A total of 4000 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CLSI criteria) were consecutively collected from 50 Brazilian hospitals (Rio de Janeiro, Sao Paulo, Curitiba, Porto Alegre, Cascavel, Londrina, Maringa, Joinville, Ponta Grossa, Foz do Iguaçu, Francisco Beltrão) from January 2013 to October 2015. Only clinically significant isolates were included in the study (1 per patient) and were from bloodstream, respiratory tract, cerebrospinal fluid, and other infections. Species identification was performed using standard microbiology methods and confirmed when necessary by automated method using the VITEK® 2 system (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) following the manufacturer's instructions. Five hundred carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates (CLSI criteria) from different cities were selected randomly for antimicrobial susceptibility testing. One isolate did not have a carbapenemase gene amplified and was excluded from further study. In total, 499 isolates were included, specifically *Klebsiella* spp. ( $n = 371$ ), *Enterobacter* spp. ( $n = 73$ ), *Escherichia coli* ( $n = 18$ ); *Serratia* spp. ( $n = 13$ ), *Citrobacter* spp. ( $n = 10$ ); *Morganella morganii* ( $n = 6$ ); *Providencia* spp. ( $n = 4$ ), *Proteus* spp. ( $n = 2$ ), *Edwardsiella hoshinae* ( $n = 1$ ), and *Raoultella planticola* ( $n = 1$ ).

### 2.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

Minimal inhibitory concentrations (MICs) for colistin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), tigecycline (Sigma-Aldrich), meropenem (Sigma-Aldrich), amikacin (Sigma-Aldrich), gentamicin (Sigma-Aldrich), and plazomicin (Achaogen, South San Francisco, CA) were tested by the broth microdilution method as described by the CLSI (2015). Plazomicin was supplied by Achaogen. Due to intrinsic resistance or poor activity, colistin was not evaluated against *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. and *M. morganii*. Tigecycline was not evaluated against *Proteus* spp., *Providencia* spp. and *M. morganii*. CLSI and EUCAST breakpoints were applied when available (CLSI, 2017; EUCAST, 2017). FDA breakpoints were used for tigecycline (FDA, 2010).

### 2.3. Carbapenemase Identification

Isolates were selected for molecular characterization based on a carbapenem-resistant phenotype (modified Hodge test, CLSI criteria). Carbapenemase detection was performed by multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>GES-1/6</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, and *bla<sub>NDM-1</sub>* (Monteiro et al., 2012). Conventional PCR was performed to detect the presence of *bla<sub>BKC</sub>* as previously described (Martins et al., 2016). To identify enzymes subtypes, the PCR

products of isolates that were positive for *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>GES-like</sub>*, and *bla<sub>OXA-48-like</sub>* were purified using the ExoStar kit (GE Healthcare) and sequenced using a BigDye Terminator kit (version 3.1) and an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences obtained were compared by BLAST on NCBI database.

### 2.4. Statistical Analysis

Comparison of MICs for each antibiotic between groups was performed by Mann-Whitney *U* test. Correlations between pairs of variables were calculated by Spearman's rank test. Significance level was considered as  $P \leq .05$ . Statistical analysis was performed using IBM SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 3. Results

Of the 500 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected during 2013 and 2015, 499 encoded carbapenemase genes. The most prevalent gene amplified was *bla<sub>KPC</sub>* ( $n = 397$ ), followed by *bla<sub>NDM</sub>* ( $n = 81$ ), *bla<sub>OXA-48</sub>* ( $n = 12$ ), and *bla<sub>IMP-1</sub>* ( $n = 3$ ). Other genes were identified in only 1 isolate each: *bla<sub>BKC-1</sub>*, *bla<sub>GES-1/6</sub>*, *bla<sub>GES-1</sub>*, *bla<sub>OXA-37/9</sub>*, and *bla<sub>VIM-1</sub>*. One isolate had 2 carbapenemase genes (*bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>NDM</sub>*).

The antimicrobial susceptibility of isolates is in Table 1. Based on EUCAST criteria, nonsusceptibility to colistin, tigecycline, meropenem, amikacin, and gentamicin was 33%, 24%, 97%, 50%, and 82%, respectively. Utilization of the CLSI/FDA criteria resulted in lower susceptibility rates for all antimicrobials, except for meropenem ( $P < .05$ ). Plazomicin MIC<sub>50/90</sub> was 0.5/264 mg/L.

Plazomicin had an MIC  $\leq 2$  mg/L for 84% of isolates and an MIC  $\leq 4$  mg/L for 87% of isolates. Among 435 isolates with plazomicin MICs  $\leq 4$  mg/L, 323 (74%) and 129 (30%) were nonsusceptible to gentamicin and amikacin, respectively. There were 158 (32%) isolates nonsusceptible to both gentamicin and amikacin, and in 99 (63%) of them, the MIC to plazomicin was less than 4 mg/L. All isolates that had plazomicin MICs  $\geq 8$  mg/L ( $n = 64$ ) were not susceptible to gentamicin. In addition, 59 of the 64 (99%) were also not susceptible to amikacin (Table 2). Furthermore, of the 499 samples analyzed, 36 (7.2%) were resistant to all antimicrobials tested (including KPC-, NDM-, OXA-48-, and VIM-1-producing strains), and plazomicin had an MIC  $\leq 2$  mg/L against 20 (55%) of the isolates. (See Table 3.)

## 4. Discussion

The prevalence of CPE has expanded globally since 2000. The most common mechanism of carbapenem resistance is the production of KPC enzymes, which are most prevalent in *K. pneumoniae* isolates. NDM and OXA-48 carbapenemases are reported but are less prevalent

**Table 1**  
Activity of plazomicin, meropenem, colistin, tigecycline, gentamicin, and amikacin against 499 CPE isolates from 50 Brazilian hospitals (2013–2015).

Antimicrobial agent no. of isolates	MIC (mg/L)			CLSI %S–%NS	EUCAST %S–%NS	P value <sup>c</sup>
	50%	90%	Range			
Plazomicin (499)	0.5	64	$\leq 0.125$ – $>64$	–	–	–
Meropenem (499)	128	256	$\leq 0.5$ – $>256$	1–99	3–97	.0394
Colistin (474) <sup>a</sup>	0.5	64	$\leq 0.125$ – $>64$	–	67–33	–
Tigecycline (487) <sup>a</sup>	0.5	2	$\leq 0.03$ –16	95–5 <sup>b</sup>	76–24	<.0001
Gentamicin (499)	64	>64	0.25– $>64$	22–78	19–81	.1777
Amikacin (499)	16	>512	$\leq 1$ – $>512$	62–38	49–51	.0008

S = susceptible; NS = not susceptible.

<sup>a</sup> Due to intrinsic resistance or poor activity, colistin was not evaluated against *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* species, or *M. morganii* and tigecycline against *Proteus*, *Providencia* species, and *M. morganii*.

<sup>b</sup> FDA breakpoints were used for tigecycline.

<sup>c</sup> P value denotes difference between susceptibility profile by EUCAST and CLSI/FDA for the different drugs tested.

**Table 2**  
Plazomicin MIC distribution among isolates according gentamicin and amikacin susceptibility.

Aminoglycosides	Plazomicin MIC (mg/L)									
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥64
Gentamicin S (n = 112)	8	28	33	20	18	5	0	0	0	0
Cumulative percentage	7%	32%	62%	79%	96%	100%	100%	100%	100%	100%
Gentamicin NS (n = 387)	45	111	95	44	23	5	4	0	0	60
Cumulative percentage	12%	40%	65%	76%	82%	83%	84%	84%	84%	100%
Amikacin S (n = 311)	30	110	98	41	22	5	4	0	0	1
Cumulative percentage	10%	45%	77%	90%	97%	98%	100%	100%	100%	100%
Amikacin NS (n = 188)	23	29	30	23	19	5	0	0	0	59
Cumulative percentage	12%	28%	44%	56%	66%	69%	69%	69%	69%	100%
Gentamicin NS/amikacin NS (n = 158)	19	21	20	19	16	4	0	0	0	59
Cumulative percentage	12%	25%	38%	50%	60%	63%	63%	63%	63%	100%
Gentamicin NS/amikacin S (n = 229)	26	90	75	25	7	1	4	0	0	1
Cumulative percentage	11%	51%	83%	94%	97%	98%	100%	100%	100%	100%
Gentamicin S/amikacin NS (n = 30)	4	8	10	4	3	1	0	0	0	0
Cumulative percentage	13%	40%	73%	87%	97%	100%	100%	100%	100%	100%
Gentamicin S/amikacin S (n = 82)	4	20	23	16	15	4	0	0	0	0
Cumulative percentage	5%	29%	57%	77%	95%	100%	100%	100%	100%	100%

than KPC (van Duin and Bonomo, 2016). The mortality rate from invasive CPE infections reaches up to 40%, and the pathogens causing these infections are almost always resistant to all  $\beta$ -lactams including carbapenems and many other classes (Doi and Paterson, 2015; Falagas et al., 2014; Lee et al., 2016).

In Brazil, *Enterobacteriaceae* are important nosocomial pathogens in many medical centers throughout the country (Arend et al., 2015; Toledo et al., 2012). KPC-producing *K. pneumoniae* has been the primary CPE reported in Brazil and, in this study, composed 328 of 397 KPC-producing isolates. We also found 81 NDM-producing *Enterobacteriaceae*, which included 34 *Klebsiella* spp. and 32 *Enterobacter* spp. isolates. Notably, the first report of NDM in Brazil was in 2013, and now, although this enzyme has been reported in different states of our country, it is still not widely disseminated (Sampaio et al., 2014).

Aminoglycosides are one of the most commonly used classes of antimicrobials for the treatment of infections, including those caused by CPE, either as monotherapy or in combination therapy with other classes of antimicrobials (Kontopidou et al., 2014). In our study, there were 99 (20%) isolates nonsusceptible to both gentamicin and amikacin with the MIC to plazomicin less than 4 mg/L, indicating that plazomicin would be a therapeutic option in cases of gentamicin/amikacin-

resistant enterobacterial infections. In addition, when applying CLSI or EUCAST criteria, isolates were nonsusceptible to amikacin in 38% and 51%, respectively. Due to the different criteria established by EUCAST and by CLSI for amikacin in particular, the susceptibility profile for this aminoglycoside should be interpreted with caution because there was a statistically significant difference between the interpretation when assessed using the different criteria ( $P = .0008$ ). In addition, Miro et al. (2013) found a discrepancy between the presence of resistance genes (aminoglycoside-modifying enzymes [AMEs]) for amikacin and phenotypic expression determined by the breakpoints established by CLSI (Miro et al., 2013).

Tigecycline has been used for the treatment of CPE. In the present study, tigecycline had good activity ( $MIC_{50,90} = 0.5/2$  mg/L) against the isolates overall, but there was still a high percentage of resistant isolates (24% according to EUCAST) as has been observed in other studies (van Duin et al., 2014).

There was a high percentage of colistin nonsusceptibility (33%) against the isolates in this study, excluding isolates with intrinsic resistance. The rate of resistance to the polymyxins has increased, and it is of note to recall that the use of polymyxins was restricted until the appearance of CPE in 2001 (Yigit et al., 2001). Colistin has been associated with

**Table 3**  
Plazomicin MIC distribution in relation to the carbapenemase type produced by the isolates.

Carbapenemase	Plazomicin MIC (mg/L)										
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
KPC-2	30	123	111	48	29	6				9	41
Cumulative percentage	8%	39%	66%	77%	85%	86%	86%	86%	86%	89%	100%
NDM-1	20	13	11	11	9	3	4			7	1
Cumulative percentage	25%	41%	54%	69%	80%	84%	90%	90%	90%	99%	100%
BRC-1	1										
Cumulative percentage	100%										
GES-16						1					
Cumulative percentage	0%	0%	0%	0%	0%	100%					
GES-5		1									
Cumulative percentage	0%	100%									
IMP-1		1	1		1						
Cumulative percentage	0%	33%	67%	67%	100%	100%	100%				
NDM-1 + KPC-2											1
Cumulative percentage	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
OXA-370			1								
Cumulative percentage	0%	0%	100%								
OXA-48	2	1	1	5	2						1
Cumulative percentage	17%	25%	33%	75%	92%	92%	92%	92%	92%	92%	100%
VIM-1			1								
Cumulative percentage	0%	0%	100%								
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>139</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>41</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>44</b>
<b>Cumulative percentage</b>	<b>11%</b>	<b>38%</b>	<b>64%</b>	<b>77%</b>	<b>85%</b>	<b>87%</b>	<b>88%</b>	<b>88%</b>	<b>88%</b>	<b>91%</b>	<b>100%</b>

a high incidence of acute kidney injury in retrospective and prospective cohort studies (Kwon et al., 2015; Rigatto et al., 2016; Tuon et al., 2014, 2016).

New and alternative agents are urgently needed to combat these pathogens. Plazomicin (previously ACHN-490) is a next-generation aminoglycoside derived from sisomicin and contains structural modifications that allow it to retain activity in the presence of common aminoglycoside resistance mechanisms (Aggen et al., 2010). Recent clinical trials showed the safety and efficacy of plazomicin (Cloutier et al., 2017; Connolly et al., 2017). Previous publications have suggested that plazomicin may have the potential to treat serious infections (Falagas et al., 2016; Garcia-Salguero et al., 2015; Karaiskos et al., 2015; Syue et al., 2016).

Against a large contemporary collection of *Enterobacteriaceae* from 50 representative hospitals in Brazil, plazomicin activity was more potent than that of the comparator aminoglycosides gentamicin and amikacin. Our findings are consistent with previous studies that showed plazomicin to be highly active against MDR clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, including KPC- and ESBL-producing isolates (Galani et al., 2012; Walky et al., 2014).

The activity of plazomicin is retained in the presence of most AMEs, which are typically encoded on plasmids and are the most common mechanism of aminoglycoside resistance in *Enterobacteriaceae* (Galani et al., 2012; Walky et al., 2014). An exception is AAC(2)-I, a chromosomally encoded AME that renders some *P. stuartii* resistant to plazomicin, as well as to other aminoglycosides (Armstrong and Miller, 2010). To date, the primary mechanism of plazomicin resistance is expression of acquired 16S rRNA methyltransferases, reported to be associated with NDM carbapenemases (Bercot et al., 2011; Hidalgo et al., 2013; Rasheed et al., 2013), and thus, aminoglycosides are not considered therapeutic options for this group of bacteria (Livermore et al., 2011).

Interestingly, our findings showed 69 NDM-producing *Enterobacteriaceae* with MICs  $\leq 4$  mg/L to plazomicin. An explanation for these results could be related to the genetic element involved in the transmission of the *bla*<sub>NDM</sub> genes. The predominant plasmid type responsible for spreading *bla*<sub>NDM-1</sub> is the IncA/C type plasmids, and many IncA/C plasmids with *bla*<sub>NDM</sub> also carry various antibiotic resistance genes, including 16S rRNA methyltransferases (Lee et al., 2016). However, studies involving NDM-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil demonstrated a novel transposon named Tn3000 into IncFIK and IncX3 plasmids involved in *bla*<sub>NDM</sub> gene transmission (Campos et al., 2015). Clonal dissemination may also be responsible or contribute to this phenomenon. In these studies, aminoglycoside susceptibility was variable, suggesting that the mechanism of resistance was due to the presence of AMEs rather than 16S rRNA methyltransferase.

## 5. Conclusions

In conclusion, plazomicin was active against most of the CPE tested in this study, with 87% of the isolates being inhibited by an MIC  $\leq 4$  mg/L. The other therapeutic options typically used to treat infections caused by CPE were also evaluated in this study, and isolates were variably resistant to these antimicrobials. Isolates were most susceptible to tigecycline, but this drug has restricted bioavailability. Therefore, based on these data, plazomicin is a promising drug in antimicrobial therapy for multidrug resistant CPE, including NDM-1 producers. However, future molecular studies are suggested to determine the resistance mechanisms that contribute to high plazomicin MICs.

## Transparency Declaration

This study was supported by Achaogen. Felipe Tuon is a CNPQ researcher.

## References

- Aggen JB, Armstrong ES, Goldblum AA, Dozzo P, Linsell MS, Gledit MJ, et al. Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11):4636–42.
- Arend IN, 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.
- Armstrong ES, Miller GH. Combating evolution with intelligent design: the neoglycoside ACHN-490. *Curr Opin Microbiol* 2010;13(5):565–73.
- Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71(4):442–5.
- Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, Barros EM, Pereira Mde O, Seco BM, et al. Characterization of Tn3000, a transposon responsible for bla<sub>NDM-1</sub> dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(12):7387–95.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement, 2017.
- Clinical Laboratory Standard Institute. - M07 - A10 - Methods for Diffusion Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 2015.
- Cloutier DJ, Miller LG, Komarenko AS, Cehnuk DS, Krause DM, Keepers TR, et al. Plazomicin versus mepipenem for the treatment of complicated urinary tract infection and acute pyelonephritis: results of the EPIC study. *ECCMID, ESCMID; Vienna*, 2017.
- Connolly LE, Jubb AM, O'Keefe B, Serio AW, Smith A, Gall J, et al. Plazomicin is associated with improved survival and safety compared with Colistin in the treatment of serious infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: results of the CARE study. *ECCMID, ESCMID; Vienna*, 2017.
- Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36(1):74–84.
- EUCAST. Clinical breakpoint. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing; 2017. [Version 7.1].
- Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis* 2014;20(7):1170–5.
- Falagas ME, Mavroudis AD, Vardakas KZ. The antibiotic pipeline for multi-drug resistant gram negative bacteria: what can we expect? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14(8):747–63.
- FDA. Drug safety communication—increased risk of death with Tygactil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. Washington, DC: FDA; 2010.
- Galani I, Souli M, Dakis GL, Chrysouli Z, Poulakou G, Psichogiou M, et al. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, and Enterobacter spp. from Athens, Greece. *J Chemother* 2012; 24(4):191–4.
- Garcia-Salguero C, Rodriguez-Avil I, Picazo JJ, Culebras E. Can plazomicin alone or in combination be a therapeutic option against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii? *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(10):5959–66.
- Haider G, Alkroub A, Cheng S, Churilla TM, Churilla BM, Shields RK, et al. Association between the Presence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and In Vitro Activity of Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, and Plazomicin against Klebsiella pneumoniae Carbapenemase- and Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacter Species. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(9):5208–14.
- Hidalgo I, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(7):1543–50.
- Karaiskos I, Souli M, Giamareliou H. Plazomicin: an investigational therapy for the treatment of urinary tract infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2015;24(11):1501–11.
- Kontopidou F, Giamareliou H, Katerelos P, Maragos A, Kikumis I, Trilka-Graphakos E, et al. Infections caused by carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(2):O117–23.
- Kwon KH, Oh JY, Yoon YS, Jeong YJ, Kim KS, Shin SJ, et al. Colistin treatment in carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii pneumonia patients: incidence of nephrotoxicity and outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45(6):605–9.
- Lee YC, Hsiao CY, Hung MC, Hung SC, Wang HP, Huang YJ, et al. Bacteremic urinary tract infection caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae are associated with severe sepsis at admission: implication for empirical therapy. *Medicine* 2016;95(20): e3694.
- Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(1):48–53.
- Martins WM, Nicoletti AG, Santos SR, Sampaio JL, Gales AC. Frequency of BKC-1-producing Klebsiella species isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(8): 5044–6.
- Miro E, Granbaum F, Gomez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist* 2013; 19(2):94–9.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(4):906–9.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9(4):228–36.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011;17(10):1791–8.

- Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(6):870–8.
- Rigatto MH, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Levin AS, Carnilho CM, Tanita MT, et al. Multicenter prospective cohort study of renal failure in patients treated with colistin versus polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(4):2443–9.
- Rodríguez-Avilal I, Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avilal C, Colebras E. In vitro activity of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomicin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46(6):616–21.
- Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol* 2016;47(Suppl. 1): 31–7.
- Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D beta-lactamase, in Enterobacter hormaechei from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(6):3566–7.
- Syue LS, Chen YH, Ko WC, Hsueh PR. New drugs for the treatment of complicated intra-abdominal infections in the era of increasing antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47(4):250–8.
- Toledo PV, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Lahm KR. Working Group in Healthcare Associated I. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect* 2012;80(4):351–3.
- Tuon FF, Rigatto MH, Lopes CK, Kamel IK, Rocha JL, Zavascki AP. Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin B or colistin methanesulfonate sodium. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43(4):349–52.
- Tuon FF, Aragão 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.
- van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: second-generation beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Clin Infect Dis* 2016; 63(2):234–41.
- van Duin D, Perez F, Rudin SD, Cober E, Hanrahan J, Ziegler J, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(7):4035–41.
- Walkty A, Adam H, Baxter M, Denisuk A, Lagace-Wiens P, Karlowsky JA, et al. In vitro activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011–2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(5):2554–63.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4):1151–61.
- Zhang Y, Kashikar A, Bush K. In vitro activity of plazomicin against  $\beta$ -lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(10):2792–5.

## 2.5.2 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](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)



### Technical Note

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



Larissa Bail<sup>a,b</sup>, Carmen Antonia Sanches Ito<sup>a,b</sup>, Lavinia Nery Villa Stangler Arend<sup>b,c</sup>,  
Marcelo Pilonetto<sup>c</sup>, Keite da Silva Nogueira<sup>d,e</sup>, Felipe Francisco Tuon<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Microbiology, Universidade Estadual de Ponta Grossa do Paraná, Ponta Grossa, PR, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Central do Estado do Paraná - LACEN, Sao Jose dos Pinhais, PR, Brazil

<sup>d</sup> Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>e</sup> 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  $\geq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $n = 67$ ) 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<sub>KPC-2</sub>* and 1 *bla<sub>OXA-48</sub>* 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, Sao 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  $\geq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 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  $\geq 64$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , gentamicin MIC  $> 64$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  and amikacin MIC ranged from 256 to  $\geq 512$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Those isolates with plazomicin MIC = 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and MIC = 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  demonstrated sensibility to at least one of the aminoglycosides

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

**Table 1**  
Characteristics of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE).

Isolate <sup>a</sup>	Patient specimen	Species	Carbapenemase	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup>			
				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	$\leq 1$	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 <sup>c</sup>	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

<sup>a</sup> Letters indicate the State of Brazil: RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; PR, Paraná; SP, São Paulo.

<sup>b</sup> Abbreviations: PLZ = plazomicin; AMK = amikacin; GEN = gentamicin; MEM = meropenem; NA = not available.

<sup>c</sup> 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 ( $\mu\text{g/mL}$ )						Total
		4	8	16	32	64	>64	
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> (41)</b>								
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
<b><i>Enterobacter cloacae</i> (8)</b>								
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
<b><i>Escherichia coli</i> (5)</b>								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						2	2
NDM-1	<i>armA</i>					1		1
KPC-2	-	2						2
<b><i>Morganella morganii</i> (4)</b>								
NDM-1	<i>armA</i>					2		2
NDM-1	-		1					1
KPC-2	-	1						1
<b><i>Klebsiella aerogenes</i> (3)</b>								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						3	3
<b><i>Providencia stuartii</i> (2)</b>								
KPC-2	<i>rmtB1</i>						2	2
<b><i>Serratia marcescens</i> (2)</b>								
GES-16	-	1						1
KPC-2	<i>rmtD2</i>						1	1
<b><i>Providencia rettgeri</i> (1)</b>								
NDM-1	-		1					1
<b><i>Proteus mirabilis</i> (1)</b>								
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  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  ( $n = 54/80.6\%$ ) and all of them harbored only one type of 16S-RMTases gene. No sample with plazomicin MIC  $\leq 64 \mu\text{g/mL}$  ( $n = 13$ ) 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<sub>KPC-2</sub>* and one *Enterobacter cloacae bla<sub>OXA-48</sub>* 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<sub>NDM-1</sub>* positive and one *Enterobacter cloacae* co-harboring *bla<sub>KPC-2</sub>* and *bla<sub>NDM-1</sub>* 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<sub>NDM-1</sub>* (592/712; 83.1%) and *bla<sub>OXA-48-like</sub>* (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<sub>NDM-1</sub>* were predominant (Wangkheimayum et al., 2017).

In our study, *bla<sub>KPC-2</sub>* 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<sub>KPC-2</sub>* 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<sub>KPC-2</sub>* and *bla<sub>CTX-M-15</sub>* 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, FIS, 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 LL, 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 Clin 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 JI, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:523–37.
- Fritsche 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.
- Wangkheimayum 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.

## **CAPÍTULO 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM E IMPENEM-RELEBACTAM EM *ENTEROBACTERALES* PRODUTORES DE KPC**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

Antimicrobianos beta-lactâmicos são considerados os agentes mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções bacterianas devido às suas propriedades farmacológicas, principalmente a baixa toxicidade. Representam cerca de 60% de todos os antimicrobianos usados como terapia e prevenção de doenças infecciosas na medicina, agricultura e pecuária (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2020). No entanto, sua eficácia clínica foi afetada com a evolução dos microrganismos, que adquiriram diversos mecanismos de resistência para sua sobrevivência (NOVAL et al., 2020).

O aumento crescente nos casos de resistência antimicrobiana em *Enterobacterales* em todo o mundo nas últimas três décadas deve-se principalmente à produção de enzimas capazes de inativar os antimicrobianos beta-lactâmicos, as chamadas beta-lactamases. Essas enzimas espalharam-se rapidamente, principalmente através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, presentes nas bactérias (LYNCH; CLARK; ZHANEL, 2021; NOVAL et al., 2020).

Os primeiros inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) surgiram nesse contexto para impedir a degradação do antimicrobiano beta-lactâmico a eles associados (PAPP-WALLACE et al., 2020). A descoberta e posterior comercialização desses três inibidores foi uma grande evolução para a terapia antimicrobiana; porém, a especificidade no espectro de inibição (não inibem as carbapenemases de classe A e pouca inibição das enzimas de classe C) e o aparecimento e disseminação de novas beta-lactamases, particularmente das classes B e D, gerou a necessidade pela busca de novos inibidores (VÁZQUEZ-UCHA et al., 2020).

Avibactam e relebactam são os primeiros inibidores de beta-lactamases não beta-lactâmicos e fazem parte da classe diazabicyclooctanos (DBOs). São capazes de sofrer desacilação da enzima à qual se ligaram sem serem modificados e, conseqüentemente, inibir outra molécula de beta-lactamase

(PAPP-WALLACE et al., 2020). Embora possuam atividade muito semelhante contra beta-lactamases de classe A e C e inativos contra metalo-beta-lactamases (classe B), relebactam tem pouca ou nenhuma atividade contra as enzimas de classe D (MATESANZ, 2021; TOMPKINS; DUIN, 2021).

O objetivo do presente estudo é avaliar a atividade da ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam contra *Enterobacterales* produtores de KPC, a carbapenemase mais prevalente no Brasil.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Isolados

Um total de 299 *Enterobacterales* produtores de KPC previamente identificadas (163 *Klebsiella* spp.; 51 *Serratia* spp.; 38 *Enterobacter* spp.; 22 *Escherichia coli*; 12 *Citrobacter* spp.; 7 *Morganella morgannii*; 3 *Proteus* spp.; 2 *Salmonella* spp.; 1 *Providencia* spp.) foram selecionados de diferentes hospitais localizados em seis estados brasileiros (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul) entre janeiro de 2013 e setembro de 2020. *Morganella morgannii*; *Proteus* spp. e *Providencia* spp. foram incluídas na tribo *Proteeae* (JANDA; ABBOTT, 2021). Todas as amostras foram isoladas de material clínico e apenas um isolado por paciente foi selecionado.

### 3.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM para ceftazidima, ceftazidima-avibactam (CAZ/AVI), imipenem, imipenem-relebactam (IMI/REL), cefepima, meropenem, amicacina, gentamicina, sulfato de colistina e ciprofloxacino foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (MDC) conforme o documento do CLSI (2015). Todos os antimicrobianos foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MI), avibactam pela Pfizer, Inc. (Peapack, NJ) e relebactam pela Merck and Co., Inc. (Kenilworth, NJ). A concentração de avibactam e relebactam manteve-se constante (4 mg/L). Os isolados e cepas controle (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 e *Klebsiella pneumoniae*

ATCC 700603) foram testados em triplicata. Todos os dados foram interpretados de acordo com os pontos de corte do CLSI e EUCAST. Para a tribo *Proteeae*, a CIM foi determinada para todos os antimicrobianos, porém, a taxa de sensibilidade foi excluída do cálculo para o IMI/REL devido à ausência de pontos de corte para esses microrganismos. Para a análise do perfil de sensibilidade à colistina, a tribo *Proteeae* e *Serratia marcescens* foram excluídas devido à resistência intrínseca por eles apresentada.

### 3.2.3 Detecção de metalo-beta-lactamases e OXA-48-like em amostras resistentes ao CAZ/AVI e IMI/REL

A detecção de metalo-beta-lactamases (NDM, VIM, IMP) e OXA-48-like foi realizada pelo teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5 (NG Biotech, Guipry, France) para as amostras resistentes ao CAZ/AVI (CIM  $\geq$  16 mg/L) ou resistentes ao IMI/REL (CIM  $\geq$  2 mg/L), segundo instruções do fabricante. Resultados positivos foram confirmados por PCR para o gene de carbapenemase detectado (BRADFORD et al., 2004; ELLINGTON et al., 2007; POIREL et al., 2004). Os controles utilizados foram *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (KPC-2 positiva), *K. pneumoniae* NCTC 13443 (NDM-1 positiva) e *K. pneumoniae* NCTC 13442 (OXA-48 positiva).

### 3.2.4 Análise estatística

A comparação das CIMs para cada antimicrobiano entre as diretrizes do CLSI e EUCAST foi realizada pelo teste Qui-quadrado entre isolados sensíveis e não sensíveis. O nível de significância considerado foi  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi realizada usando IBM SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inclusão de beta-lactâmicos associados a novos inibidores de beta-lactamases no arsenal terapêutico contra EPCs tem sido avaliada em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (HEO, 2021; KARAIKOS et al., 2019b, 2021; KULENGOWSKI; BURGESS, 2019; POWLES et al., 2018). Os resultados

mostram-se favoráveis, além de serem menos tóxicos do que outros agentes comumente utilizados, como colistina e aminoglicosídeos.

Em nosso estudo, CAZ/AVI exibiu a maior taxa de sensibilidade geral (98%). Na América Latina, um estudo que avaliou as taxas de sensibilidade ao CAZ/AVI em isolados de EPCs entre 2015 e 2017 demonstrou a mesma taxa de sensibilidade encontrada em nosso estudo, tanto no Brasil quanto na Argentina. Na Colômbia, a sensibilidade foi de 91,8%, seguida pela Venezuela (70,8%) e uma redução substancial foi observada no México (18,8%) (STONE; PONCE-DE-LEON, 2020). Em outro estudo com 396 isolados clínicos de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia e México coletados entre janeiro de 2016 e outubro de 2017, CAZ/AVI foi ativo contra 77,5% dos isolados ( $CIM_{50} = 2$  mg/L,  $CIM_{90} \geq 128$  mg/L), sendo superior ou igual à da tigeciclina (APPEL et al., 2020). O perfil de sensibilidade e a  $CIM_{50/90}$  para todos os antimicrobianos testados estão representados na Tabela 3.1.

Em ambos os estudos da América Latina descritos anteriormente, as diferenças na sensibilidade ao CAZ/AVI podem ser explicadas por áreas geográficas e hospitais distintos incluídos no estudo e mudanças na epidemiologia dos mecanismos de resistência entre os períodos analisados. Um aumento no número de beta-lactamases de classe B, na qual CAZ/AVI não tem ação, ou o surgimento de diferentes mecanismos de resistência em *K. pneumoniae* produtor de KPC, são cada vez mais frequentes. Tal fato ressalta a importância de identificar e diferenciar o tipo de carbapenemase antes de escolher CAZ/AVI como agente terapêutico.

Um estudo realizado na Grécia entre janeiro de 2018 e março 2019 avaliou a eficácia terapêutica de CAZ/AVI em pacientes com bacteremia causada por *K. pneumoniae* produtor de KPC em comparação com uma coorte pareada de pacientes tratados com agentes antimicrobianos mais antigos. A menor mortalidade foi observada em pacientes tratados em monoterapia com aminoglicosídeos (1/6, 16,7%) ou CAZ/AVI (13/71, 18,3%). Regime de tratamento contendo CAZ/AVI foi o único preditor independente de sobrevida (KARAIKOS et al., 2021). Amicacina e gentamicina, aminoglicosídeos avaliados em nosso estudo, apresentaram altas taxas de resistência para *K.*

*pneumoniae* segundo o EUCAST (48% e 66%, respectivamente) e não representariam uma opção terapêutica para esses isolados.

Entre as EPCs, mais de 90% produzem ao menos um tipo de enzima modificadora de aminoglicosídeos (EMA), principal mecanismo de resistência dessa classe de antimicrobianos (ALMAGHRABI et al., 2014). Essa característica explica as altas taxas de resistência e a grande diversidade no perfil de sensibilidade entre *Enterobacterales*. Considerando todas as amostras avaliadas em nosso estudo, amicacina e gentamicina apresentaram 41% e 59% de resistência, respectivamente, segundo as diretrizes do EUCAST. Não houve diferença estatística significativa quando os pontos de corte do CLSI foram utilizados (amicacina:  $p=0,0618$ ; gentamicina:  $p=0,5629$ ).

O tratamento com CAZ/AVI foi avaliado em um estudo com 29 pacientes com infecções causadas por *Enterobacterales* produtores de KPC-2 e resistentes às polimixinas em três hospitais brasileiros, entre agosto de 2016 e maio de 2018. Terapia combinada com tigeciclina, polimixina, meropenem, amicacina, gentamicina ou fosfomicina foi utilizada em 14 (48,3%) pacientes. A cura clínica foi observada em 24 (82,7%) pacientes e a resposta microbiológica foi avaliada apenas nas infecções de corrente sanguínea (12 pacientes) e todos evoluíram para a cura microbiológica. CAZ/AVI mostrou ser uma opção para o tratamento de infecções graves causadas por *Enterobacterales* KPC-positivas de difícil manejo (GUIMARÃES et al., 2019). Em nosso estudo, das 299 amostras avaliadas, 49% ( $n=146$ ) mostraram-se resistentes à colistina, seja por mecanismo intrínseco ou adquirido, e CAZ/AVI seria uma opção terapêutica para 97% ( $n=142$ ) desses isolados.

A elevada taxa de resistência à colistina detectada em nosso trabalho é um dado que chama a atenção e reflete a preocupação já existente descrita em um estudo realizado na cidade de São Paulo. Foi observado um aumento anual alarmante na taxa de resistência à polimixina B entre isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2, que passou de 0% em 2011 para 27,1% em 2015 (BARTOLLETTI et al., 2016). Além disso, outros estudos concluíram que a resistência à colistina aumentou as taxas de mortalidade de pacientes com bacteremia causada por ERCs (BALKAN et al., 2021; HAKEAM et al., 2021). Considerando apenas as amostras resistentes à polimixina em nosso trabalho, CAZ/AVI seria uma opção terapêutica para 97% dos isolados.

Tabela 3.1 – Atividade e perfil de sensibilidade de CAZ/AVI, IMI/REL e agentes comparadores contra *Enterobacterales* produtores de KPC, segundo as diretrizes do CLSI e EUCAST.

<i>Enterobacterales</i>		CIM (mg/L)									
		MER	IMI	IMIREL	CAZ	CAZAVI	CPM	GEN	AMI	COL <sup>a</sup>	CIP
<i>Klebsiella</i> spp. (163)	CIM <sub>50</sub>	32	32	0.25	64	0,25	64	64	8	0.5	>32
	CIM <sub>90</sub>	>128	128	1	>128	2	>256	>128	>256	>16	>32
	S (%) CLSI	1	0	92	2	99	4	37	63	NA	8
	S (%) EUCAST	4	1	98	1	99	1	34	52	57	8
<i>Serratia marcescens</i> (51)	CIM <sub>50</sub>	128	64	0.5	16	1	32	2	8	>16	2
	CIM <sub>90</sub>	>128	128	2	128	2	256	>128	>256	>16	>32
	S (%) CLSI	0	0	84	4	96	0	55	59	NA	37
	S (%) EUCAST	0	0	92	0	96	0	51	53	0	37
<i>Enterobacter</i> spp. (38)	CIM <sub>50</sub>	8	16	0.5	128	1	64	32	4	0.25	8
	CIM <sub>90</sub>	32	32	1	>128	4	>256	128	64	>16	>32
	S (%) CLSI	5	0	97	0	100	0	32	76	NA	5
	S (%) EUCAST	16	0	100	0	100	0	29	71	76	5
<i>Escherichia coli</i> (22)	CIM <sub>50</sub>	4	4	0.5	16	0,25	8	0.5	2	0.125	32
	CIM <sub>90</sub>	64	32	0,5	128	0,5	64	128	8	4	>32
	S (%) CLSI	41	0	100	23	100	23	68	91	NA	32
	S (%) EUCAST	45	0	100	0	100	4	68	91	86	32
<i>Proteeae</i> (11)	CIM <sub>50</sub>	0,5	32	0.5	4	0,125	64	2	2	>16	0,25
	CIM <sub>90</sub>	8	32	8	32	0,25	128	32	>256	>16	>32
	S (%) CLSI	64	0	NA	64	100	64	73	82	NA	54

*Continua*

Continuação

<i>Enterobacteriales</i>	CIM (mg/L)										
	MER	IMI	IMIREL	CAZ	CAZAVI	CPM	GEN	AMI	COL <sup>a</sup>	CIP	
<i>Citrobacter</i> spp. (12)	S (%) EUCAST	64	0	NA	36	100	36	73	73	0	54
	CIM <sub>50</sub>	8	8	0,5	128	0,5	64	0,5	4	0,25	16
	CIM <sub>90</sub>	32	32	8	>128	>32	128	>128	>256	2	>32
<i>Salmonella</i> spp. (2)	S (%) CLSI	25	0	75	8	83	8	58	83	NA	33
	S (%) EUCAST	33	0	83	0	83	0	58	83	92	33
	CIM <sub>50</sub>	≤0,25	4	0.25	16	0,25	8	1	2	0.125	≤0.06
	CIM <sub>90</sub>	1	4	0.25	128	0,25	16	>128	64	4	0.125
	S (%) CLSI	100	0	100	0	100	0	50	50	NA	100
<b>Total (299)</b>	<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>0.5</b>	<b>64</b>	<b>0,5</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>&gt;32</b>
	<b>CIM<sub>90</sub></b>	<b>&gt;128</b>	<b>128</b>	<b>2</b>	<b>&gt;128</b>	<b>2</b>	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;32</b>
	<b>S (%) CLSI</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>91<sup>b</sup></b>	<b>6</b>	<b>98</b>	<b>6</b>	<b>44</b>	<b>67</b>	<b>NA</b>	<b>17</b>
	<b>S (%) EUCAST</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>97<sup>b</sup></b>	<b>2</b>	<b>98</b>	<b>2</b>	<b>41</b>	<b>59</b>	<b>51</b>	<b>17</b>

Fonte – A autora.

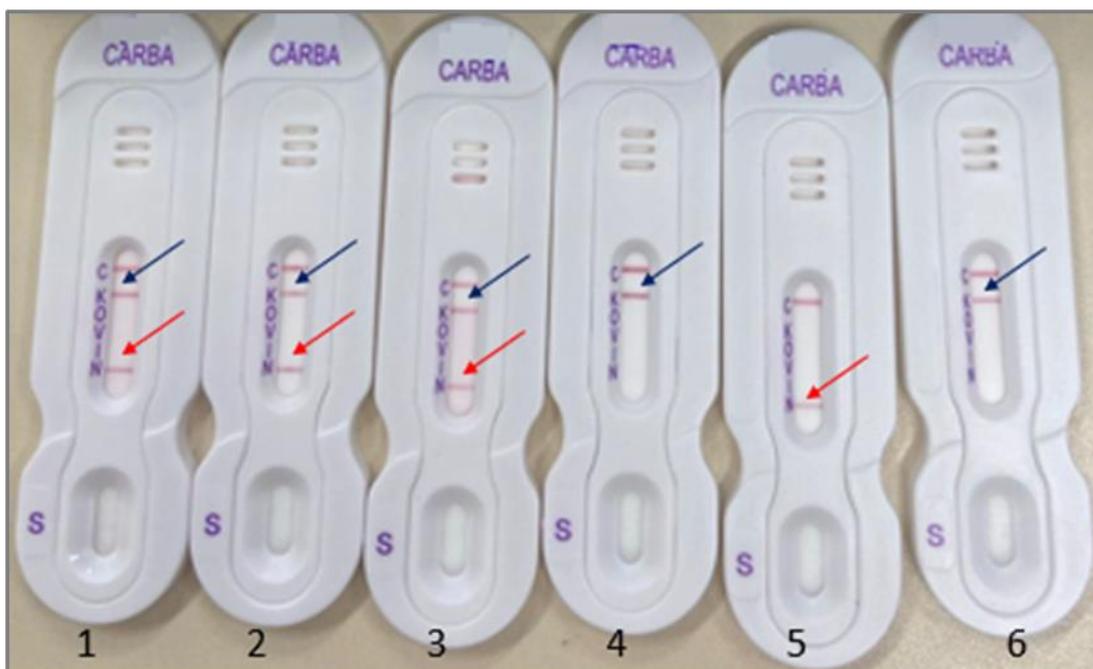
Legenda – NA: não avaliado. S: sensibilidade. <sup>a</sup> O perfil de sensibilidade à colistina não foi avaliado pelo CLSI devido à ausência de ponto de corte para sensibilidade. <sup>b</sup> A tribo *Proteeae* foi excluída da análise do perfil de sensibilidade ao IMI/REL pelo CLSI e EUCAST.

Além da eficácia clínica, CAZ/AVI parece desempenhar um papel importante na descolonização intestinal, podendo reduzir a taxa de seleção de resistência e o desenvolvimento de infecções sistêmicas. Um estudo observacional, retrospectivo e multicêntrico avaliou a descolonização intestinal como um efeito secundário da terapia antimicrobiana com CAZ/AVI em 36 pacientes internados em hospitais da Itália. Entre os 12 pacientes do grupo tratado com CAZ/AVI, 11 (91,7%) foram descolonizados e nenhum dos 24 pacientes do grupo controle foi descolonizado (BASSETTI et al., 2019b).

A produção de MBLs é considerada o mecanismo mais comum de resistência ao CAZ/AVI (DOI, 2019). Cinco amostras em nosso estudo (2 *C. freundii* CIM  $\geq$  32 mg/L, 1 *K. pneumoniae* CIM  $\geq$  32 mg/L, 1 *S. marcescens* CIM = 32 mg/L e 1 *S. marcescens* CIM = 16 mg/L) mostraram-se resistentes a esse antimicrobiano. A pesquisa de MBLs do tipo NDM, IMP e VIM foi realizada para essas 5 amostras através do teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5. Nas três amostras com CIM  $\geq$  32 mg/L (2 *C. freundii* e 1 *K. pneumoniae*), NDM estava associada com a produção de KPC (Figura 3.1). Os resultados foram confirmados por PCR simples para KPC e NDM e as duas amostras de *S. marcescens* foram positivas somente para KPC.

A associação de *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> está aumentando entre *Enterobacterales* e observada em vários estudos no Brasil (BES et al., 2021; FIRMO et al., 2020; QUILES et al., 2015). Esses resultados devem alertar laboratórios e autoridades médicas para estabelecer métodos rápidos de detecção, como é o caso de testes imunocromatográficos, para reduzir a disseminação desse fenótipo de resistência antimicrobiana e evitar a falha terapêutica. Em nosso estudo, o resultado do NG-Test CARBA 5 elucidou os altos níveis de resistência ao CAZ/AVI.

Figura 3.1 – Pesquisa de MBLs do tipo NDM, IMP e VIM para 5 amostras resistentes ao CAZ/AVI através do teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5.



Fonte – A autora.

Legenda – 1: *Citrobacter freundii* CIM  $\geq$  32 mg/L; 2: *Citrobacter freundii* CIM  $\geq$  32 mg/L; 3: *Klebsiella pneumoniae* CIM  $\geq$  32 mg/L; 4: *Serratia marcescens* CIM = 32 mg/L; 5: NCTC 13443, controle positivo para NDM; 6: *Serratia marcescens* CIM = 16 mg/L). As setas azuis indicam a presença de KPC e as setas vermelhas a presença de NDM.

Isolados resistentes ao CAZ/AVI por mutações na enzima KPC são geralmente observados após a exposição do microrganismo ao tratamento com o antimicrobiano. A resistência é provavelmente consequência da dosagem insuficiente de antimicrobiano em presença de uma alta carga bacteriana (MATESANZ, 2021). As duas amostras de *S. marcescens* resistentes ao CAZ/AVI do nosso estudo provavelmente não foram expostas ao antimicrobiano pois este foi aprovado em 2018 pela ANVISA e as amostras foram isoladas em 2016 e 2018.

Variantes de KPC-3 e KPC-2 não foram detectadas por testes imunocromatográficos em alguns estudos recentes (ANTINORI et al., 2020; CANO et al., 2020; GALANI et al., 2020). No entanto, resultados positivos foram encontrados por Mueller et al. (2019) para KPC-31 (variante de KPC-3) (MUELLER et al., 2019a). A detecção rápida de carbapenemases é essencial para o uso clínico do CAZ/AVI, porém, resultados falso-negativos entre

variantes de KPC podem causar falha terapêutica (MOREIRA; CAIERÃO, 2021). O sequenciamento de genoma completo pode identificar a presença de variantes nas duas amostras de *S. marcescens* resistentes ao CAZ/AVI do nosso estudo.

Outro mecanismo que poderia explicar a resistência de baixo nível ao CAZ/AVI (CIM = 16 mg/L e CIM = 32 mg/L) em *S. marcescens* é a superexpressão do gene *bla<sub>KPC</sub>*, resultando em um número aumentado da enzima (CUI et al., 2020). O sequenciamento de genoma completo poderia evidenciar esse mecanismo através da detecção de mutações na região promotora do gene/ou detecção de regiões duplicadas do gene no mesmo plasmídeo ou em plasmídeo e cromossomo.

Em nosso estudo, nenhum isolado apresentou CIM = 8 mg/L e 8 isolados apresentaram CIM = 4 mg/L para CAZ/AVI (4 *E. cloacae*, 2 *S. marcescens*, 1 *E. hormaechi* e 1 *K. pneumoniae*). Castanheira et al. (2020) testaram isolados de *Enterobacterales* produtores de KPC-2 e KPC-3 com CIM = 4 mg/L para CAZ/AVI na presença ou ausência de fenilalanina-arginil  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N), um inibidor de bomba de efluxo, e de nanopéptido de polimixina B (PMBN), capaz de aumentar a permeabilidade da membrana. PA $\beta$ N não diminuiu significativamente a CIM de CAZ/AVI; no entanto, a adição de PMBN demonstrou que a diminuição da permeabilidade de ceftazidima através de OmpK36 na célula poderia ser a causa dos resultados elevados de CIM de CAZ/AVI (CASTANHEIRA et al., 2020b).

Em outro estudo, a atividade antimicrobiana de CAZ/AVI contra *Enterobacterales* exibindo diferentes perfis de permeabilidade da membrana externa, especificamente presença ou ausência de porinas e expressão de bomba de efluxo, foi avaliada. As porinas OmpF e OmpC de *E. coli*, OmpK35 e OmpK36 de *K. pneumoniae* e Omp35 e Omp36 de *K. aerogenes* são vias de entrada do avibactam para o periplasma nessas espécies. No entanto, outros canais foram claramente acessíveis porque o avibactam exibiu atividade antibacteriana contra isolados sem essas proteínas. Os resultados obtidos também sugeriram uma relação entre o efeito antibacteriano moderado de avibactam e a osmolaridade (PAGÈS et al., 2016).

IMI/REL foi o segundo antimicrobiano mais sensível em nosso estudo, 96% segundo o EUCAST e 91% segundo o CLSI ( $p=0,0373$ ). A CIM<sub>50/90</sub> dos

isolados de *Enterobacterales* foi de 32/128 mg/L para imipenem e 0,5/2 mg/L para IMI/REL, com uma redução mediana de 6 vezes, variando de 2 a 7 vezes, dependendo da espécie. Em comparação com CAZ/AVI, IMI/REL apresentou melhor potência para *Serratia marcescens* e *Enterobacter* spp. e a mesma potência para *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. e *Salmonella* spp. A atividade do IMI/REL foi igual ou superior para todas as espécies, com exceção da tribo *Proteeeae*.

As amostras de *Morganella morgannii*, *Proteus* spp. e *Providencia stuartii* foram incluídas na tribo *Proteeeae* e mostraram redução na CIM<sub>50/90</sub> de imipenem após adição de relebactam. Embora os pontos de corte clínicos ainda não estejam estabelecidos para esse grupo, 8 de 11 isolados apresentaram CIM  $\leq$  4 mg/L para IMI/REL, valor que corresponde ao ponto de corte epidemiológico ou *Epidemiological cut-off value* (ECOFF) segundo o EUCAST (EUCAST, 2021). *C. freundii* foi a espécie que apresentou a menor sensibilidade (75% pelo CLSI e 83% pelo EUCAST). Entre as 146 amostras resistentes à colistina em nosso estudo, 123 (84%) tinham CIM  $\leq$  1 mg/L para IMI/REL, sendo uma alternativa para isolados difíceis de tratar.

A atividade do IMI/REL contra isolados de *Enterobacterales* não *Proteeeae* na Europa entre 2015 e 2017 foi avaliada no estudo SMART (LOB et al., 2020). Entre o grupo de amostras não sensíveis ao imipenem (n=474), a sensibilidade ao IMI/REL foi de 42,4%. Analisando apenas as amostras KPC positivas (n=138), a sensibilidade foi de 98,6%. Diferentemente da epidemiologia brasileira, os isolados europeus apresentam alta prevalência de MBL e/ou OXA-48-like (~60%), o que justifica a baixa sensibilidade ao IMI/REL no grupo não sensível ao imipenem. Em outros estudos que avaliaram amostras KPC positivas, a sensibilidade variou entre 88% e 100% (CANVER et al., 2019; GALANI et al., 2019a; GOMEZ-SIMMONDS et al., 2018; KULENGOWSKI; BURGESS, 2019).

Um estudo conduzido por Karlowsky et al. (2020) nos Estados Unidos entre 2015 e 2017 relatou que 66,4% dos 113 isolados não-*Proteeeae* não sensíveis ao imipenem isolados de infecções do trato respiratório inferior eram sensíveis ao IMI/REL (KARLOWSKY et al., 2020). Entre os 113 isolados, 74 foram molecularmente caracterizados e carbapenemases foram detectadas em 14 isolados (1,1% de todos os 1298 isolados de *Enterobacterales* não-

*Proteaeae*). Treze isolados carregavam KPC-2 ou KPC-3 e todos eram sensíveis ao IMI/REL; um isolado carregava uma carbapenemase GES-20 (não sensível ao IMI/REL). Esse grupo estudado era composto principalmente por *S. marcescens* (70,8%) sem carbapenemases adquiridas. Analisando apenas amostras de *S. marcescens* em nosso estudo, também observamos uma sensibilidade inferior ao IMI/REL (84% e 92%, segundo CLSI e EUCAST, respectivamente). A baixa sensibilidade desse grupo bacteriano ao IMI/REL poderia ser explicada pela expressão da enzima *S. marcescens* enzime (SME), uma carbapenemase que pode estar presente no cromossomo dessa espécie e que possui maior capacidade de hidrólise do imipenem (BIAGI et al., 2020; CAYÔ et al., 2017). Outros mecanismos que podem explicar a resistência ao IMI/REL em *S. marcescens* são alterações na permeabilidade da membrana celular atribuídas a mutações em porinas e associados a mecanismos alternativos espécie-específicos de resistência (GOMEZ-SIMMONDS et al., 2018).

Um estudo realizado na Grécia avaliou a epidemiologia e o perfil de sensibilidade de *K. pneumoniae* produtor de carbapenemases isolados entre 2017 e 2020. Enquanto CAZ/AVI foi capaz de inibir todos os isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e OXA-48, IMI/REL inibiu 98,5% dos isolados produtores de KPC e nenhum isolado de OXA-48 (MARAKI et al., 2022). Canver et al. (2019) também não obtiveram resultados favoráveis para IMI/REL frente à *Enterobacterales* produtores de OXA-48. CAZ/AVI demonstrou uma taxa de 90% de sensibilidade e IMI/REL foi capaz de inibir apenas 15% dos isolados (CANVER et al., 2019).

A presença de OXA-48 pode explicar a resistência ao IMI/REL e sensibilidade ao CAZ/AVI em *Enterobacterales*. Em nosso estudo, 35 amostras (incluindo a tribo *Proteaeae*) apresentaram CIM  $\geq 2$  mg/L para IMI/REL, ponto de corte não sensível estabelecido pelo CLSI, e estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Pesquisa de carbapenemase OXA-48 em amostras de *Enterobacterales* KPC positivas e não sensíveis ao IMI/REL segundo critérios de interpretação do CLSI e/ou EUCAST através do teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5.

<i>Enterobacterales</i>	Número da amostra	NG-Test CARBA 5		CIM (mg/L) IMI/REL	INTERPRETAÇÃO		CIM (mg/L) CAZ/AVI	INTERPRETAÇÃO CLSI/EUCAS
		NDM	OXA-48		CLSI	EUCAS		
<i>C. freundii</i>	LEID194	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	1	S
<i>C. freundii</i>	LEID217	POSITIVO	NEGATIVO	8	R	R	> 32	R
<i>C. freundii</i>	LEID225	POSITIVO	NEGATIVO	8	R	R	> 32	R
<i>E. cloacae</i>	LEID102	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	1	S
<i>K. aerogenes</i>	LEID55	NEGATIVO	NEGATIVO	8	R	R	2	S
<i>K. aerogenes</i>	LEID84	NEGATIVO	NEGATIVO	8	R	R	2	S
<i>K. aerogenes</i>	LEID138	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	1	S
<i>K. aerogenes</i>	LEID203	ND	ND	2	I	S	0,25	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID68	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	2	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID99	ND	ND	2	I	S	2	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID107	ND	ND	2	I	S	1	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID175	ND	ND	2	I	S	0,5	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID251	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	0,5	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID265	POSITIVO	NEGATIVO	16	R	R	> 32	R
<i>K. pneumoniae</i>	LEID282	ND	ND	2	I	S	0,25	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID288	ND	ND	2	I	S	1	S
<i>K. pneumoniae</i>	LEID299	ND	ND	2	I	S	0,25	S
<i>M. morganii</i>	LEID63	NEGATIVO	NEGATIVO	4	ND	ND	0,25	S
<i>M. morganii</i>	LEID82	ND	ND	4	ND	ND	≤0,06	S
<i>M. morganii</i>	LEID100	NEGATIVO	NEGATIVO	4	ND	ND	0,125	S
<i>M. morganii</i>	LEID128	ND	ND	2	ND	ND	≤0,06	S
<i>M. morganii</i>	LEID179	NEGATIVO	NEGATIVO	4	ND	ND	0,5	S
<i>M. morganii</i>	LEID222	NEGATIVO	NEGATIVO	2	ND	ND	≤0,06	S
<i>M. morganii</i>	LEID297	NEGATIVO	NEGATIVO	8	ND	ND	0,25	S

Continua

Continuação

<i>Enterobacteriales</i>	Número da amostra	NG-Test CARBA 5		CIM (mg/L) IMI/REL	INTERPRETAÇÃO		CIM (mg/L) CAZ/AVI	INTERPRETAÇÃO CLSI/EUCAST
		NDM	OXA-48		CLSI	EUCAST		
<i>P. mirabilis</i>	LEID146	NEGATIVO	NEGATIVO	32	ND	R	≤ 0,06	S
<i>P. mirabilis</i>	LEID296	NEGATIVO	NEGATIVO	32	ND	R	0,25	S
<i>P. vulgaris</i>	LEID92	ND	ND	4	ND	R	0,125	S
<i>S. marcescens</i>	LEID126	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	32	R
<i>S. marcescens</i>	LEID2	NEGATIVO	NEGATIVO	16	R	R	4	S
<i>S. marcescens</i>	LEID3	NEGATIVO	NEGATIVO	32	R	R	2	S
<i>S. marcescens</i>	LEID195	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	0,25	S
<i>S. marcescens</i>	LEID4	NEGATIVO	NEGATIVO	16	R	R	16	R
<i>S. marcescens</i>	LEID207	NEGATIVO	NEGATIVO	16	R	R	2	S
<i>S. marcescens</i>	LEID214	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	1	S
<i>S. marcescens</i>	LEID257	NEGATIVO	NEGATIVO	2	I	S	0,125	S

Fonte - A autora.

Legenda – ND: não determinado; S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Utilizando os pontos de corte do EUCAST (CIM  $\geq$  4 mg/L), 17 amostras foram consideradas resistentes ao IMI/REL. Vinte e cinco isolados foram selecionados para a pesquisa de OXA-48 pelo ensaio imunocromatográfico NG-Test CARBA 5. Nenhuma amostra foi positiva para OXA-48-like. O Teste NG CARBA 5 detecta carbapenemases pelo reconhecimento de epítomos conservados da enzima e, por esse motivo, apresenta vantagens na detecção de OXA-48-like (ZHU et al., 2021). A presença de NDM em três das 25 amostras testadas explica a resistência ao IMI/REL e ao CAZ/AVI. Alterações na permeabilidade da membrana são consideradas os principais mecanismos de resistência ao IMI/REL (MASHALY; MASHALY, 2021b; PAPP-WALLACE et al., 2020) e análises através de sequenciamento de genoma completo podem ajudar na elucidação de possíveis mecanismos de resistência.

### 3.4 CONCLUSÃO

Ceftazidima-avibactam foi o antimicrobiano que apresentou a maior taxa de sensibilidade (98%) entre os agentes testados. Entre as cinco amostras resistentes ao CAZ/AVI, o teste imunocromatográfico identificou a presença de NDM associada à KPC em três amostras e elucidou os altos níveis de resistência ao CAZ/AVI. O uso de testes rápidos pelos laboratórios deve ser encorajado pela rapidez e confiabilidade dos resultados.

Imipenem-relebactam exibiu a segunda maior taxa de sensibilidade em nosso estudo (96% e 91%, de acordo com EUCAST e CLSI, respectivamente) e foi mais potente que CAZ/AVI para *S. marcescens* e *Enterobacter* spp. Entre as amostras resistentes, nenhuma foi positiva para a enzima OXA-48 pelo teste imunocromatográfico.

Uma elevada taxa de resistência foi observada com a colistina (49%); CAZ/AVI seria uma opção terapêutica para 97% e IMIREL (CIM  $\leq$  1 mg/L) para 84% desses isolados. Entre os aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina apresentaram perfil de resistência elevados (41% e 59%, respectivamente) segundo as diretrizes do EUCAST. Não houve diferença estatística significativa quando os pontos de corte do CLSI foram utilizados.

Nossos dados mostram-se muito favoráveis para o uso de CAZ/AVI e IMI/REL em infecções causadas por *Enterobacterales* produtores de KPC.

Infelizmente, resistência a ambos os antimicrobianos já foi demonstrada. Métodos diagnósticos rápidos e estudos genéticos sobre os mecanismos envolvidos nesses casos são de fundamental importância para garantir a eficácia do tratamento.

## 3.5 ARTIGO PUBLICADO

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

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 102 (2022) 115568



Letter to the Editor

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



#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 22 May 2021

Accepted 1 October 2021

Available online 8 October 2021

##### Keywords:

Carbapenemase  
Ceftolozane  
Gram-negative bacilli  
Imipenem

Dear Editor,

Relebactam is a novel diazabicyclooctane  $\beta$ -lactamase inhibitor that has recently been approved by FDA for use in combination with imipenem-cilastatin (IMIREL) (Papp-Wallace et al., 2020). It inhibits class A and C  $\beta$ -lactamases and does not exhibit *in vitro* activity against MBLs and OXA-48-like producers (Tamma & Hsu, 2019; Vazquez-Ucha et al., 2020). IMIREL is active against a diverse range of *Enterobacterales*, including *bla*<sub>KPC-2</sub>- and *bla*<sub>KPC-3</sub>-producers and *P. aeruginosa* isolates, including those resistant to imipenem-cilastatin along with OprD mutants (Noval et al., 2020).

Ceftolozane is a newer cephalosporin paired with a known  $\beta$ -lactamase-inhibitor (tazobactam) with activity against *P. aeruginosa* (Takeda et al., 2007). Ceftolozane/tazobactam (CT) demonstrated potent activity against a broad collection of gram-negative bacilli isolated from patients in the United States, including meropenem-resistant *P. aeruginosa* (Grupep, Sutherland & Nicolau, 2017). In a study on Latin American, CT was proved to be a highly active drug against *P. aeruginosa* with an overall activity of 86.8% (Pfalter et al., 2017).

In this study, we aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of IMIREL, CT, and comparator agents tested against carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and KPC-producing *Enterobacterales* from Brazilian hospitals. In addition, the *in vitro* activities of IMIREL and CT tested against these 2 groups of organisms were compared.

A total of 529 clinically significant isolates (non-duplicate) of imipenem- and/or meropenem-resistant (CLSI 2020 criteria) gram-negative bacilli were selected from several Brazilian medical centers located in 170 cities between January 2013 and September 2020. Among 529 isolates, 229 were carbapenemase-nonproducing *P. aeruginosa* previously tested for *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, and *bla*<sub>KPC</sub>, and 300 belonged to KPC-producing *Enterobacterales* segregated as

follows: *Klebsiella* spp. (n = 163), *Enterobacter* spp. (n = 38), *Escherichia coli* (n = 23), *Serratia marcescens* (n = 51), *Citrobacter* spp. (n = 12); *Morganella morgannii* (n = 7); *Providencia* spp. (n = 1), *Proteus* spp. (n = 3), and *Salmonella* spp. (n = 2). Species identification was confirmed through matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), following the manufacturer's instructions (MS-Vitek, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, France).

Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined through broth microdilution, according to the M07-A10 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2015). The concentrations of tazobactam and relebactam were kept constant (4 mg/L). EUCAST 2020 clinical breakpoints were applied for colistin and IMIREL, and CLSI 2020 for other antimicrobials. *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 strains were used as controls (CLSI 2020). Minimal inhibitory concentrations (MIC<sub>50/90</sub>) were determined for all antimicrobials. CT activity was evaluated only for carbapenemase-nonproducing *P. aeruginosa*.

The activities of IMIREL, CT, and comparator agents are described in Table 1. In the KPC-producing *Enterobacterales* group, IMIREL exhibited the highest susceptibility rates (96%), followed by colistin (65%), and amikacin (63%). The addition of relebactam significantly restored the activity of imipenem against *Enterobacter* spp. (n = 38/100%), *Klebsiella* spp. (n = 160/98%), *Escherichia coli* (n = 22/96%), *Serratia marcescens* (n = 47/92%), and *Citrobacter* spp. (n = 10/84%).

The IMIREL activity against *Enterobacterales* isolates from Europe has recently been evaluated in the SMART study (Lob et al., 2020). The susceptibility was found to be above 92% and 42.4% in imipenem-susceptible and -nonsusceptible isolates, respectively. Unlike Brazilian epidemiology, the European isolates displayed a high prevalence of MBL and/or OXA-48-like carbapenemases (60%), which may justify the low susceptibility of IMIREL. High IMIREL-activity to KPC-producing *Enterobacterales* has been reported, which is between 88% to 100% (Canver et al., 2019; Galani et al., 2019; Gomez-Simmonds et al., 2018; Kulengowski & Burgess, 2019). A recent study conducted by Karlowsky et al. (2020) reported that 66.4% of imipenem-nonsusceptible isolates, such as non-*Proteaeae* *Enterobacterales* isolated from lower respiratory tract infections were susceptible to IMIREL (Karlowsky et al., 2020). Imipenem-nonsusceptible non-*Proteaeae* *Enterobacterales* mainly comprises *S. marcescens* (71%) with no acquired carbapenemases.

The MIC<sub>50/90</sub> of *Enterobacterales* isolates was evaluated as 0.5/2 mg/L for IMIREL and 32/128 mg/L for imipenem. The reduction of MIC<sub>50/90</sub> ranged from 2- to 128-fold, depending on the species.

**Table 1**  
Susceptibility, MIC<sub>50</sub>, and MIC<sub>90</sub> of imipenem-relebactam, ceftolozane-tazobactam, and comparators against 529 carbapenem-resistant Gram-negative bacilli isolated from Brazilian hospitals from 2013 to 2020.

ISOLATES		ANTIMICROBIAL									
		I-R	IMI	MER	CAZ	CPM	GEN	AMI	COL	CIP	CT
<i>Enterobacteriales</i> KPC-producing (n; %)											
<i>Klebsiella</i> spp. (163; 54)	MIC <sub>50</sub>	0.25	32	32	64	64	64	8	0.5	>16	
	MIC <sub>90</sub>	1	128	>128	>128	>256	>128	>256	>16	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	98	0	1	2	4	37	63	57	8	
<i>Serratia marcescens</i> (51; 17)	MIC <sub>50</sub>	0.5	64	128	16	32	2	8	>16	2	
	MIC <sub>90</sub>	2	>128	>128	64	256	>128	>256	>16	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	92	0	0	4	0	55	59	IR	37	
<i>Enterobacter</i> spp (38; 13)	MIC <sub>50</sub>	0.5	16	8	128	64	32	4	0.25	8	
	MIC <sub>90</sub>	1	32	32	>128	>256	128	64	>16	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	100	0	5	0	0	32	76	29	5	
<i>Escherichia coli</i> (23; 8)	MIC <sub>50</sub>	0.5	8	4	16	8	0.5	4	0.125	2	
	MIC <sub>90</sub>	1	32	32	>128	128	>128	64	4	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	96	0	39	22	22	65	83	87	30	
<i>Citrobacter</i> spp. (12; 4)	MIC <sub>50</sub>	0.5	16	8	128	64	0.5	4	0.25	16	
	MIC <sub>90</sub>	8	32	32	>128	128	>128	>256	2	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	83	0	0	0	8	58	83	92	33	
<i>Proteae</i> (11; 4)	MIC <sub>50</sub>	4	16	0.5	2	2	1	2	>16	0.125	
	MIC <sub>90</sub>	16	32	8	16	16	32	>256	>16	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	NA	0	64	36	36	73	73	IR	55	
<i>Salmonella</i> spp. (2; 1)	MIC <sub>50</sub>	0.25	4	≤0.25	16	8	1	2	0.125	≤0.06	
	MIC <sub>90</sub>	0.25	4	1	128	16	>128	64	4	0.125	
	S (%) <sup>a</sup>	100	0	100	0	0	50	50	50	100	
Total (300; 100)	MIC <sub>50</sub>	0.5	32	32	64	64	16	8	2	>16	
	MIC <sub>90</sub>	2	128	>128	>128	>256	>128	>256	>16	>16	
	S (%) <sup>a</sup>	96 <sup>c</sup>	0	8	6	6	44	67	65 <sup>b</sup>	17	
<i>P. aeruginosa</i> (n; %)	MIC <sub>50</sub>	2	16	16	8	32	8	8	0.5	16	2
	MIC <sub>90</sub>	4	32	32	128	128	>128	>256	1	>16	16
	S (%) <sup>a</sup>	63	2	6	53	28	46	64	98	34	80
Carbapenemase-non-producing (229; 87)	MIC <sub>50</sub>	2	16	16	8	32	8	8	0.5	16	2
	MIC <sub>90</sub>	4	32	32	128	128	>128	>256	1	>16	16
	S (%) <sup>a</sup>	63	2	6	53	28	46	64	98	34	80

I-R = imipenem/relebactam; IMI = imipenem; MER = meropenem; CAZ = ceftazidime; CPM = ceftepime; GEN = gentamicin; AMI = amikacin; COL = colistin; CIP = ciprofloxacin; CT = ceftolozane/tazobactam; S = susceptibility; IR = intrinsic resistance; NA = not available.

*Proteae* = *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*.

<sup>a</sup> : CLSI breakpoints, except for IMIREL and colistin (EUCAST)

<sup>b</sup> Isolates resistant intrinsically to colistin were excluded.

<sup>c</sup> *Proteae* were excluded.

*Proteae* isolates also showed a reduction in the MIC<sub>50/90</sub> of imipenem upon addition of relebactam. Although the clinical breakpoints have not been established for this group yet, 8 out of 11 isolates showed IMIREL MIC ≤4 mg/L.

The addition of relebactam improved the activity of imipenem against *P. aeruginosa* (MIC<sub>50/90</sub> reduced 3-fold each, from to 16–32 mg/L to 2–4 mg/L), and 63% (145/229) of carbapenemase-producing isolates became susceptible to imipenem. This result is different from those reported in previous studies conducted from 2015 to 2017, based on the SMART Surveillance United States. It was shown that relebactam restored susceptibility to imipenem between 77.2% and 85.0% in imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa* (Lob et al., 2017). These findings can be a consequence of elevated quantities of *Pseudomonas*-derived cephalosporinase combined with the loss of OprD and/or unknown/undetected β-lactamases, or even other imipenem resistance mechanisms. In the SMART European surveillance study, IMIREL exhibited activity against 74.4% of imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa* (Lob et al., 2020). Among the resistant isolates, 72% expressed MBLs and only 15% expressed GES carbapenemases.

The best susceptibility rates for carbapenemase-nonproducing *P. aeruginosa* isolates (229) have been demonstrated for CT (80%). Only colistin exhibited high activity (98%), whereas the activity of amikacin was similar to that of IMIREL (64% and 63%, respectively). However, colistin is a nephrotoxic drug, and such alternative options are always under investigation. In the RESTORE-IMI 1 clinical trial, IMIREL was found to be efficacious and less

nephrotoxic (10%) than the combination of colistin-imipenem (56%) (Motsch et al., 2020).

CT showed high activity (82.4%) against meropenem-resistant *P. aeruginosa* isolates from Turkey (Mirza et al., 2020), and 75.2% and 59.2% of meropenem-resistant *P. aeruginosa* isolates from Western and Eastern Europe, respectively (Sader et al., 2020). In the study on Latin American isolates (2017), the activity of CT was 66.1% (MIC ≤4 mg/L) against meropenem-resistant *P. aeruginosa* (Pfaller et al., 2017).

In conclusion, when comparing the in vitro activities of CT and IMIREL, CT was more active against carbapenemase-nonproducing *P. aeruginosa* (80%), whereas IMIREL was more active against KPC-producing *Enterobacteriales* (96%), including *S. marcescens*.

#### Transparency declaration

This study was supported by Merck Sharp and Dohme. Felipe Tuon is a CNPQ researcher.

#### Declaration of competing interest

The authors report no conflicts of interest relevant to this article

#### Acknowledgments

We thank Laborclin for providing the materials to support this study.

Larissa Bail  
Carmen Antonia Sanches Ito  
Lavinia Nery Villa Stangler Arend  
Keite da Silva Nogueira  
Felipe Francisco Tuon\*

Division of Microbiology, Universidade Estadual de Ponta Grossa do Paraná, Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil, Laboratório Central do Estado do Paraná - LACEN, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná

\*Corresponding author. Tel.: +55-41-3271-1515.  
E-mail Address: felipe.tuon@pucpr.br

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115568>

## References

- Canver MC, Satlin MJ, Westblade LF, Kreiswirth BN, Chen L, Robertson A, et al. Activity of imipenem-relebactam and comparator agents against genetically characterized isolates of carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63:e00672-19.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests. 30th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- Galani I, Souli M, Nafplioti K, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against non-MBL carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Greek hospitals in 2015-2016. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:1143-50.
- Gomez-Simmonds A, Stump S, Giddins MJ, Annavajhala MK, Uhlemann AC. Clonal background, resistance gene profile, and porin gene mutations modulate in vitro susceptibility to imipenem-relebactam in diverse enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e00573-18.
- Grupper M, Sutherland C, Nicolau DP. Multicenter evaluation of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam inhibitory activity against meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* from blood, respiratory tract, and wounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e00875-17.
- Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Sahn DF. In-vitro activity of imipenem/relebactam and key beta-lactam agents against Gram-negative bacilli isolated from lower respiratory tract infection samples of intensive care unit patients - SMART surveillance united states 2015-2017. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55:105841.
- Kulengowski B, Burgess DS. Imipenem/relebactam activity compared to other antimicrobials against non-MBL-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from an academic medical center. *Pathog Dis* 2019;77:ftz040.
- Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Karlowsky JA, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against gram-negative ESKAPE pathogens isolated by clinical laboratories in the united states in 2015 (results from the SMART global surveillance program). *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e02209-16.
- Lob SH, Karlowsky JA, Young K, Motyl MR, Hawser S, Kothari ND, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against resistant phenotypes of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from intraabdominal and urinary tract infection samples - SMART surveillance Europe 2015-2017. *J Med Microbiol* 2020;69:207-17.
- Mirza HC, Hortac E, Kocak AA, Demirkaya MH, Yayla B, Guclu AU, et al. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam against clinical isolates of meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*: a two-centre study. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;20:334-8.
- Motsch J, Murta de Oliveira C, Stus V, Koksai I, Lyulko O, Boucher HW, et al. RESTORE-IMI 1: a multicenter, randomized, double-blind trial comparing efficacy and safety of imipenem/relebactam vs colistin plus imipenem in patients with imipenem-nonsusceptible bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2020;70:1799-808.
- Noval M, Banoub M, Claeys KC, Heil E. The battle is on: new beta-lactams for the treatment of multidrug-resistant gram-negative organisms. *Curr Infect Dis Rep* 2020;22:1.
- Papp-Wallace KM, Mack AR, Taracila MA, Bonomo RA. Resistance to novel beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations: the "price of progress". *Infect Dis Clin North Am* 2020;34:773-819.
- Pfäller MA, Shortridge D, Sader HS, Gales A, Castanheira M, Flamm RK. Ceftolozane-tazobactam activity against drug-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* causing healthcare-associated infections in Latin America: report from an antimicrobial surveillance program (2013-2015). *Braz J Infect Dis* 2017;21:627-37.
- Sader HS, Carvalhaes CG, Duncan LR, Flamm RK, Shortridge D. Susceptibility trends of ceftolozane/tazobactam and comparators when tested against European Gram-negative bacterial surveillance isolates collected during 2012-18. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:2907-13.
- Takeda S, Nakai T, Wakai Y, Ikeda F, Hatano K. In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:826-30.
- Tamma PD, Hsu AJ. Defining the role of novel beta-lactam agents that target carbapenem-resistant gram-negative organisms. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2019;8:251-60.
- Vazquez-Ucha JC, Arca-Suarez J, Bou G, Beceiro A. New carbapenemase inhibitors: clearing the way for the beta-lactams. *Int J Mol Sci* 2020;21:9308.

## **CAPÍTULO 4. ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *SERRATIA MARCESCENS* PRODUTORA DE KPC RESISTENTES À PLAZOMICINA, CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM E/OU IMIPENEM-RELEBACTAM**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

*Serratia marcescens*, *Enterobacterales* pertencente à família *Yersiniaceae*, é considerada uma bactéria ambiental ubíqua, mas que tem chamado a atenção na área clínica, principalmente pelo potencial de causar surtos em pacientes internados em unidades de terapia intensiva neonatal, devido à imaturidade do sistema imune, e em UTIs cardíaca, unidades de diálise e ortopédicas, pela intensidade de intervenções médicas a que são submetidos os pacientes (ESCRIBANO et al., 2019; FERREIRA et al., 2020; MUYLDERMANS et al., 2021; SANDS et al., 2021).

Possui vários fatores de virulência e genes de resistência intrínsecos e adquiridos. Mecanismos de resistência intrínsecos estão relacionados principalmente com a produção da enzima beta-lactamase AmpC de forma induzida e com diferentes bombas de efluxo, o que torna *S. marcescens* resistente às cefalosporinas de segunda geração, cefamicinas, nitrofurantoína, tetraciclina e polimixinas (FIRMO et al., 2020; WANG et al., 2021). Essa característica é uma consequência da adaptação da espécie à exposição aos antimicrobianos na prática clínica e às condições desfavoráveis do meio ambiente, diminuindo consideravelmente as opções de tratamento de infecções causadas por *S. marcescens* (GAMBINO et al., 2021; PÉREZ-VISO et al., 2021; SANDS et al., 2021; HOU et al., 2022).

Os carbapenêmicos geralmente são as drogas de escolha para isolados multirresistentes (DA SILVA et al., 2021). No entanto, o aumento de cepas produtoras de carbapenemases entre isolados de *S. marcescens* dificulta seu uso clínico, principalmente em países da América Latina (SANDNER-MIRANDA et al., 2018). Um estudo realizado por Babiker et al (2020) avaliou a epidemiologia e a resistência aos carbapenêmicos na Universidade de Pittsburgh, EUA, entre janeiro de 2000 e dezembro de 2017. Foram identificadas 94.888 bactérias gram-negativas e, além das já esperadas altas

taxas de isolamento e resistência em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., 5% dos isolados eram *S. marcescens* com 3% de resistência aos carbapenêmicos (BABIKER et al., 2021).

Novas opções terapêuticas como plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam mostraram-se eficazes para o tratamento de *S. marcescens* produtores de serino-carbapenemases como KPC e SME (ZHANG; KASHIKAR; BUSH, 2017; CASTANHEIRA et al., 2018; GOMEZ-SIMMONDS et al., 2018; FLEISCHMANN; GREENWOOD-QUAINTANCE; PATEL, 2020; PERDIGÃO NETO et al., 2020). No entanto, resistência aos três novos antimicrobianos já foram relatadas entre esses isolados (APPEL et al., 2020; BIAGI et al., 2020; ZHANG; KASHIKAR; BUSH, 2017).

Com a chegada de tecnologias que realizam o sequenciamento de genoma completo, a caracterização do contexto genético e identificação de elementos genéticos móveis, elementos de transposição e da filogenia bacteriana permitiram um maior conhecimento da epidemiologia e dos mecanismos de resistência presentes nas bactérias (HAYASHI et al., 2021; KLEMM; WONG; DOUGAN, 2018). Poucos estudos sobre a resistência em isolados de *S. marcescens* produtores de carbapenemases utilizando o sequenciamento de genoma completo são encontrados na literatura (JIMENEZ et al., 2020).

Este estudo teve como objetivo identificar genes de resistência ou mutações gênicas presentes em quatro amostras de *S. marcescens* produtoras de KPC que apresentaram resistência à plazomicina, ceftazidima-avibactam ou imipenem-relebactam através do sequenciamento de genoma completo.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Isolados

Quatro amostras de *S. marcescens* produtoras de KPC isoladas de amostras clínicas foram selecionadas para o sequenciamento de genoma completo, realizado em parceria com o Instituto para Pesquisa do Câncer (IPEC) na cidade de Guarapuava, Paraná, Brasil. A escolha das amostras baseou-se na não sensibilidade à plazomicina (CIM > 2 mg/L), CAZ/AVI (CIM >

8 mg/L) ou IMI/REL (CIM >1 mg/L), segundo os pontos de corte do CLSI (2020) ou FDA (2020).

Todas as amostras apresentavam CIM elevadas para imipenem (64 a >128 mg/L), meropenem (128 a >128 mg/L), ceftazidima (64 a 128 mg/L), cefepima (256 a >256 mg/L), ciprofloxacino (>32 mg/L) e colistina (>16 mg/L). As características e a CIM de todos os antimicrobianos estão representadas na Tabela 4.1.

#### 4.2.2 Sequenciamento de genoma completo e análises de bioinformática

Para o sequenciamento de genoma completo, o DNA genômico de isolados de *S. marcescens* foi extraído utilizando o Kit Wizard® HMW DNA Extraction (Promega) utilizando cultura líquida em caldo BHI com posterior centrifugação para concentração e lavagem. A quantificação e verificação da pureza do DNA foi realizada pelo método fluorométrico utilizando o equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canadá). Bibliotecas de sequenciamento foram preparadas com Illumina DNA prep (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e o sequenciamento realizado pela plataforma Illumina NovaSeq 6000 (OGC, Oxford, UK), usando kits de reagentes NovaSeq SP (300 ciclos, leituras emparelhadas). A qualidade das leituras de sequência bruta foi verificada usando FastQC versão 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). As leituras curtas foram montadas *de novo* utilizando SPAdes versão 3.11.1 (BANKEVICH et al., 2012). A avaliação da montagem do genoma foi realizada pelo QUAST versão 5.0.2 (GUREVICH et al., 2013).

A identificação bacteriana foi confirmada usando o *Taxonomic Sequence Classification System* Kraken versão 1.0 (WOOD; SALZBERG, 2014). Os *drafts* dos genomas foram anotados pelo Prokka versão 1.13.3 (SEEMANN, 2014) e RAST (AZIZ et al., 2008). Genes de resistência antimicrobiana foram identificados utilizando as bases de dados *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) e ResFinder (BORTOLAIA et al., 2020), com um limiar de identidade de 90% sobre o comprimento da sequência de referência e revisados manualmente

com as ferramentas Artemis versão 18.1.0 e *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) versão 3.6.12 (<https://www.patricbrc.org>). Mutações em genes de resistência foram detectadas utilizando a ferramenta de alinhamento de múltiplas sequências MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) e BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A pesquisa dos plasmídeos existentes nas quatro amostras avaliadas foi realizada pelo PlasmidFinder versão 2.1 (CARATTOLI et al., 2014). A comparação do conteúdo gênico foi realizada através da plataforma BRIG (BLAST *Ring Image Generator*) (ALIKHAN et al., 2011).

#### 4.2.3 Análise filogenética dos quatro isolados de *S. marcescens*

A análise filogenética dos isolados de *S. marcescens* foi realizada através da ferramenta PGADB-builder, uma ferramenta *online* capaz de criar um banco de dados de alelos pangenômicos de microrganismos para tipagem molecular (LIU; CHIOU; CHEN, 2016). O servidor compreende dois módulos funcionais, o Build\_PGADB que cria um banco de dados PGADB e o Build\_wgMLSTtree que constrói uma árvore wgMLST de parentesco genético usando o PGADB para geração de sequências alélicas a partir de *contigs* dos genomas carregados (<http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw>). A identidade mínima pesquisada na base de dados de proteínas BLAST (BLASTP) e utilizada no Build\_PGADB foi de 95%.

Tabela 4.1 – Características e concentração inibitória mínima dos isolados de *Serratia marcescens* selecionados para o sequenciamento de genoma completo.

	ISOLADO			
	LEID1	LEID2	LEID3	LEID4
AMOSTRA CLÍNICA	AT	Sangue	PC	LBA
DATA DE ISOLAMENTO	01/08/2015	19/11/2017	27/07/2018	22/10/2018
LOCALIZAÇÃO	Foz do Iguaçu/PR	Londrina/PR	Foz do Iguaçu/PR	Florianópolis/SC
CIM (mg/L) DOS ANTIMICROBIANOS				
Gentamicina	>128	4	>128	64
Amicacina	>256	16	>256	128
Plazomicina	>64	2	>64	1
Cefepima	256	>256	>256	256
Ceftazidima	64	128	128	128
Ceftazidima-avibactam	0,125	4	2	16
Meropenem	>128	128	>128	>128
Imipenem	>128	128	64	128
Imipenem-relebactam	0,25	16	32	16
Ciprofloxacino	>32	>32	>32	>32
Tigeciclina	≤1	≤1	>2	2
Colistina	>16	>16	>16	>16
Sulfametoxazol-trimetoprim	>4/76	≤2/38	>4/76	≤2/38

Fonte – A autora.

Legenda – AT: aspirado traqueal; PC: ponta de cateter; LBA: lavado broncoalveolar; CIM: concentração inibitória mínima; PR; Paraná; SC: Santa Catarina.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infecções causadas por *S. marcescens* produtor de carbapenemases estão cada vez mais presentes na prática clínica e o tratamento é um desafio pela resistência intrínseca a vários antimicrobianos. Em 2017, *S. marcescens* foi o terceiro agente mais encontrado (63/572, 11%), depois de *E. coli* e *K. pneumoniae*, em amostras de hemocultura em uma região da África do Sul (MOODLEY; PEER; GOVIND, 2018).

O presente estudo comparou quatro amostras de *S. marcescens* produtoras de KPC resistentes a pelo menos um dos três novos agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de ERCs. O banco de dados gerado pelo Build\_PGAdb e a árvore construída pelo Build\_wgMLSTtree separou as amostras em 3 cladogramas (Figura 4.1). As amostras LEID1 e LEID3 (mesmo clado) foram isoladas em um mesmo hospital na cidade de Foz do Iguaçu/PR, porém, em anos diferentes e com perfil de sensibilidade distintos.

Figura 4.1 – Análise filogenética das amostras de *Serratia marcescens*.



Fonte – <http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw/disProfileDB.php?folder=3191727>

<http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw/diswgProfiling.php?folder=1320239857>

Matteoli et al. (2021) avaliaram uma coleção de *S. marcescens* multirresistentes de 35 países com o objetivo de inferir a estrutura populacional e a distribuição global dos isolados. Foram identificadas 12 linhagens filogenéticas distintas, sendo que a linhagem Sm9, embora distribuída globalmente, foi encontrada em 76% dos isolados da América do Norte e do Sul de forma exclusivamente antropogênica. Apresentou um perfil de

resistência preocupante, com a maior média e diversidade de genes de resistência (MATTEOLI et al., 2021).

Os plasmídeos identificados em nosso estudo através da ferramenta PlasmidFinder foram IncN, IncU e IncQ1 (Tabela 4.2). Em amostras de *S. marcescens* brasileiras, IncN é um plasmídeo frequentemente encontrado (MATTEOLI et al., 2021). Está presente em uma ampla variedade de hospedeiros, com alta eficiência de transmissão e disseminação de genes de carbapenemases, incluindo *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>* (KOPOTSA; OSEI SEKYERE; MBELLE, 2019). Os plasmídeos IncFII, IncFIB e IncQ foram prevalentes entre a linhagem Sm9 anteriormente citada e presentes em mais de 20 genomas (MATTEOLI et al., 2021). Em um estudo realizado com amostras de *S. marcescens* isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas de São Paulo, IncA/C2 foi o plasmídeo mais detectado, seguido por IncFIB(K), IncFII e IncN (PRADO, 2019). As características genômicas e os genes de resistência detectados em nosso estudo estão apresentadas na Tabela 4.2.

Nossa análise de bioinformática gerou um genoma bastante fragmentado, mas com excelente cobertura (> 50x), o que propicia um bom desempenho para a detecção de variantes de nucleotídeo único ou *single nucleotide variants* (SNVs) e pequenas inserções/deleções (*indels*). Por outro lado, a detecção de rearranjos estruturais e variações no número de cópias ou *copy number variations* (CNVs), que requerem diferentes algoritmos de bioinformática, ficam prejudicadas (VAN DIJK et al., 2018; YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Devido às características da técnica de sequenciamento, algumas regiões contendo genes de resistência ficaram muito fragmentadas e representadas em *contigs* curtos, não permitindo a caracterização do contexto genético como um todo para entender a distribuição dos genes nos plasmídeos presentes em cada amostra. A seguir, discutiremos a presença dos genes de resistência encontrados e suas mutações.

Tabela 4.2 – Características genômicas e genes de resistência detectados em *S. marcescens* através do sequenciamento de genoma completo.

	ISOLADO			
	LEID1	LEID2	LEID3	LEID4
<b>CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS</b>				
NÚMERO DE <i>CONTIGS</i>	52	51	72	52
COMPRIMENTO DO GENOMA	5486226	5106348	5566887	5572031
CONTEÚDO CG (%)	59,43	59,63	59,30	59,56
N50	308287	216802	231103	342789
L50	6	9	10	6
NÚMERO DE CDS	5381	4933	5503	5521
RNA <sub>t</sub>	81	78	82	57
RRNA	5	6	5	2
PLASMÍDEOS	IncN	IncU	IncN	IncQ1
<b>GENES DE RESISTÊNCIA</b>				
BETA-LACTÂMICOS				
Beta-lactamases classe A	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> <i>bla</i> <sub>SCO-1</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-56</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> <i>bla</i> <sub>SCO-1</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-56</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>
Beta-lactamases classe C	<i>bla</i> <sub>SRT-2</sub>	<i>bla</i> <sub>SRT-2</sub>	<i>bla</i> <sub>SRT-2</sub>	<i>bla</i> <sub>SRT-2</sub>
Beta-lactamases classe D			<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-101</sub>
AMINOGLICOSÍDEOS				
EMAs	<i>aac</i> (6')-Ic	<i>aac</i> (6')-Ic	<i>aac</i> (6')-Ic	<i>aac</i> (6')-Ic

*Continua*

Continuação

	ISOLADO			
	LEID1	LEID2	LEID3	LEID4
<b>GENES DE RESISTÊNCIA</b>				
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>ant(3'')-Ia</i>
	<i>aac(3)-IIa</i>		<i>aac(3)-IIa</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>
	<i>ant(3'')-Ia</i>		<i>ant(3'')-Ia</i>	<i>aph(3')-VIa</i>
Metiltransferases	<i>rmtD-2</i>		<i>rmtD-2</i>	
TETRACICLINA	<i>tet(G)</i>	<i>tet(41)</i>	<i>tet(G)</i>	
	<i>tet(C)</i>		<i>tet(C)</i>	
TRIMETOPRIM			<i>dfrA8</i>	
CLORANFENICOL	<i>catA1</i>		<i>catA1, catB3</i>	<i>cmx</i>
SULFONAMIDA	<i>sul1</i>		<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
COMPOSTOS DE AMÔNIA QUATERNÁRIA	<i>qacEdelta1</i>		<i>qacEdelta1</i>	

Fonte – A autora.

Legenda - CDS: *Coding DNA Sequence*; EMAs: enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; N50: valor para o qual 50% do tamanho total da montagem é representado por contigs maiores ou iguais a este valor; L50: número de contigs utilizados para o cálculo de N50.

### 4.3.1 Genes de resistência

Estudos envolvendo genes de resistência evidenciam uma variação espaço-temporal no perfil de sensibilidade de amostras de *S. marcescens* e mostram uma relação com o consumo de antimicrobianos, sugerindo a transmissão em potencial desses isolados entre países e entre o meio ambiente e a clínica, representando uma ameaça à saúde pública (HOU et al., 2022).

#### 4.3.1.1 Resistência aos aminoglicosídeos

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em *Enterobacterales* é a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020). O gene *aac(6')-Ic* encontra-se de forma cromossômica em amostras de *S. marcescens* e confere resistência à tobramicina e amicacina. Em nosso estudo, foi detectado nas quatro amostras estudadas; no entanto, o fenótipo nem sempre é um padrão pois depende da expressão gênica (YANG et al., 2012). A amostra LEID4 mostrou 96,1% de similaridade, a amostra LEID2 mostrou 97,5% de similaridade e as amostras LEID1 e LEID3 mostraram 98,6% de similaridade com AAC(6')-Ic de *S. marcescens* GenBank nº NG\_047294.

As amostras LEID1 e LEID3 foram resistentes a todos os aminoglicosídeos testados. Além de *aac(6')-Ic*, apresentaram os genes *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-IIa* e *ant(3'')-Ia*. AAC(6')-Ib-cr é codificada tanto em cromossomo como em plasmídeos em *Enterobacterales* e pode induzir resistência a aminoglicosídeos e fluorquinolonas simultaneamente (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). Em um estudo realizado com 56 amostras de *S. marcescens* isoladas em um hospital brasileiro, o gene *aac(6')-Ib-cr* estava presente em 24,1% dos isolados (FERREIRA, 2020). AAC(3)-IIa é encontrada em uma grande variedade de gêneros e é responsável pela resistência à gentamicina, tobramicina e netilmicina (KRAUSE et al., 2016; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). O gene *ant(3'')-Ia* faz parte de vários transposons e confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (KRAUSE et al., 2016; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

A resistência à plazomicina dos isolados LEID1 e LEID3 foi confirmada pela presença do gene *rmfD2*, uma metiltransferase que confere resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto estreptomicina e espectinomicina (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). As amostras LEID2 e LEID4 não codificaram genes produtores de metiltransferases e a plazomicina mostrou-se sensível, como esperado. No entanto, o perfil de sensibilidade à gentamicina e amicacina foi distinto. A amostra LEID2 apresentou apenas o gene *aac(6')-Ic* e sensibilidade tanto à gentamicina quanto à amicacina. A amostra LEID4 apresentou os genes *aph(3')-VIa* e *ant(2'')-Ia* e resistência à gentamicina e amicacina. A fosfotransferase APH(3')-VIa foi descrita pela primeira vez em *Acinetobacter baumannii* e é responsável pela resistência à amicacina e gentamicina (RAMIREZ, 2010; SHI, 2013). A adeniltransferase ANT(2'')-Ia é uma das EMAs mais prevalente em patógenos gram-negativos e confere resistência à gentamicina, tobramicina e canamicina (COX et al., 2015). Para essa última amostra, a plazomicina seria a única opção terapêutica entre os aminoglicosídeos.

#### 4.3.1.2 Resistência aos beta-lactâmicos

*S. marcescens* faz parte do grupo de *Enterobacterales* que possuem o gene produtor da beta-lactamase AmpC cromossômica induzível pertencente à Classe C de Ambler e que, quando expresso, pode induzir resistência às cefalosporinas de terceira geração (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Esses genes fazem parte da família SRT/SST de beta-lactamases e possuem as variantes SRT-1, SRT-2, SRT-3 e SST-1. No entanto, a enzima AmpC precisa de outros produtos gênicos para conferir resistência, como AmpR (regulador), AmpG (permease), e AmpD (amidase). Os quatro isolados carregavam o gene cromossômico *bla<sub>SRT-2</sub>*; a amostra LEID2 mostrou 98,4% de similaridade e as amostras LEID1, LEID3 e LEID4 mostraram 99,5% de similaridade com *bla<sub>SRT-2</sub>* de *S. marcescens* NCBI RefSeq: WP\_048321520.1. Em *Enterobacter cloacae*, a substituição N346Y em AmpC<sub>cloacae</sub> conferiu resistência ao CAZ/AVI (COMPAIN, 2020). Outras substituições foram identificadas em isolados de *E. cloacae* e *C. freundii* resistentes ao CAZ/AVI (LIVERMORE, 2018).

Em nosso trabalho, LEID2 e LEID4 apresentaram CIM para CAZ/AVI de 4 mg/L e 16 mg/L, respectivamente. Ambas apresentaram a mutação D143N em SRT-2/AmpC. Além disso, LEID4 apresentou a mutação G238D e LEID 2 as mutações Q21H, E73Q, N102K e R107H. Em AmpD, a mutação A27P foi comum em LEID2, LEID3 e LEID4, amostras resistentes ao IMI/REL e com CIMs mais elevadas para o CAZ/AVI. LEID 2 também apresentou a mutação V15L. A amostra LEID4 apresentou duas mutações diferentes em AmpR (G89R e R198H) e pode estar relacionada com hiperexpressão de SRT-2/AmpC. Mutações em *ampR* são mais frequentes em *Enterobacterales*, enquanto mutações em *ampD* estão mais associadas com isolados clínicos de *P. aeruginosa* (ROSSI, 2016). As mutações presentes em AmpR, AmpD e SRT-2/AmpC em nossas amostras estão representadas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Mutações presentes nos produtos gênicos AmpR, AmpD e SRT-2/AmpC em *S. marcescens*.

	AmpR					AmpD					SRT-2/AmpC			
	LEID1	LEID3	LEID2	LEID4		LEID1	LEID3	LEID2	LEID4		LEID1	LEID3	LEID2	LEID4
G89R					H5N					Q21H				
H177R					V9I					V61I				
R198H					K12T					E73Q				
L249Q					V15L					N102K				
R291Q					L21R					R107H				
					N24D					D143N				
					A27P					G238D				
					R50Q					V372I				
					E60Q									

Fonte – A autora.

Legenda - Retângulos em cinza indicam a presença da mutação.

O gene *bla<sub>KPC-2</sub>* foi encontrado sem mutações nas quatro amostras estudadas e o aumento na CIM de CAZ/AVI não está relacionado com a presença de variantes de KPC-2. A resistência de baixo nível ao CAZ/AVI pode ser explicada pela superexpressão do gene *bla<sub>KPC</sub>* causada por mutações na região promotora do gene, número de cópias de plasmídeos portadores de *bla<sub>KPC</sub>* aumentado ou por regiões duplicadas no mesmo plasmídeo (CUI et al., 2020). A avaliação dessas alterações não foi possível em nosso estudo pois o sequenciamento de leituras curtas resulta em um genoma fragmentado, que dificulta a reconstrução de uma sequência original completa (LIU et al., 2012).

Outros genes produtores de serino-beta-lactamases detectados foram *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SCO-1</sub> e *bla*<sub>CTX-M-56</sub> em ambas as amostras LEID1 e LEID3. TEM-1 é uma beta-lactamase encontrada em muitas bactérias gram-negativas e confere resistência às penicilinas e cefalosforinas de primeira geração (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Em *Enterobacterales*, o gene *bla*<sub>SCO-1</sub> é carreado por plasmídeos e tem características de carbenicilinase (PAPAGIANNITSIS et al., 2007).

CTX-M-56 é uma ESBL variante de CTX-M-2 detectada pela primeira vez na Bolívia e confere resistência à cefotaxima (PALLECCHI et al., 2007). A produção concomitante de CTX-M-56 e TEM-1 já foi anteriormente relatada em *E. coli* no Paraguai (KHAN et al., 2009). Mutações em ESBLs que conferiram resistência ao CAZ/AVI foram descritas em alguns trabalhos (WANG et al., 2020b). Em nosso estudo, não foram encontradas mutações em CTX-M-56.

Beta-lactamases da classe D foram encontradas nas amostras LEID3 (*bla*<sub>OXA-1</sub>) e LEID4 (*bla*<sub>OXA-101</sub>). OXA-1 é uma penicilinase com ação em ampicilina e oxacilina e mostrou 100% de similaridade com *E. coli* GenBank nº CP088879.1 (DRAWZ; BONOMO, 2010). OXA-101 é uma OXA-10-like e apresentou 99,8% de similaridade com *Citrobacter freundii* GenBank nº AM412777.1, encontrada também em *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* em amostras de urina na Argentina em 2005 (PORTO et al., 2010). Em nosso estudo, a troca de uma guanina por timina na posição 468 resultou na substituição de 1 aminoácido (E156D) em OXA-101. Esta mesma mutação já foi anteriormente observada em uma amostra de *S. marcescens* isolada de ponta de cateter na cidade de São Paulo (GenBank nº NZ\_QJPU0100039.1). A presença dessas beta-lactamases de espectro estreito não parece estar relacionada com a resistência ao CAZ/AVI e IMI/REL na amostra LEID4 e com a resistência ao IMI/REL na amostra LEID3.

#### 4.3.1.3 Resistência às fluorquinolonas

As quatro amostras de *S. marcescens* de nosso estudo apresentaram CIM  $\geq$  32 mg/L para ciprofloxacino. Taxas muito baixas de sensibilidade ao ciprofloxacino (<5%) são esperadas entre as ERCs (DURANTE-MANGONI; ANDINI; ZAMPINO, 2019). A resistência às fluorquinolonas mediada por

plasmídeos pode ser conferida pela expressão dos genes *aac(6')-Ib-cr*, *qnr*, *oqxAB* e *qepA*. A expressão do gene *aac(6')-Ib-cr* confere baixos níveis de resistência ao ciprofloxacino e sua associação com vários genes de resistência e elementos genéticos móveis facilita a disseminação (KIM et al., 2009). As amostras LEID1 e LEID3 apresentaram o gene *aac(6')-Ib-cr*, como citado anteriormente, com 99,6% de similaridade com *aac(6')-Ib-cr7* isolado em uma amostra de *E. coli* na Argentina (NCBI RefSeq nº NG\_052086.1). As substituições de 3 nucleotídeos resultaram na alteração de 3 aminoácidos (R97W, L102S e Y164D). Nenhuma das amostras apresentou o gene *qepA* e todas apresentaram o gene *oqxB*.

Os genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD*) codificam proteínas que bloqueiam a ação do ciprofloxacino sobre DNA girase e topoisomerase IV bacterianas, além de facilitarem a seleção de mutantes cromossômicos na presença de uma fluorquinolona (YANG et al., 2012). Todas as amostras estudadas apresentaram o gene *qnrB*. Nas amostras LEID1 e LEID3 este gene apresentou 100% de similaridade com uma amostra de *S. marcescens* (GenBank nº CP059038.1) isolada em Dourados/MS. A amostra LEID4 apresentou 100% de similaridade com uma amostra de *S. marcescens* (GenBank nº CP063238.1) isolada na Grécia. A amostra LEID2 apresentou 99,08% de similaridade com uma amostra de *S. marcescens* (GenBank nº CP018917.1) isolada em Michigan nos Estados Unidos.

Mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* também foram pesquisadas (Quadro 4.2). As mutações mais comuns observadas em isolados clínicos de *Enterobacterales* ocorrem nos códons 83 e 87 em *gyrA* e nos códons 80 e 84 em *parC*. Altos níveis de resistência às fluorquinolonas requer a presença de mutações múltiplas nos genes *gyrA* e/ou *parC*. (ONO et al., 2022; YANG et al., 2012). Três amostras (LEID1, LEID3 e LEID4) apresentaram a mutação S83I em *gyrA*, já relatada em *S. marcescens* no Brasil (MINARINI; DARINI, 2012). Podemos observar que as mutações foram comuns para LEID1 e LEID3 (mesmo clado) nos quatro genes estudados e este fato atesta a clonalidade dos isolados, como observado em outro estudo realizado com *S. marcescens* (OSEI SEKYERE; AMOAKO, 2017).

Quadro 4.2 - Mutações presentes nos produtos gênicos GyrA, GyrB, ParC e ParE em *S. marcescens*.

	GyrA				GyrB				ParC				ParE						
	LEID1	LEID3	LEID2	LEID4															
S83I					A152V					T59N					S139G				
D87N					N155T					E687D									
S862T					E181D					V748M									
E873D					G589A					A750V									
					S608N														
					I651L														
					Q696K														
					E703D														

Fonte – A autora.

Legenda - Os retângulos em cinza indicam a presença da mutação.

#### 4.3.1.4 Resistência às tetraciclinas

Bombas de efluxo específicas para as tetraciclinas foram encontradas em três das quatro amostras de *S. marcescens*. TetG (94% de similaridade com *Pseudomonas* spp. GenBank nº AF133139\_2) estava presente nas amostras LEID1 e LEID3, TetC (99,9% de similaridade com *Escherichia coli* GenBank nº NG\_048179) nas amostras LEID1 e LEID3 e Tet41 (98,8% de similaridade com *S. marcescens* GenBank nº NG\_048142) na amostra LEID2. Esse mecanismo de resistência é mais eficaz contra tetraciclinas de primeira geração, confere resistência moderada às tetraciclinas de segunda geração e pouca resistência às tetraciclinas de terceira geração, como a tigeciclina (LIN et al., 2018). Em nosso estudo, apenas a amostra LEID3 foi considerada não sensível à tigeciclina segundo o FDA (2019). Dados de sensibilidade em torno de 85% para a tigeciclina são esperados entre as ERCs (DURANTE-MANGONI; ANDINI; ZAMPINO, 2019).

#### 4.3.1.5 Resistência às polimixinas

*Serratia* spp. são intrinsecamente resistentes às polimixinas (TILAHUN et al., 2021). A adaptação bacteriana em ambientes com escassez de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, em pH ácido e na presença de polimixinas é realizada pelos sistemas de dois componentes pmrAB/phoPQ e seu gene regulador *mgrB* e do operon *arnBCADTEF* (EZADI; ARDEBILI; MIRNEJAD, 2019; MARISCOTTI; GARCÍA VÉSCOVI, 2021). Mutações em *mgrB* ou estímulos ambientais promovem a ativação desses sistemas e desencadeiam uma superexpressão de genes

modificadores de lipopolissacarídeo (LPS), levando a resistência às polimixinas (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). O operon *arnBCADTEF* parece estar constitutivamente expresso em bactérias intrinsecamente resistentes em contraste com bactérias não intrinsecamente resistentes. Modificações no LPS de *S. marcescens* mediadas pelo operon *arnBCADTEF* explicam parcial ou totalmente a resistência intrínseca desta bactéria às polimixinas (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Como esperado, todas as amostras apresentaram CIM > 16 mg/L para a colistina em nosso estudo.

Em 2016, a ANVISA publicou uma nota técnica alertando os laboratórios para a detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil. Esse gene promove uma redução nas cargas negativas do lipídeo A no LPS das bactérias gram-negativas, diminuindo ou impedindo a ligação das polimixinas, antimicrobianos catiônicos, ao seu sítio alvo (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Houve relatos de detecção em amostras humanas e em mares brasileiros (FERNANDES et al., 2017). Em nosso estudo, o gene *mcr-1* não foi encontrado em nenhuma das amostras.

#### 4.3.1.6 Outros genes de resistência

As amostras LEID1 e LEID3 apresentaram os genes *qacEdelta1* (100% de similaridade com *Proteus mirabilis*, GenBank nº CP049753) e *catA1* (100% de similaridade com *E. coli*, GenBank nº NG\_047584.1). *qacEdelta1* é um gene que confere resistência a compostos quaternários de amônia e *catA1* confere resistência ao cloranfenicol (ROMÃO et al., 2011; VAN HOEK et al., 2011). A amostra LEID3 apresentou também o gene de resistência ao cloranfenicol *catB3* que estava presente no mesmo node que *bla<sub>OXA-1</sub>*. A amostra LEID4 apresentou o gene *cmx*, uma bomba de efluxo do tipo MFS que confere resistência ao cloranfenicol (JIANG et al., 2017). Em nosso estudo de perfil de sensibilidade não testamos cloranfenicol por não ser uma boa opção terapêutica para *Enterobacterales*.

O gene *sul1* foi detectado nas amostras LEID1, LEID3 e LEID4 (99,8% de similaridade com *K. pneumoniae*, GenBank nº ACN65403) e confere resistência ao sulfametoxazol. O gene *dfrA8* foi também encontrado na amostra LEID3 e confere resistência ao trimetoprim (DE LOS SANTOS; LAVIÑA; POEY,

2021). LEID1 e LEID3 apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, porém, nenhum gene *dfr* foi encontrado na amostra LEID1. Mutação no gene *folP* (substituição do aminoácido Pro64Ser) é importante na resistência ao sulfametoxazol (SANDNER-MIRANDA et al., 2018). Em nosso estudo, nenhum isolado apresentou essa mutação. A sensibilidade esperada ao sulfametoxazol-trimetoprim entre isolados de EPCs é inferior a 5%; no entanto, os dados disponíveis apresentam-se muito esparsos (DURANTE-MANGONI, 2019).

#### 4.3.1.7 Alterações em porinas OmpF e OmpC

OmpF e OmpC são porinas presentes em *S. marcescens* e servem como canais não específicos para absorção de nutrientes e antimicrobianos (DIAMANDAS, 2019). Variações nas condições de temperatura, pH e concentração de sacarose ou salicilato são capazes de alterar a expressão de OmpF e OmpC (BEGIC; WOROBEK, 2006). OmpF apresenta um poro relativamente grande e seu papel principal é o influxo de nutrientes em condições de escassez. O aumento da resistência à ampicilina, cefoxitina e nitrofurantoína em *S. marcescens* está correlacionado com a ausência da porina OmpF (MOYA-TORRES et al., 2014). Em *E. coli*, a ausência de OmpF resultou em resistência a vários antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, sugerindo que OmpF funciona como a principal via de penetração na membrana externa para muitos antimicrobianos (CHOI; LEE, 2019).

Em um estudo realizado por Gomez-Simmonds et al. (2018), IMI/REL demonstrou a menor eficácia contra isolados de *S. marcescens*, com valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> 4 a 8 vezes maiores que os de outras *Enterobacterales*. Embora alterações na permeabilidade da membrana celular sejam consideradas mecanismos potenciais de resistência a esse antimicrobiano, os autores encontraram evidências de rupturas significativas dos genes *ompC* e *ompF* em menos da metade dos isolados de *S. marcescens*, sugerindo um mecanismo alternativo intrínseco de resistência (GOMEZ-SIMMONDS et al., 2018).

Um estudo realizado com amostras de *E. coli* e *Klebsiella* spp. na França demonstrou que ceftazidima e avibactam utilizam as porinas OmpF (OmpK35) ou OmpC (OmpK36) para atingirem seus sítios-alvo; no entanto, esta não

parece representar a principal via. As CIMs de CAZ/AVI diminuíram nessas espécies em ambos os grupos que expressavam e não expressavam as porinas após a adição do permeabilizador PMBN. Em contraste, Omp35 e Omp36 demonstram maior interferência na permeabilidade da membrana externa ao CAZ/AVI em *K. aerogenes*, embora sugeriram que outros canais de difusão para avibactam podem estar presentes também nessa espécie (PAGÈS et al., 2016).

Em nosso estudo, o gene *ompF* apresentou a inserção de dois nucleotídeos na amostra LEID4, gerando uma mudança na janela de leitura (*frameshift mutation*), o que pode ter contribuído para a CIM elevada de CAZ/AVI e IMI/REL, ambas 16 mg/L. A amostra LEID3 apresentou a deleção de dois nucleotídeos, também gerando uma mudança na janela de leitura, o que pode estar relacionado com o aumento de 0,125 mg/L para 2 mg/L na CIM do CAZ/AVI e de 0,25 mg/L para 32 mg/L na CIM do IMI/REL em comparação com o isolado LEID1 (mesmo clado) (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Alterações no gene *ompF* presentes nas amostras LEID3 e LEID4.

AAB69103.1	AACGTTTCAGTCCAACCACGCCGAATCTCAGGGCACCGAAGGCACCAAAACCCGTCTGGGC
LEID4	AACGTTTCAGTCCAACCACGCCGAATCTCAGGGCACCGAAGGCACCAAAACCCGTCTGGGC
LEID3	AACGTTTCAGTCCAACCACGCCGAATCTCAG-GCACCGAAGGCACCAAAAG-CCGTCTGGGC
AAB69103.1	TTCGCCGGTCTGAAATTCGCTGACTACGGCTCCTTCGACTACGGCCGTAACACTACGGCGTA
LEID4	TTCGCCGGTCTGAAATTCGCTGACTACGGCTCCTTCGACTACGGCCGTAACACTACGGCGTA
LEID3	TTCGCCGGTCTGTA-----
AAB69103.1	CTGTACGACGTGGAAGGCTGGACCGATATGCTGCCAGAGTTCGGTGGCGATACTTACACC
LEID4	CTGTACGACGTGGAAGGCTGGACCGATATGCTGCCAGAGTTCGGTGGCGATACTTACACC
LEID3	-----
AAB69103.1	TACTCCGACAACTTCATGACCGGCCGT--ACCAACGGCGTTGCGACCTATCGTAACAACA
LEID4	TACTCCGACAACTTCATGACCGGCCGTGTACCAACGGCGTTGCGACCTATCGTAACAACA
LEID3	-----
AAB69103.1	ACTTCTTCGGTCTGGTTGACGGTCTGAACTTCGCTCTGCAATACCAGGGCAAAAACCGAGA
LEID4	ACTTCTTCGGTCTGGTTGACGGTCTGTA-----
LEID3	-----

Fonte – A autora.

Legenda - *Serratia marcescens* GenBank nº AAB69103.1. Nucleotídeos em vermelho evidenciam mutações; nucleotídeos em roxo evidenciam inserções; - indicam deleções, nucleotídeos em azul evidenciam códons de parada.

As amostras LEID1 e LEID2 apresentaram o gene *ompF* completo, porém, com várias mutações. O padrão das mutações foi bem distinto entre ambas e em quantidade maior em LEID2 (Quadro 4.3). Essas diferenças podem estar relacionadas com a CIM de CAZ/AVI e IMI/REL. A amostra LEID2 mostrou CIMs mais elevadas (4 mg/L para o CAZ/AVI e 16 mg/L para o IMI/REL) do que a amostra LEID1 (0,125 mg/L para o CAZ/AVI e 0,25 mg/L para o IMI/REL). A atividade de IMI/REL contra *K. pneumoniae* foi afetada por rupturas nas porinas OmpK35 e OmpK36, elevando consideravelmente a CIM do antimicrobiano (BALABANIAN et al., 2018). Um estudo mais detalhado sobre a expressão gênica de *ompF* é necessário para correlacionar essas alterações com a sensibilidade diminuída de CAZ/AVI e IMI/REL.

Quadro 4.3 - Mutações em porinas OmpF e OmpC encontradas nas amostras de *S. marcescens*.

Mutações	OmpF		Mutações	OmpC			
	LEID1	LEID2		LEID1	LEID3	LEID2	LEID4
K47D			V15L				
A87S			N48D				
Y141N			V50A				
D184N			M135S				
V185I			D157G				
D219A			N177S				
L222N			G178P				
R223K			M203L				
F260Y			A225G				
G263N			N226G				
F265S			G227A				
T266G			H228Y				
N267A			Q229R				
N267T			V252T				
T268G			D271T				
T268S			S273D				
A271D			V274A				
E273D			Y275F				
E273Q			Q322E				
N274D			V351L				
L311M			Q358D				
V316A							
G317S							
D353E							
D353A							
T358A							
I360T							
G367A							
S265_T266_insLKDG							
D274_C275_insK							
N274_C275_insN5							

Fonte – O autor.

Legenda - Os retângulos em cinza indicam a presença da mutação.

OmpC apresenta um poro de diâmetro menor que OmpF (BEGIC; WOROBEK, 2006) e, ao contrário de *E. coli*, a ausência da porina clássica OmpC parece não afetar significativamente o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em *S. marcescens* (MOYA-TORRES et al., 2014). Em nosso estudo, o gene *ompC* estava completo em todas as amostras e apresentou mutações previamente descritas em outro estudo brasileiro (PRADO, 2019). As mutações em porinas OmpF e OmpC encontradas nas quatro amostras de *S. marcescens* do nosso estudo estão representadas no Quadro 4.3.

#### 4.3.1.8 Alterações em bombas de efluxo

Em *S. marcescens*, as bombas de efluxo ainda não estão totalmente caracterizadas, mas são consideradas um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos (SANDNER-MIRANDA et al., 2018). As bombas de efluxo do tipo RND têm sido associadas com a resistência à múltiplas drogas (TOBA et al., 2019). A bomba SsmE do tipo SMR e a bomba SmfY do tipo MFS protegem *S. marcescens* de fluorquinolonas (MINATO et al., 2008). A bomba de efluxo SmdAB do tipo ABC protege de fluorquinolonas e tetraciclina (MATSUO et al., 2008). A bomba de efluxo MacAB está envolvida na proteção contra aminoglicosídeos e polimixinas (SHIRSHIKOVA et al., 2021).

A superexpressão de AcrAB-TolC, principal bomba de efluxo em *Enterobacterales*, pode estar relacionada com o aumento da CIM de IMI/REL e tigeciclina, porém afetam minimamente a CIM de CAZ/AVI (HAN et al., 2021; PAGÈS et al., 2016; PAPP-WALLACE et al., 2020). Os genes *ramR* e *acrR* são reguladores negativos do sistema AcrAB. *ramA* ativa a transcrição de *acrAB* e *tolC*. Se RamR não é capaz de inibir a expressão de RamA e AcrR não inibe *acrAB* por alterações como deleção, mutação e inserção, a bomba de efluxo AcrAB-TolC está hiperregulada (GRIMSEY et al., 2020).

Em *S. marcescens*, *ramA* é autorregulado e, de forma atípica, regulado por *phoP*. A integridade de *ramA* e *phoP* é necessária para a completa expressão de RamA. Tal fato sugere que esses mecanismos ocorrem para adquirir simultaneamente a capacidade de combater efeitos de peptídeos catiônicos produzidos como defesa pelo hospedeiro e resistir à ação de

antimicrobianos usados na clínica para o tratamento de infecções bacterianas (MARISCOTTI; GARCÍA VÉSCOVI, 2021).

Em nosso estudo, o gene *phoP* mostrou-se inalterado em LEID2 e com as mutações (T71A e Q146R) em LEID1, LEID3 e LEID4. AcrR apresentou as mesmas mutações nas quatro amostras, com exceção de LEID2 (uma mutação a mais) e LEID 4 (um aminoácido distinto na posição 219) (Quadro 4.4). A proteína ativadora transcricional RamA não apresentou nenhuma mutação na amostra LEID4, apenas uma mutação nas amostras LEID1 e LEID3 e inúmeras mutações em LEID2. Essas mutações parecem não explicar as CIMs aumentadas para IMI/REL em LEID2, LEID3 e LEID4 e estudos de expressão gênica futuros serão necessários para elucidar o verdadeiro papel na resistência aos novos antimicrobianos.

Quadro 4.4 - Mutações presentes nos produtos gênicos responsáveis pelo controle da expressão de bombas de efluxo AcrAB-TolC nas amostras de *S. marcescens*.

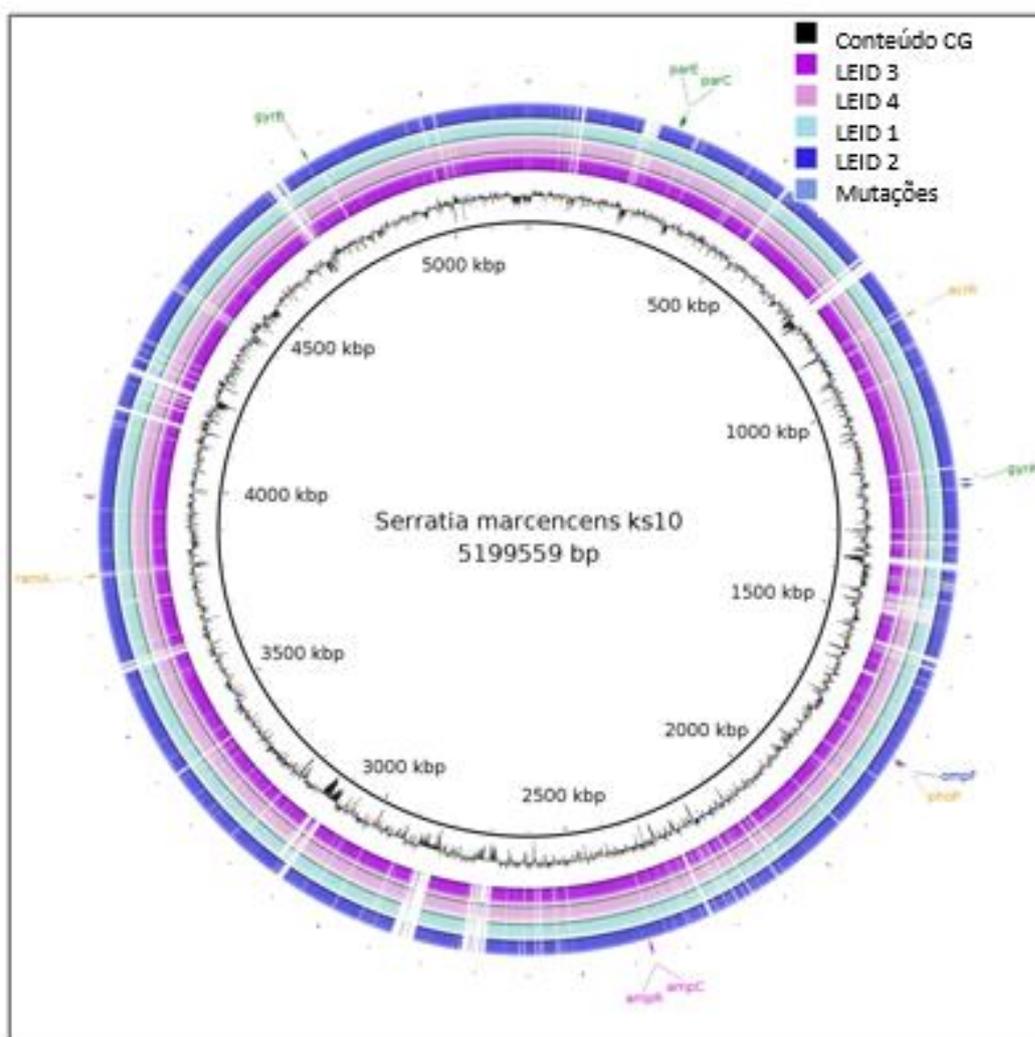
	AcrR					RamA					PhoP			
	LEID1	LEID3	LEID2	LEID4		LEID1	LEID3	LEID2	LEID4		LEID1	LEID3	LEID2	LEID4
G152E					L9V					T71A				
L175M					I65V					Q146R				
R211K					E72G									
del 212_214 SMD					I121S									
T216D					K123N									
P219A					E137D									
P219T					L138M									
S220P					I150V									
N221D					G157S									
G223D					E164D									
S224R					H170N									
					K172R									
					R175S									
					A176V									
					N178K									
					N179R									
					A181G									
					K183R									
					W184P									
					S186A									
					R204M									
					M213I									
					S217P									
					D221A									
					A224E									
					D225G									
					Y230H									
					V238M									
					H253N									
					R255K									
					V256I									
					V257I									

Fonte – A autora.

Legenda - Os retângulos em cinza indicam a presença da mutação.

O conteúdo gênico das cepas foi comparado ao de uma cepa referência de *S. marcescens* ks10, utilizada para análise comparativa de genomas, através do *software* BRIG por meio do algoritmo BLAST (ALIKHAN et al., 2011; ELLEDGE et al., 2019). A Figura 4.3 mostra a semelhança entre a sequência de referência central e as sequências estudadas como um conjunto de anéis concêntricos, com uma escala indicativa do percentual de identidade entre as sequências por intensidade da cor do anel.

Figura 4.3 - Comparação entre o conteúdo gênico das cepas avaliadas e cepa referência usando algoritmo BLAST.



Fonte - A autora.

Legenda - Ao centro, em preto, o genoma de *Serratia marcescens* ks10 utilizado como referência e seu respectivo conteúdo de GC%. Os círculos em cores representam as cepas de *Serratia marcescens* desse estudo. Os segmentos externos destacados mostram os genes que tiveram as mutações avaliadas a fim de explicar os fenótipos de resistência encontrados.

Em destaque, na parte externa da figura estão indicados os genes cujas mutações foram avaliadas nesse estudo, a fim de elucidar as resistências encontradas. Os círculos concêntricos indicam que os genomas são semelhantes, porém existem várias regiões onde formam-se lacunas na extensão do gráfico circular, as quais representam porções do genoma referência ausentes nas demais estirpes. Esses genes ausentes e sua função serão avaliados em uma próxima etapa do estudo.

#### 4.4 CONCLUSÃO

*Serratia marcescens* é uma bactéria ubíqua que surgiu recentemente como um patógeno oportunista associado principalmente a infecções nosocomiais e considerada um grande problema de saúde devido à sua multirresistência. Novas opções terapêuticas encontram-se disponíveis; no entanto, isolados resistentes à plazomicina, IMI/REL e CAZ/AVI já foram observados.

Em nosso estudo, a resistência à plazomicina nas amostras LEID1 e LEID3 foi confirmada pela presença da metiltransferase RmtD2. Para LEID3, a única opção terapêutica entre os antimicrobianos testados seria CAZ/AVI.

A resistência ao IMI/REL nas amostras LEID3 e LEID4 podem estar relacionadas com a inativação do gene codificador da porina OmpF pela mudança na janela de leitura. Na amostra LEID2 (resistente ao IMI/REL), embora completo, o gene *ompF* apresentou um número bem maior de mutações que em LEID1 (sensível ao IMI/REL), além de serem distintas.

LEID4, única amostra resistente ao CAZ/AVI, apresentou duas mutações adicionais (G89R e R198H) às mutações presentes também em LEID1, LEID2 e LEID3 em AmpR. Em SRT-2/AmpC, a amostra LEID4 também apresentou um padrão de mutações distinto. Essas alterações nos genes relacionados à expressão da beta-lactamase cromossômica induzível em *S. marcescens* podem explicar a resistência ao CAZ/AVI. Para essa amostra, a plazomicina seria a única opção terapêutica.

A disponibilização de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por EPCs aumenta o arsenal terapêutico no combate dessas infecções. A análise através de WGS permitiu-nos identificar mutações

gênicas que podem estar relacionadas com a resistência aos novos antimicrobianos. Estudos futuros de expressão gênica são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A plazomicina mostrou-se ativa contra 86% de *Enterobacterales* produtores de carbapenemases testados, entre elas KPC, NDM, OXA-48, GES, IMP, VIM e BKC.
- Analisando as três principais carbapenemases, observou-se que a plazomicina apresentou CIM  $\leq 2$  mg/L para 86% das amostras KPC-2 positivas, 84% das amostras NDM-1 positivas e 92% das amostras OXA-48 positivas. Utilizando os pontos de corte do EUCAST, a sensibilidade à tigeciclina, colistina, amicacina e gentamicina foi de 76%, 67%, 62% e 19%, respectivamente. A utilização dos pontos de corte do CLSI/FDA resultou em taxas de sensibilidade mais altas para tigeciclina, amicacina e gentamicina, com diferença estatística significativa para a tigeciclina e amicacina.
- A plazomicina apresentou maior potência e atividade (CIM<sub>50/90</sub> 0,5/64 mg/L) do que os outros aminoglicosídeos testados (CIM<sub>50/90</sub> 64/>64 e CIM<sub>50/90</sub> 16/>512 mg/L para gentamicina e amicacina, respectivamente).
- A prevalência de metiltransferases entre os isolados de EPCs foi elevada (10,8%). RmtB-1 foi a 16S-RMTase mais detectada (75,9%), principalmente em *K. pneumoniae* produtora de KPC. Outras 16S-RMTases detectadas foram ArmA (13%), RmtD-1 (1,8%), RmtD-2 (5,5%) e RmtC (3,7%).
- Entre as amostras KPC positivas, ceftazidima-avibactam foi o antimicrobiano que apresentou a maior taxa de sensibilidade (98%), seguido por imipenem-relebactam (96% e 91%, de acordo com EUCAST e CLSI, respectivamente).
- O teste imunocromatográfico NG-Test CARBA 5 identificou três amostras coprodutoras de NDM entre as cinco amostras KPC positivas resistentes à ceftazidima-avibactam, e nenhuma coprodução de OXA-48 foi detectada entre as amostras resistentes ao imipenem-relebactam.
- *Serratia marcescens* apresentou resistência aos três novos antimicrobianos testados.

- A resistência à plazomicina nas amostras LEID1 e LEID3 de *S. marcescens* foi confirmada pela presença da metiltransferase RmtD2 através do sequenciamento de genoma completo. Para LEID3, a única opção terapêutica entre os antimicrobianos testados seria CAZ/AVI.
- A resistência ao IMI/REL nas amostras LEID3 e LEID4 pode estar relacionada com a inativação do gene codificador da porina OmpF. Na amostra LEID2 (resistente ao IMI/REL), embora completo, o gene ompF apresentou um número bem maior de mutações que em LEID1 (sensível ao IMI/REL), além de serem distintas.
- LEID4, única amostra resistente ao CAZ/AVI, apresentou duas mutações adicionais (G89R e R198H) às mutações presentes também em LEID1, LEID2 e LEID3 em AmpR. Em SRT-2/AmpC, a amostra LEID4 também apresentou um padrão de mutações distinto. Essas alterações nos genes relacionados à expressão da beta-lactamase cromossômica induzível em *S. marcescens* podem explicar a resistência ao CAZ/AVI. Para essa amostra, a plazomicina seria a única opção terapêutica.
- A análise através de WGS permitiu-nos identificar mutações gênicas que podem estar relacionadas com a resistência aos novos antimicrobianos. Estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência.
- Com base nesses achados, plazomicina, ceftazidima-avibactam e imipenem-relebactam podem ser considerados importantes opções terapêuticas para EPCs em nosso país.

## REFERÊNCIAS

- ABDELRAOUF, K. et al. In vivo efficacy of plazomicin alone or in combination with meropenem or tigecycline against enterobacteriaceae isolates exhibiting various resistance mechanisms in an immunocompetent murine septicemia model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, 1 Aug. 2018.
- ABDUL-MUTAKABBIR, J. C. et al. **Teaching an Old Class New Tricks: A Novel Semi-Synthetic Aminoglycoside, Plazomicin** *Infectious Diseases and Therapy*, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.6084/>>
- AGGEN, J. B. et al. Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4636–4642, Nov. 2010.
- AÍNSA, J. A. et al. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')*-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')*-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 2, p. 431–41, Apr. 1997.
- ALBIERO, J. et al. Pharmacodynamic evaluation of the potential clinical utility of fosfomicin and meropenem in combination therapy against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4128–4139, 1 Jul. 2016.
- ALIKHAN, N.-F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC genomics**, v. 12, p. 402, 8 Aug. 2011.
- ALMAGHRABI, R. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4443–4451, 2014.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–31, 16 May 1980.
- ANTINORI, E. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ( KPC ) producer resistant to ceftazidime e avibactam due to a deletion in the *bla* KPC3 gene \*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 946.e1-946.e3, 2020.
- APPEL, T. M. et al. In Vitro Susceptibility to Ceftazidime/Avibactam and Comparators in Clinical Isolates of Enterobacteriales from Five Latin American Countries. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 2, 5 Feb. 2020.
- AREND, L. N. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in different facilities in Southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 2, p. 137–140, 2015.
- ARENZ, S.; WILSON, D. N. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 9, p. 1–14, 2016.
- ARMSTRONG, E. S.; MILLER, G. H. **Combating evolution with intelligent design: The neoglycoside ACHN-490** *Current Opinion in Microbiology*, Oct. 2010.
- ASLI, A. et al. Distinctive Binding of Avibactam to Penicillin-Binding Proteins of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 752–756, Feb. 2016.
- AVENT, M. L. et al. **Current use of aminoglycosides: Indications, pharmacokinetics and**

**monitoring for toxicity** *Internal Medicine Journal*, Jun. 2011.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, 8 Feb. 2008.

BABIKER, A. et al. Changing Epidemiology and Decreased Mortality Associated With Carbapenem-resistant Gram-negative Bacteria, 2000-2017. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. 11, p. e4521–e4530, 2021.

BALABANIAN, G. et al. Effect of Porins and blaKPC Expression on Activity of Imipenem with Relebactam in *Klebsiella pneumoniae*: Can Antibiotic Combinations Overcome Resistance? **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 24, n. 7, p. 877–881, Sep. 2018.

BALKAN, I. I. et al. Colistin resistance increases 28-day mortality in bloodstream infections due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 2161–2170, Oct. 2021.

BALLABEN, A. S. et al. **Diversity of high-level aminoglycoside resistance mechanisms among Gram-negative nosocomial pathogens in Brazil** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* American Society for Microbiology, , 1 Nov. 2018.

BAND, V. I. et al. Colistin Heteroresistance Is Largely Undetected among Carbapenem-Resistant Enterobacterales in the United States. **mBio**, v. 12, n. 1, 2021.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 1 May 2012.

BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849–51, 2016.

BASSETTI, M. et al. **Antimicrobial resistance and treatment: an unmet clinical safety need** *Expert Opinion on Drug Safety* Taylor and Francis Ltd, , 3 Jul. 2018.

BASSETTI, M. et al. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in medicine**, v. 6, 2019a.

BASSETTI, M. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* gut decolonisation following ceftazidime / avibactam-based combination therapy : A retrospective observational study \$. **Integrative Medicine Research**, v. 17, n. April 2018, p. 109–111, 2019b.

BASSETTI, M. et al. New Antibiotics for Hospital-Acquired Pneumonia and Ventilator-Associated Pneumonia. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, 27 Jan. 2022.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 105–115, 2013.

BEGIC, S.; WOROBEK, E. A. Regulation of *Serratia marcescens* ompF and ompC porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. **Microbiology**, v. 152, n. 2, p. 485–491, 2006.

BES, T. et al. Bloodstream Infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* isolates co-harboring NDM-1 and KPC-2. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 20, n. 1, p. 57, 30 Dec. 2021.

BEYROUTHY, R. et al. IncFIIk plasmid harbouring an amplification of 16S rRNA

methyltransferase-encoding gene rmtH associated with mobile element ISCR2. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 2, p. 402–406, 2017.

BIAGI, M. et al. Activity of Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam against Carbapenem-Resistant, SME-Producing *Serratia marcescens*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 4, 2020.

BIANCO, G. et al. Outbreak of ceftazidime-avibactam resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* in a COVID-19 intensive care unit, Italy: urgent need for updated diagnostic protocols of surveillance cultures. **Journal of Hospital Infection**, v. 122, p. 217–219, 2022.

BLAKE, K. S.; CHOI, J.; DANTAS, G. Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 78, n. 6, p. 2585–2606, Mar. 2021.

BLIZZARD, T. A. et al. Discovery of MK-7655, a  $\beta$ -lactamase inhibitor for combination with Primaxin®. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 3, p. 780–5, 1 Feb. 2014.

BONOMO, R. A. et al. **Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge** Clinical Infectious Diseases Oxford University Press, , 3 Apr. 2018.

BOOLCHANDANI, M.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature reviews. Genetics**, v. 20, n. 6, p. 356–370, 2019.

BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 1 Dec. 2020.

BRADFORD, P. A. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 1 Jul. 2004.

BREMMER, D. N. et al. KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* strains that harbor AAC(6')-. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7597–7600, 1 Dec. 2014.

BUENO, M. F. C. et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum  $\beta$ lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397–2400, May 2013.

BUENO, M. F. C. et al. Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing rmtD1 and rmtD2 16S rRNA methyltransferase genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1928–1931, 1 Mar. 2016.

BULIK, C. C.; NICOLAU, D. P. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3002–4, Jun. 2011.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 2, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, Mar. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

- CAMPANA, E. H. et al. Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 57–62, 1 Jan. 2017.
- CAMPOS, J. C. et al. Characterization of Tn3000, a transposon responsible for bla<sub>NDM-1</sub> dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387–7395, 1 Dec. 2015.
- CANO, Á. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance Use of carbapenems in the combined treatment of emerging ceftazidime / avibactam-resistant and carbapenem-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections : Report of a case and review of the literature. v. 22, p. 9–12, 2020.
- CANVER, M. C. et al. Activity of Imipenem-Relebactam and Comparator Agents against Genetically Characterized Isolates of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 9, 2019.
- CARATTOLI, A. et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.
- CARVALHO-ASSEF, A. P. D. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–7, Dec. 2013.
- CASS, R. T. et al. Pharmacokinetics and safety of single and multiple doses of ACHN-490 injection administered intravenously in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5874–5880, Dec. 2011.
- CASSU-CORSI, D. et al. Characterisation of plasmid-mediated rmtb-1 in enterobacteriaceae clinical isolates from são paulo, brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 12, 2018.
- CASTANHEIRA, M. et al. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, 2018a.
- CASTANHEIRA, M. et al. Analyses of a Ceftazidime-Avibactam-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Carrying bla<sub>KPC-2</sub> Reveals a Heterogenous Population and Reversible Genotype. **mSphere**, v. 3, n. 5, 2018b.
- CASTANHEIRA, M. et al. In Vitro Activity of Plazomicin against Gram-Negative and Gram-Positive Isolates Collected from U.S. Hospitals and Comparative Activities of Aminoglycosides against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and Isolates Carrying Carbapenemase Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, 1 Aug. 2018c.
- CASTANHEIRA, M. et al. Activity of plazomicin tested against enterobacterales isolates collected from U.S. hospitals in 2016-2017: Effect of different breakpoint criteria on susceptibility rates among aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 5, 2020a.
- CASTANHEIRA, M. et al. Ceftazidime-avibactam activity against a challenge set of carbapenem-resistant Enterobacterales: Ompk36 L3 alterations and  $\beta$ -lactamases with ceftazidime hydrolytic activity lead to elevated MIC values. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 1, p. 106011, Jul. 2020b.
- CAVALLINI, S. et al. Ceftazidime/avibactam resistance is associated with different mechanisms

- in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 2021.
- CAYÔ, R. et al. *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: A silent threat. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 357–358, 2017.
- CHOI, U.; LEE, C.-R. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 953, 2019.
- CLARK, J. A.; BURGESS, D. S. **Plazomicin: a new aminoglycoside in the fight against antimicrobial resistance** *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 2020.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100**. Wayne, PA: [s.n.]. v. 8
- COLEMAN, K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 5, p. 550–5, Oct. 2011.
- COMPAIN, F.; ARTHUR, M. Impaired Inhibition by Avibactam and Resistance to the Ceftazidime-Avibactam Combination Due to the D179Y Substitution in the KPC-2  $\beta$ -Lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, 2017.
- CORRÊA, L. L. et al. Revised and updated multiplex PCR targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 479–481, 2014.
- COSTELLO, S. E. et al. Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 278–285, 1 Mar. 2019.
- COX, G. et al. Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylyltransferase ANT(2'')-Ia. **mBio**, v. 6, n. 1, 6 Jan. 2015.
- COX, G. et al. Plazomicin Retains Antibiotic Activity against Most Aminoglycoside Modifying Enzymes. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 980–987, 8 Jun. 2018.
- CUI, X. et al. Reduced Ceftazidime-Avibactam Susceptibility in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Patients Without Ceftazidime-Avibactam Use History - A Multicenter Study in China. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1365, 2020.
- CUI, X.; ZHANG, H.; DU, H. **Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 20 Aug. 2019.
- DA PAZ PEREIRA, J. N. et al. Clonal Dissemination of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Carriers of 16S rRNA Methylase Genes in an Oncological Hospital in Recife, Brazil. **Current Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 32–39, 1 Jan. 2020.
- DA SILVA, R. M. R. et al. Use of monitoring indicators in hospital management of antimicrobials. **BMC infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 827, 17 Aug. 2021.
- DAVIS, M. A. et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2666–2669, 2010.
- DE LOS SANTOS, E.; LAVIÑA, M.; POEY, M. E. Strict relationship between class 1 integrons and resistance to sulfamethoxazole in *Escherichia coli*. **Microbial pathogenesis**, v. 161, n. Pt A, p. 105206, Dec. 2021.
- DE MAJUMDAR, S. et al. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2015.

- DIAMANDAS, A. **Serratia marcescens: Outer membrane porins and comparative genomics.** [s.l.] Faculty of Graduate Studies of The University of Manitoba, 2019.
- DIAS, V. M. DE C. H. et al. Active surveillance of carbapenem-resistant Gram-negative healthcare-associated infections in a low-middle-income country city. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 101540, Mar. 2021.
- DINGLE, T. C.; PITOUT, J. The Ins and Outs of Susceptibility Testing for New  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations for Gram-Negative Organisms. **Journal of clinical microbiology**, p. e0080721, 7 Apr. 2022.
- DOI, Y. et al. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 491–496, Feb. 2004.
- DOI, Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, p. S565–S575, 13 Nov. 2019.
- DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 88–94, 2007.
- DOI, Y.; WACHINO, J. ICHI; ARAKAWA, Y. **Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases** *Infectious Disease Clinics of North America* W.B. Saunders, , 1 Jun. 2016.
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, Jan. 2010.
- DRUSANO, G. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45 Suppl 1, p. S89-95, 15 Jul. 2007.
- DURANTE-MANGONI, E.; ANDINI, R.; ZAMPINO, R. **Management of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections** *Clinical Microbiology and Infection* Elsevier B.V., , 1 Aug. 2019.
- EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Y. **Inhibitors of  $\beta$ -Lactamases. New Life of  $\beta$ -Lactam Antibiotics** *Biochemistry (Moscow)* Pleiades journals, , 1 Nov. 2020.
- EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. **Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria** *Antibiotics* MDPI AG, , 1 Jun. 2019.
- ELJAALY, K. et al. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 79, n. 3, p. 243–269, 28 Feb. 2019.
- ELLEGE, N. C. et al. Draft Genome Sequences of 38 *Serratia marcescens* Isolates Associated with Acroporid Serratiosis. **Microbiology resource announcements**, v. 8, n. 14, 4 Apr. 2019.
- ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321–2, Feb. 2007.
- ELSHAMY, A. A.; ABOSHANAB, K. M. **A review on bacterial resistance to carbapenems: Epidemiology, detection and treatment options** *Future Science OA* Future Medicine Ltd., , 1 Mar. 2020.
- ENDIMIANI, A. et al. ACHN-490, a neoglycoside with potent in vitro activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4504–4507, Oct. 2009.
- ESCRIBANO, E. et al. Influence of a *Serratia marcescens* outbreak on the gut microbiota

establishment process in low-weight preterm neonates. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0216581, 2019.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5.0\\_Breakpoint\\_Table\\_01.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf), p. 0–77, 2017.

EZADI, F.; ARDEBILI, A.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 4, 2019.

FDA. **FDA-Recognized Antimicrobial Susceptibility Test Interpretive Criteria** No Title. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/development-resources/fda-recognized-antimicrobial-susceptibility-test-interpretive-criteria>>.

FENG, Y. et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 4–16, 2015.

FERNANDES, M. R. et al. Colistin-Resistant mcr-1-Positive Escherichia coli on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, 2017.

FERREIRA, R. L. et al. Characterization of KPC-Producing Serratia marcescens in an Intensive Care Unit of a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 956, 20 May 2020.

FIRMO, E. F. et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis and Serratia marcescens clinical isolates in Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 21, p. 255–261, 2020.

FLEISCHMANN, W. A.; GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E.; PATEL, R. In vitro activity of plazomicin compared to amikacin, gentamicin, and tobramycin against multidrug-resistant aerobic gram-negative bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 2, 2020.

FOSSO, M. Y.; LI, Y.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. **New trends in the use of aminoglycosides** MedChemComm Royal Society of Chemistry, , 2014.

FRITSCHKE, T. R. et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1843–1845, May 2008.

GALANI, I. et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against non-MBL carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolated in Greek hospitals in 2015 – 2016. 2019a.

GALANI, I. et al. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 15 Feb. 2019b.

GALANI, I. et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae of sequence type 39 during treatment. v. 2, n. Table 1, p. 5–10, 2020.

GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2565–2571, 1 Aug. 2003.

GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. **Antimicrobial Agents and**

**Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3960–3962, Jul. 2012.

GAMBINO, A. S. et al. *Serratia marcescens* SCH909 as reservoir and source of genetic elements related to wide dissemination of antimicrobial resistance mechanisms. **FEMS microbiology letters**, v. 368, n. 14, 2021.

GARCÍA-BETANCUR, J. C. et al. **Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean** *Expert Review of Anti-Infective Therapy* Taylor and Francis Ltd., , 2021.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. **Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives** *MedChemComm* Royal Society of Chemistry, , 2016.

GIDDINS, M. J. et al. Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 3, 2018.

GIRLICH, D. et al. Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. February, p. 1–21, 2020.

GIURAZZA, R. et al. Emerging Treatment Options for Multi-Drug-Resistant Bacterial Infections. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, 3 Jun. 2021.

GOŁEBIEWSKI, M. et al. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-3. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3789–95, Nov. 2007.

GOMEZ-SIMMONDS, A. et al. Clonal Background, Resistance Gene Profile, and Porin Gene Mutations Modulate In Vitro Susceptibility to Imipenem-Relebactam in Diverse Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, Aug. 2018.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.

GRIMSEY, E. M. et al. Overexpression of RamA, Which Regulates Production of the Multidrug Resistance Efflux Pump AcrAB-TolC, Increases Mutation Rate and Influences Drug Resistance Phenotype. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 4, 2020.

GUIMARÃES, T. et al. Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by Enterobacteriales Coresistant to Carbapenems and Polymyxins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 10, 2019.

GUREVICH, A. et al. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 Apr. 2013.

HAIDAR, G. et al. Association between the presence of aminoglycoside-modifying enzymes and in vitro activity of gentamicin, tobramycin, amikacin, and plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- and extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacter species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5208–5214, 1 Sep. 2016.

HAIDAR, G. et al. Mutations in blaKPC-3 That Confer Ceftazidime-Avibactam Resistance Encode Novel KPC-3 Variants That Function as Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017.

HAKEAM, H. A. et al. Effectiveness of ceftazidime-avibactam versus colistin in treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 109, p. 1–7, Aug. 2021.

HAN, X. et al. Emergence of Ceftazidime/Avibactam and Tigecycline Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Due to In-Host Microevolution. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 757470, 2021.

HANSEN, G. T. Continuous Evolution : Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 75–92, 2021.

HAYASHI, W. et al. Genomic characterisation and epidemiology of nosocomial *Serratia marcescens* isolates resistant to ceftazidime and their plasmids mediating rare blaTEM-61. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 25, p. 124–131, 2021.

HEMARAJATA, P. et al. Selection of hyperproduction of AmpC and SME-1 in a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolate during antibiotic therapy. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1256–1262, 2018.

HEO, Y.-A. Imipenem/Cilastatin/Relebactam: A Review in Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 81, n. 3, p. 377–388, Feb. 2021.

HOU, J. et al. Long-term spatiotemporal variation of antimicrobial resistance genes within the *Serratia marcescens* population and transmission of *S. marcescens* revealed by public whole-genome datasets. **Journal of hazardous materials**, v. 423, n. Pt B, p. 127220, 2022.

HU, F. et al. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4980–4981, 2014.

HUMPHRIES, R. M. et al. First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6605–6607, 2015.

ISHIZAKI, Y. et al. Instability of the 16S rRNA methyltransferase-encoding npmA gene: why have bacterial cells possessing npmA not spread despite their high and broad resistance to aminoglycosides? **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 9, p. 798–807, 1 Sep. 2018.

JANA, S.; DEB, J. K. **Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance** *Applied Microbiology and Biotechnology*, Mar. 2006.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 2, 2021.

JEON, S. A. et al. Comparison between MGI and Illumina sequencing platforms for whole genome sequencing. **Genes and Genomics**, v. 43, n. 7, p. 713–724, 1 Jul. 2021.

JIANG, X. et al. Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. **Nature communications**, v. 8, p. 15784, 2017.

JIMENEZ, A. et al. KPC-3-Producing *Serratia marcescens* Outbreak between Acute and Long-Term Care Facilities, Florida, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 11, p. 2746–2750, 2020.

KALLUF, K. O. et al. Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 130–133, 2017.

KARAIKOS, I. et al. **The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how** *Frontiers in Public Health* *Frontiers Media S.A.*, , 2019a.

- KARAIKOS, I. et al. Novel  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 15, n. 2, p. 133–149, Feb. 2019b.
- KARAIKOS, I. et al. Ceftazidime/avibactam in the era of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* : experience from a national registry study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 3, p. 775–783, 11 Feb. 2021.
- KARAIKOS, I. et al. Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* : implication on future therapeutic strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 20, n. 1, p. 53–69, 2 Jan. 2022.
- KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E. I.; GIKAS, A. **Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems** Infection Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 Dec. 2020.
- KARLOWSKY, J. A. et al. In Vitro Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1638–1649, 2017.
- KARLOWSKY, J. A. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance In vitro activity of imipenem / relebactam against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from intraabdominal and urinary tract infection samples : SMART Surveillance United States 2015 – 2017. **Integrative Medicine Research**, v. 21, p. 223–228, 2020.
- KHAN, M. A. et al. Dominance of CTX-M-2 and CTX-M-56 among extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in hospitals in Paraguay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1330–1332, 2009.
- KHUNTAYAPORN, P.; YAMPRAYOONSWAT, W. Dissemination of Carbapenem- Resistance among Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying Metallo-Beta-Lactamase Genes , including the Novel bla IMP-65 Gene in. v. 51, n. 2, p. 107–118, 2019.
- KIM, S.-Y. et al. Prevalence and characteristics of aac(6')-Ib-cr in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 63, n. 3, p. 314–8, Mar. 2009.
- KLEMM, E. J.; WONG, V. K.; DOUGAN, G. Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 51, p. 12872–12877, 2018.
- KOMIRENKO, A. S. et al. A phase 1 study to assess the pharmacokinetics of intravenous plazomicin in adult subjects with varying degrees of renal function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 12, p. 1–4, 2018.
- KONO, N.; ARAKAWA, K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. **Development Growth and Differentiation**, v. 61, n. 5, p. 316–326, 2019.
- KOPOTSA, K.; OSEI SEKYERE, J.; MBELLE, N. M. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1457, n. 1, p. 61–91, 2019.
- KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, 1 Jun. 2016.
- KRISHNAN, N. P. et al. Inhibition of *Klebsiella*  $\beta$ -Lactamases (SHV-1 and KPC-2) by Avibactam: A

- Structural Study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0136813, 4 Sep. 2015.
- KULENGOWSKI, B.; BURGESS, D. S. Imipenem/relebactam activity compared to other antimicrobials against non-MBL-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from an academic medical center. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 4, 1 Jun. 2019.
- KUMAR, K. R.; COWLEY, M. J.; DAVIS, R. L. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 7, p. 661–673, 2019.
- KWON, K. H. et al. Colistin treatment in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia patients: Incidence of nephrotoxicity and outcomes. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 6, p. 605–9, Jun. 2015.
- LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584–1590, 1999.
- LEE, C.-R. et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 895, 2016.
- LEE, C. S. et al. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4109–4110, 1 Nov. 2014.
- LEE, Y.-L. et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. **International journal of antimicrobial agents**, v. 59, n. 2, p. 106528, Feb. 2022.
- LEVY, S. E.; BOONE, B. E. Next-generation sequencing strategies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 2019.
- LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.
- LIN, J. et al. Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. **Annual review of biochemistry**, v. 87, p. 451–478, 2018.
- LIN, T. et al. Identification of aac(2′)-I type b aminoglycoside-modifying enzyme genes in resistant *Acinetobacter baumannii*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 1, p. 1828–35, 13 Mar. 2015.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 582–610, Oct. 2009.
- LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- LIU, Y.; CHIOU, C.; CHEN, C. PGAdb-builder : A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–5, 2016.
- LOB, S. H. et al. In vitro activity of imipenem- - relebactam against resistant phenotypes of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from intraabdominal and urinary tract infection samples – SMART Surveillance Europe 2015 – 2017. p. 207–217, 2020.
- LV, P. N. et al. Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 23, p. 33–37, 1 Dec. 2020.

- LYNCH, J. P.; CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G. Escalating antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae: focus on carbapenemases. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 22, n. 11, p. 1455–1473, Aug. 2021.
- MA, K. et al. Struggle To Survive: the Choir of Target Alteration, Hydrolyzing Enzyme, and Plasmid Expression as a Novel Aztreonam-Avibactam Resistance Mechanism. **mSystems**, v. 5, n. 6, 3 Nov. 2020.
- MANCINI, S. et al. Klebsiella pneumoniae co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 151–152, 2018a.
- MANCINI, S. et al. Emergence of an MDR Klebsiella pneumoniae ST231 producing OXA-232 and RmtF in Switzerland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 3, p. 821–823, 2018b.
- MARAKI, S. et al. Epidemiology and in vitro activity of ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam, eravacycline, plazomicin, and comparators against Greek carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates. **Infection**, v. 50, n. 2, p. 467–474, Apr. 2022.
- MARISCOTTI, J. F.; GARCÍA VÉSCOVI, E. Serratia marcescens RamA Expression Is under PhoP-Dependent Control and Modulates Lipid A-Related Gene Transcription and Antibiotic Resistance Phenotypes. **Journal of bacteriology**, v. 203, n. 13, p. e0052320, 2021.
- MARSH, J. W. et al. **Clostridioides difficile: A potential source of NpmA in the clinical environment** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Oxford University Press, , 1 Feb. 2019.
- MARTINS, R. C. R. et al. crossm Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by Enterobacteriales Coresistant to Carbapenems and. v. 63, n. 10, p. 1–6, 2019.
- MARTINS, W. M. B. S. et al. Comparison of phenotypic tests for detecting BKC-1-producing Enterobacteriaceae isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 3, p. 246–248, 1 Mar. 2016.
- MARTINS, W. M. B. S. et al. Clinical and Molecular Description of a High-Copy IncQ1 KPC-2 Plasmid Harbored by the International ST15 Klebsiella pneumoniae Clone. **mSphere**, v. 5, n. 5, 2020.
- MARTINS, W. M. B. S. et al. Silent Circulation of BKC-1-producing Klebsiella pneumoniae ST442: Molecular and Clinical Characterisation of an Early and Unreported Outbreak: Early Outbreak of BKC-1-producing K. pneumoniae. **International journal of antimicrobial agents**, p. 106568, 11 Mar. 2022.
- MASHALY, M. E.-S.; MASHALY, G. E.-S. Activity of imipenem/relebactam on Klebsiella pneumoniae with different mechanisms of imipenem non-susceptibility. **Iranian journal of microbiology**, v. 13, n. 6, p. 785–792, Dec. 2021a.
- MASHALY, M. E.; MASHALY, G. E. Activity of imipenem / relebactam on Klebsiella pneumoniae with different mechanisms of imipenem non-susceptibility. v. 13, n. 6, p. 785–792, 2021b.
- MATESANZ, M. Update on antimicrobial pharmacotherapy Ceftazidime-avibactam. v. 34, p. 38–40, 2021.
- MATESANZ, M.; MENSA, J. Ceftazidime-avibactam. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 34, n. Supl 1, p. 38–40, 30 Sep. 2021.
- MATLOCK, A. et al. **Advances in novel antibiotics to treat multidrug-resistant gram-negative bacterial infections** *Internal and Emergency Medicine* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 2021.

- MATSUO, T. et al. SmdAB, a heterodimeric ABC-Type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 2, p. 648–54, Jan. 2008.
- MATTEOLI, F. P. et al. The global population structure and beta-lactamase repertoire of the opportunistic pathogen *Serratia marcescens*. **Genomics**, v. 113, n. 6, p. 3523–3532, 2021.
- MCCOMBIE, W. R.; MCPHERSON, J. D.; MARDIS, E. R. Next-generation sequencing technologies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1–8, 2019.
- MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15–21, Feb. 2016.
- MENDES, G. et al. First Description of Ceftazidime/Avibactam Resistance in a ST13 KPC-70-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain from Portugal. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 1–11, 2022.
- MINARINI, L. A. R.; DARINI, A. L. C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 43, n. 4, p. 1309–14, Oct. 2012.
- MINATO, Y. et al. Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 3, p. 516–9, Mar. 2008.
- MINGEOT-LECLERCQ, M.-P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727–737, Apr. 1999.
- MOLITOR, A. et al. Ram locus is a key regulator to trigger multidrug resistance in Enterobacter aerogenes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 148–159, 1 Feb. 2018.
- MONTEIRO, J. et al. **First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil** **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Jan. 2009.
- MOODLEY, K.; PEER, A. K. C.; GOVIND, C. N. Pan drug-resistant *Serratia marcescens*: An emerging threat. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 108, n. 4, p. 12264, 2018.
- MOREIRA, N. K.; CAIERSÃO, J. Ceftazidime-avibactam: are we safe from class A carbapenemase producers' infections? **Folia microbiologica**, v. 66, n. 6, p. 879–896, Dec. 2021.
- MORRILL, H. J. et al. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, 1 Apr. 2015.
- MOYA-TORRES, A. et al. The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 160, n. Pt 9, p. 1882–1892, Sep. 2014.
- MUELLER, L. et al. crossm KPC-3 Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Exhibiting Reduced Carbapenemase Activity. 2019a.
- MUELLER, L. et al. Phenotypic, biochemical and genetic analysis of KPC-41, a KPC-3 variant conferring resistance to ceftazidime-avibactam and exhibiting reduced carbapenemase activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 16 Sep. 2019b.
- MUYLDERMANS, A. et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit and the potential of whole-genome sequencing. **The Journal of hospital infection**, v. 111, p. 148–154, May 2021.
- NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, Dec. 2017.

- NELSON, K. et al. Resistance to Ceftazidime-Avibactam Is Due to Transposition of KPC in a Porin-Deficient Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Increased Efflux Activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 10, 2017.
- NICOLETTI, A. G. et al. Characterization of BKC-1 class a carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159–5164, 1 Sep. 2015.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–236, 2009.
- NORDMANN, P.; MAMMERI, H. **Extended-spectrum cephalosporinases: Structure, detection and epidemiology** Future Microbiology Future Medicine Ltd., , 2007.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, p. S521–S528, 13 Nov. 2019.
- NOVAL, M. et al. **The Battle Is on: New Beta-Lactams for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms** Current Infectious Disease Reports Springer, , 1 Jan. 2020.
- O'HARA, J. A. et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2413–2416, 2013.
- OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.
- ONO, T. et al. Global population structure of the *Serratia marcescens* complex and identification of hospital-adapted lineages in the complex. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 3, 2022.
- OSEI SEKYERE, J.; AMOAKO, D. G. Genomic and phenotypic characterisation of fluoroquinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae in Durban, South Africa. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178888, 2017.
- OTTO, M. Next-generation sequencing to monitor the spread of antimicrobial resistance. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 9–11, 2017.
- PAGÈS, J.-M. et al. Role of the Outer Membrane and Porins in Susceptibility of  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae to Ceftazidime-Avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1349–1359, Mar. 2016.
- PALLECCHI, L. et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2720–5, Aug. 2007.
- PAPAGIANNITSIS, C. C. et al. SCO-1, a novel plasmid-mediated class A beta-lactamase with carbenicillinase characteristics from *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2185–8, Jun. 2007.
- PAPP-WALLACE, K. M. et al. **Resistance to Novel  $\beta$ -Lactam– $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations: The “Price of Progress”** Infectious Disease Clinics of North America W.B. Saunders, , 1 Dec. 2020.
- PASSARELLI-ARAUJO, H. et al. Molecular epidemiology of 16s rRNA methyltransferase in brazil: Rmtg in *klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, p. 1–

9, 2019.

PATERSON, D. L.; ISLER, B.; STEWART, A. **New treatment options for multiresistant gram negatives** *Current opinion in infectious diseases* NLM (Medline), , 1 Apr. 2020.

PERDIGÃO NETO, L. V. et al. Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 23, p. 33–37, 2020.

PÉREZ-VISO, B. et al. **Characterization of carbapenemase-producing *Serratia marcescens* and whole-genome sequencing for plasmid typing in a hospital in Madrid, Spain (2016-18)** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Oxford University Press, , 2021.

PETTY, L. A. et al. **Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-resistant enterobacteriaceae** *Infection and Drug Resistance* Dove Medical Press Ltd., , 2018.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 67, n. 7, p. 1597–606, Jul. 2012.

POP-VICAS, A.; OPAL, S. M. **The clinical impact of multidrug-resistant gram-negative bacilli in the management of septic shock** *Virulence* Taylor and Francis Inc., , 2014.

PORTO, A. et al. A novel OXA-10-like beta-lactamase is present in different Enterobacteriaceae. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 66, n. 2, p. 228–9, Feb. 2010.

POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. **The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae** *Drug Resistance Updates* Churchill Livingstone, , 1 Nov. 2016.

POWLES, M. A. et al. crossm In Vivo Efficacy of Relebactam ( MK-7655 ) in Combination with Imipenem-Cilastatin in Murine Infection Models. p. 13–17, 2018.

PRADO, G. V. B. DO. ***Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos : epidemiologia , avaliação genotípica e fenotípica.** [s.l.] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2019.

QUAINOO, S. et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical microbiology reviews*, v. 30, n. 4, p. 1015–1063, 2017.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.

RAMOS-CASTAÑEDA, J. A. et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *The Journal of infection*, v. 76, n. 5, 2018.

RIGATTO, M. H. et al. Multicenter Prospective Cohort Study of Renal Failure in Patients Treated with Colistin versus Polymyxin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 4, p. 2443–2449, 2016.

RODRÍGUEZ-AVIAL, I. et al. **In vitro activity of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomicin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains.** *International Journal of Antimicrobial*

Agents. **Anais...Elsevier**, 1 Dec. 2015.

ROMANOWSKA, J.; REUTER, N.; TRYLSKA, J. Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 81, n. 1, p. 63–80, 2013.

ROMÃO, C. et al. Presence of qacEΔ1 gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. **Current microbiology**, v. 63, n. 1, p. 16–21, Jul. 2011.

RUBIN, J. E. et al. NDM-1-producing Enterobacteriaceae from South Africa: Moving towards endemicity? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 3, p. 378–380, 2014.

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.-L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 21, 12 Dec. 2015.

SADER, H. S. et al. Antimicrobial resistance surveillance and new drug development. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, p. S5–S13, 15 Mar. 2019.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. **Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β-lactams and polymyxins** *Brazilian Journal of Microbiology* Elsevier Editora Ltda, , 1 Dec. 2016.

SANDNER-MIRANDA, L. et al. The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus *Serratia*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 828, 2018.

SANDS, K. et al. Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries. **Nature microbiology**, v. 6, n. 4, p. 512–523, 2021.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)**. [s.l: s.n.].

SARAVOLATZ, L. D.; STEIN, G. E. Plazomicin: A New Aminoglycoside. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 4, 2020.

SATAPOOMIN, N.; DULYAYANGKUL, P.; AVISON, M. B. *Klebsiella pneumoniae* Mutants Resistant to Ceftazidime-Avibactam Plus Aztreonam, Imipenem-Relebactam, Meropenem-Vaborbactam, and Cefepime-Taniborbactam. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. e0217921, 16 Mar. 2022.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. **Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance** *Journal of Intensive Care* BioMed Central Ltd., , 28 Jan. 2020.

SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 437, p. 3–6, 2005.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 Jul. 2014.

SERIO, A. W. et al. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 8 Feb. 2018.

SHAEER, K. M. et al. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. **Pharmacotherapy**, v. 39, n. 1, p. 77–93, 1 Jan. 2019.

SHARON, B. M. et al. Hybrid De Novo Genome Assembly for the Generation of Complete

- Genomes of Urinary Bacteria using Short- and Long-read Sequencing Technologies. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 174, 2021.
- SHEN, X. et al. Coexistence of blaNDM-1 and rmtC on a transferrable plasmid of a novel ST192 *Klebsiella aerogenes* clinical isolate. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3883–3891, 2019.
- SHENDURE, J.; AIDEN, E. L. The expanding scope of DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 1084–1094, 2012.
- SHEU, C. C. et al. **Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An update on therapeutic options** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 2019.
- SHI, Q. et al. Emergence of st15 *klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing plasmid-mediated rmtF and oxa-232 in China. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3125–3129, 2020.
- SHIRSHIKOVA, T. V et al. The ABC-Type Efflux Pump MacAB Is Involved in Protection of *Serratia marcescens* against Aminoglycoside Antibiotics, Polymyxins, and Oxidative Stress. **mSphere**, v. 6, n. 2, 2021.
- SIDJABAT, H. E. et al. Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4059–4066, 2015.
- SILVEIRA, M. C. et al. Genetic Basis of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated From Bloodstream in Brazil. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 635206, 2021.
- SINGHAL, T. Antimicrobial Resistance: The “Other” Pandemic!: Based on 9th Dr. I. C. Verma Excellence Award for Young Pediatricians Delivered as Oration on 19th Sept. 2021. **Indian Journal of Pediatrics**, n. 0123456789, 2022.
- SIROT, J. et al. *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated p-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: Epidemiologic studies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 850–859, 1988.
- SMITH, J. R.; RYBAK, J. M.; CLAEYS, K. C. Imipenem–Cilastatin–Relebactam: A Novel  $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections. **Pharmacotherapy**, v. 40, n. 4, p. 343–356, 2020.
- STONE, G. G.; PONCE-DE-LEON, A. In vitro activity of ceftazidime / avibactam and comparators against Gram-negative bacterial isolates collected from Latin American centres between 2015 and 2017. n. April, p. 1859–1873, 2020.
- SUAY-GARCÍA, B.; PÉREZ-GRACIA, M. T. **Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections** *Antibiotics* MDPI AG, , 1 Sep. 2019.
- SUTARIA, D. S. et al. First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, 2018.
- TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.
- TADA, T. et al. Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 4 Jul. 2017.

TAMMA, P. D. et al. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-*P. aerug.* **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 72, n. 7, p. e169–e183, 2021.

TAMMA, P. D.; HSU, A. J. Defining the Role of Novel  $\beta$ -Lactam Agents That Target Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 8, n. 3, p. 251–260, 1 Jul. 2019.

TANG, H.-J.; LAI, C.-C. Plazomicin-associated Nephrotoxicity. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 4, p. 1130–1131, 2020.

TAYLOR, E. et al. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK and Ireland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 2, p. 278–282, 1 Aug. 2018.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–9, Sep. 1995.

TERRENI, M.; TACCANI, M.; PREGNOLATO, M. **New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives** *Molecules* MDPI AG, , 2 May 2021.

THEURETZBACHER, U. et al. **Critical analysis of antibacterial agents in clinical development** *Nature Reviews Microbiology* Nature Research, , 1 May 2020.

THEURETZBACHER, U.; PAUL, M. **Developing a new antibiotic for extensively drug-resistant pathogens: the case of plazomicin** *Clinical Microbiology and Infection* Elsevier B.V., , 1 Dec. 2018.

THWAITES, M. et al. Evaluation of the bactericidal activity of plazomicin and comparators against multidrug-resistant enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, 2018a.

THWAITES, M. et al. Activity of plazomicin in combination with other antibiotics against multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 4, p. 338–345, 1 Dec. 2018b.

TIJET, N. et al. rmtD2, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 904–909, Feb. 2011.

TILAHUN, M. et al. Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. **Infection and drug resistance**, v. 14, p. 4363–4374, 2021.

TOBA, S. et al. Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily ( RND ) efflux pumps from *Serratia marcescens* , Db10. **Scientific Reports**, n. November 2018, p. 1–9, 2019.

TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673–9, Nov. 2002.

- TOMPKINS, K.; DUIN, D. VAN. Treatment for carbapenem - resistant Enterobacterales infections : recent advances and future directions. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, n. 0123456789, 2021.
- TOOKE, C. L. et al. Molecular Basis of Class A  $\beta$ -Lactamase Inhibition by Relebactam. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 10, 2019.
- TUON, F. F. et al. Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin B or colistin methanesulfonate sodium. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 4, p. 349–52, Apr. 2014.
- TUON, F. F.; ROCHA, J. L.; FORMIGONI, M. R. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime – avibactam : a systematic review. **Infection**, n. 0123456789, 2017.
- URBANOWICZ, P. et al. Pseudomonas aeruginosa with NDM-1, DIM-1 and PME-1  $\beta$ -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 10, p. 3117–3119, 2019.
- VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. **Versatility of aminoglycosides and prospects for their future****Clinical Microbiology Reviews**, 1 Jul. 2003.
- VAN DIJK, E. L. et al. The Third Revolution in Sequencing Technology. **Trends in genetics : TIG**, v. 34, n. 9, p. 666–681, 2018.
- VAN DUIN, D.; DOI, Y. **The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae****Virulence** Taylor and Francis Inc., , 19 May 2017.
- VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.
- VÁZQUEZ-UCHA, J. C. et al. **New carbapenemase inhibitors: Clearing the way for the  $\beta$ -lactams****International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 Dec. 2020.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.
- VINAL, K.; CONN, G. L. Substrate Recognition and Modification by a Pathogen-Associated Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methyltransferase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017.
- WACHINO, J.-I. et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 178–84, Jan. 2006.
- WACHINO, J. I. et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated Escherichia coli strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4401–4409, Dec. 2007.
- WACHINO, J. I.; DOI, Y.; ARAKAWA, Y. **Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases****Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 Dec. 2020.
- WALKTY, A. et al. In vitro activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011-2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2554–2563, 2014.

- WALKTY, A. et al. **In vitro activity of plazomicin against Gram-negative and Gram-positive bacterial pathogens isolated from patients in Canadian hospitals from 2013 to 2017 as part of the CANWARD surveillance study** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019.
- WANG, D. Y. et al. The road to avibactam: The first clinically useful non- $\beta$ -lactam working somewhat like a  $\beta$ -lactam. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1063–1084, 2016.
- WANG, J. et al. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 24, 5 Apr. 2017.
- WANG, X. et al. Analysis of the molecular characteristics of a blaKPC-2-harboring untypeable plasmid in *Serratia marcescens*. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, 7 Jul. 2021.
- WANG, Y. et al. Journal of Global Antimicrobial Resistance Resistance to ceftazidime – avibactam and underlying mechanisms. v. 22, p. 18–27, 2020a.
- WANG, Y. et al. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 22, p. 18–27, 2020b.
- WANGKHEIMAYUM, J. et al. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of enterobacteriaceae within a tertiary referral hospital of northeast India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, 2017.
- WANGKHEIMAYUM, J. et al. Erratum: Expansion of acquired 16S rRNA methyltransferases along with CTX-M-15, NDM and OXA-48 within three sequence types of *Escherichia coli* from northeast India (BMC Infectious Diseases (2020) 20 (544) DOI: 10.1186/s12879-020-05264-4). **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–5, 2020.
- WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147–51, Jan. 1991.
- WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. 1–22, 2017.
- WILSON, D. N. **Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance** *Nature Reviews Microbiology*, Jan. 2014.
- WINK, P. L. et al. Increased frequency of blaNDM in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 1, p. 299–301, Mar. 2021.
- WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome biology**, v. 15, n. 3, p. R46, 3 Mar. 2014.
- XIA, J. et al. Persistent spread of the rmtB 16S rRNA methyltransferase gene among *Escherichia coli* isolates from diseased food-producing animals in China. **Veterinary Microbiology**, v. 188, p. 41–46, 2016.
- XU, T. et al. Epidemiology and Mechanisms of Ceftazidime–Avibactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Engineering**, n. xxxx, 2021.
- YAHAV, D. et al. New  $\beta$ -lactam– $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, p. 1–61, 1 Jan. 2021.
- YANG, H. et al. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 21, p. 4427–4437, 2012.

- YANG, J. H.; SHENG, W. H.; HSUEH, P. R. Antimicrobial susceptibility and distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases among *Proteus*, *Providencia* and *Morganella* isolated from global hospitalised patients with intra-abdominal and urinary tract infections: R. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 398–407, 2020.
- YANG, Y. J.; WU, P. J.; LIVERMORE, D. M. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 755–8, May 1990.
- YEGANEH SEFIDAN, F.; MOHAMMADZADEH-ASL, Y.; GHOTASLOU, R. High-Level Resistance to Aminoglycosides due to 16S rRNA Methylation in Enterobacteriaceae Isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 9, p. 1261–1265, 2019.
- YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
- YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 141, n. 11, p. 1544–1557, Nov. 2017.
- YOKOYAMA, K. et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lancet (London, England)**, v. 362, n. 9399, p. 1888–93, 6 Dec. 2003.
- YONG, D. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, Dec. 2009.
- YOO, J. H. **The infinity war: How to cope with Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae** *Journal of Korean Medical Science* Korean Academy of Medical Science, , 2018.
- YUSUF, E. et al. An Update on Eight “ New ” Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. 2021.
- ZASOWSKI, E. J.; RYBAK, J. M.; RYBAK, M. J. The  $\beta$ -Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 8, p. 755–70, Aug. 2015.
- ZEMDRI. [**bula de remédio**] South San Francisco CA, USA: Achaogen, 2018.
- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.
- ZHANEL, G. G. et al. **Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2012.
- ZHANG, P. et al. Emergence of ceftazidime / avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. n. xxxx, p. 10–13, 2019.
- ZHANG, Y.; KASHIKAR, A.; BUSH, K. In vitro activity of plazomicin against  $\beta$ -lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 10, 2017.
- ZHAO, Z. et al. Evaluation of automated systems for aminoglycosides and fluoroquinolones susceptibility testing for Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, 1 Aug. 2017.

ZHONG, Y. et al. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 41, n. 1, p. 25–43, 1 Jan. 2020.

ZHU, Y. et al. Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5-a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacterales diagnosis. **Annals of translational medicine**, v. 9, n. 9, p. 769, May 2021.