

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Análises Clínicas

Caracterização molecular e fenotípica de *Klebsiella* spp. produtoras de NDM

Keila de Oliveira Lima

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo  
2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Análises Clínicas

Caracterização molecular e fenotípica de *Klebsiella* spp. produtoras de NDM

Keila de Oliveira Lima

Versão corrigida da Dissertação conforme a resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo  
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L732c Lima, Keila de Oliveira  
Caracterização molecular e fenotípica de  
Klebsiella spp. produtoras de NDM / Keila de  
Oliveira Lima. - São Paulo, 2021.  
72 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Complexo Klebsiella pneumoniae. 2.  
ceftazidima-avibactam. 3. NDM. 4. KPC. 5. aztreonam-  
avibactam. I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello ,  
orientador.

Keila de Oliveira Lima

Caracterização molecular e fenotípica de *Klebsiella* spp. produtoras de NDM

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio  
Orientador/Presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, 01 de dezembro de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por me capacitar e me abençoar a cada dia.

A minha mãe, Maria, e ao meu pai, Gedeão (*in memoriam*), por me educarem e me ensinarem princípios que formam o que sou hoje; em especial a minha mãe, pois sempre me incentivou e permitiu que eu conquistasse meus sonhos e desejos de estudo.

A minha irmã, Dalete, e ao meu cunhado, Ewerton, por me incentivarem e me ajudarem em todos os momentos.

Ao meu tio, Obed, por sempre me incentivar a seguir em meus estudos, e por, além de ser sobrinha, me adotar como filha; e também a minha tia, Rose, que, juntos, sempre acreditaram em mim e me ajudaram em todos os momentos.

As minhas primas, Livia e Laura, por me concederem momentos alegres em meio a tanto cansaço.

A todos os meus familiares e amigos, em especial a minha amiga, Nayara, por ser companheira em todos os anos, tanto nos momentos de desespero como nas alegrias.

A técnica Fabiana e a doutoranda Aline, pelo convívio diário, apoio, palavras de incentivo e parceria construída.

A meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, pela sua inteira disponibilidade, pelas suas correções e incentivo, pela oportunidade, ensino e paciência. Por ser um incentivador, pelo amor, ética e compromisso ao ensino e a pesquisa.

Ao Instituto Fleury por disponibilizar os isolados para realização do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais esse objetivo.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembra-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

## RESUMO

LIMA, K. O. **Caracterização molecular e fenotípica de *Klebsiella* spp. produtoras de NDM.** 2021.72f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O perfil de resistência, que algumas das espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae* podem expressar, representa uma grande ameaça à saúde humana, particularmente quando resistentes aos carbapenêmicos, que são amplamente utilizados no tratamento de infecções graves em pacientes hospitalizados. O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a produção de carbapenemases, particularmente dos tipos KPC e NDM. Um dos compostos desenvolvidos para o tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de KPC é a combinação ceftazidima-avibactam (CAZ-AVI), mas que não tem atividade inibitória sobre metalo-betalactamases, a exemplo das NDMs. Os objetivos deste trabalho foram determinar a frequência das espécies do complexo *K. pneumoniae* e da coprodução de KPC, avaliar a clonalidade dos isolados, a sensibilidade ao aztreonam-avibactam (ATM-AVI), o desempenho do disco de meropenem (MEM) com inibidores para detecção de coprodução de NDM e KPC e desenvolver um teste de triagem para prever a sensibilidade ao ATM-AVI. Um total de 113 isolados do complexo *K. pneumoniae* produtoras de NDM ou coprodutoras de NDM e KPC, provenientes da coleção de bactérias do Grupo Fleury, coletadas períodos pré e pós início do uso de CAZ-AVI no Brasil, foram utilizadas neste estudo. A identificação da espécie e a presença dos genes  $bla_{NDM}$  e  $bla_{KPC}$  foi confirmada por PCR multiplex. A clonalidade dos isolados foi avaliada por eletroforese em campos pulsados (PFGE) após clivagem com XbaI. A produção de carbapenemases foi confirmada utilizando-se o teste Blue Carba. O desempenho dos discos de meropenem e CAZ-AVI contendo um ou mais inibidores de carbapenemases foi comparado com o teste molecular. A pré-difusão combinada foi realizada pré-incubando-se o ágar não inoculado com disco de CAZ-AVI, e a seguir aplicando-se o inóculo bacteriano e um disco de ATM após remover o disco de CAZ-AVI. Após incubação, os halos foram aferidos e correlacionados com a concentração inibitória mínima para ATM-AVI. As CIMs para ATM e ATM-AVI foram determinadas segundo o EUCAST. A identificação das espécies por PCR evidenciou as seguintes frequências: *K. pneumoniae* 75,2% (n=85); *K. quasipneumoniae* 16,8% (n=19), e *K. variicola* 8% (n=9). Uma fração de 12,4% (n=14) dos isolados apresentaram os genes  $bla_{NDM}$  e  $bla_{KPC}$  e 87,6% (n=99) apenas  $bla_{NDM}$ . A análise dos perfis de PFGE de *K. pneumoniae* evidenciou a presença de cinco grupos clonais predominantes. Isolados do principal grupo clonal Ap (n=15) foram detectados nas cidades de São Paulo e Porto Alegre durante todo o período analisado. O grupo clonal Lp foi detectado nas cidades de São Paulo e Recife em 2019. Os dois principais grupos clonais no período pré-CAZ-AVI continham maior número de isolados do que aqueles no período de uso do CAZ-AVI. Os perfis de PFGE de *K. quasipneumoniae* evidenciaram quatro grupos clonais predominantes, e presentes apenas no estado de São Paulo, com persistência do grupo clonal Aq desde 2017. Quanto à *K. variicola*, foram observados dois grupos clonais predominantes Av e Bv, o primeiro presente apenas em São Paulo desde 2018 e o segundo em Porto Alegre apenas em 2019. Calculando-se a diferença entre os diâmetros de halo do disco MEM contendo EDTA e ácido fenilborônico (AFB) e o maior dos halos obtidos para MEM com EDTA ou AFB, observou-se que todos os isolados com coexpressão de KPC e NDM apresentaram diferença  $\geq 5$  mm. Uma fração de 42,3% dos isolados positivos apenas para  $bla_{NDM}$  apresentaram sensibilidade para ATM (CIM  $\leq 4$  mg/L). Todos os isolados testados apresentaram CIM para ATM-AVI  $\leq 1/4$  mg/L, sendo a CIM<sub>90</sub> 0,125/4 mg/l. No teste de pré-difusão combinada, o menor diâmetro de halo obtido foi de 23 mm. A espécie predominante na amostragem foi *K. pneumoniae*. A disseminação clonal, observada neste estudo, contrasta com a diversidade clonal descrita em outros locais do mundo para produtores de NDM, exceto Grécia e China. Considerando os pontos de corte atuais para ATM, é provável que haja resposta clínica adequada no uso de ATM-AVI no tratamento de infecções causadas por isolados produtores de NDM e coprodutores de KPC e NDM. Utilizando-se o valor de corte de 5 mm para a diferença entre halos de inibição, de MEM com AFB e EDTA e o segundo maior halo com inibidor, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade foi de 96,1,0%. O método de pré-difusão com CAZ-AVI e ATM é um método simples e o diâmetro  $\geq 23$  mm tem excelente correlação com a CIM para ATM-AVI  $\leq 1/4$  mg/L.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*; *Klebsiella quasipneumoniae*; *Klebsiella variicola*; ceftazidima-avibactam; NDM; KPC; aztreonam-avibactam; pré-difusão

## ABSTRACT

LIMA, K. O. **Molecular and phenotypic characterization of *Klebsiella* spp. NDM producers.** 2021. 72f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The resistance profile, which some species of the *Klebsiella pneumoniae* complex may express, represent a great threat to human health, particularly when resistant to carbapenems, which are widely used in the treatment of severe infections in hospitalized patients. The main mechanism of resistance to carbapenems is the production of carbapenemases, particularly KPCs and NDMs. One of the compounds developed for the treatment of infections caused by KPC-producing strains is the combination ceftazidime-avibactam (CAZ-AVI), but which has no inhibitory activity on metallo-beta-lactamases, as is the case for NDMs. The objectives of this work were to determine the frequency of *K. pneumoniae* complex species and KPC co-production, evaluate the clonality of isolates, the susceptibility to aztreonam-avibactam (ATM-AVI), the performance of meropenem (MEM) disks with inhibitors for detecting NDM co-production and KPC and develop a screening test to predict sensitivity to ATM-AVI. A total of 113 NDM-producing or NDM and KPC co-producing *K. pneumoniae* complexes, from the Fleury Group's bacteria collection, collected in the pre- and post-starting periods of CAZ-AVI use in Brazil, were used in this study. Species identification and the presence of the *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> genes were confirmed by multiplex PCR. The clonality of the isolates was evaluated by pulsed field electrophoresis (PFGE) after cleavage with XbaI. Carbapenemase production was confirmed using the Blue Carba test. The performance of MEM and CAZ-AVI disks containing one or more carbapenemase inhibitors was compared with the molecular test. Combined pre-diffusion was performed by pre-incubating the uninoculated agar with a CAZ-AVI disk, and then applying the bacterial inoculum and an ATM disk after removal of the CAZ-AVI disk. After incubation, halos were measured and correlated with the minimum inhibitory concentration (MIC) for ATM-AVI. ATM and ATM-AVI MICs were determined according to EUCAST. The identification of species by PCR evidenced the following frequencies: *K. pneumoniae* 75.2% (n=85); *K. quasipneumoniae* 16.8% (n=19), and *K. variicola* 8% (n=9). A fraction of 12.4% (n=14) of the isolates had the *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> genes and 87.6% (n=99) had only *bla*<sub>NDM</sub>. The analysis of the PFGE profiles of *K. pneumoniae* evidenced the presence of five predominant clonal groups. Isolates from the main clonal group Ap (n=16) were detected in the cities of São Paulo and Porto Alegre throughout the analyzed period. The clonal group Lp was detected in the cities of São Paulo and Recife 2019. The PFGE profiles of *K. quasipneumoniae* showed four predominant clonal groups, present only in the state of São Paulo, with persistence of the clonal group Aq since 2017. As for *K. variicola*, two predominant clonal groups Av and Bv were observed, the first present only in São Paulo since 2018 and the second in Porto Alegre only in 2019. Calculating the difference between the inhibition zone diameters of the MEM disk containing EDTA and phenylboronic acid (AFB) and the largest of the inhibition zone diameters obtained for MEM with EDTA or AFB, it was observed that all isolates with co-expression of KPC and NDM showed a difference  $\geq 5$  mm. A fraction of 42.3% of isolates positive only for *bla*<sub>NDM</sub> showed sensitivity to ATM (MIC  $\leq 4$  mg/L). All tested isolates presented MIC for ATM-AVI  $\leq 1/4$  mg/L, being the MIC<sub>90</sub> 0.125/4 mg/l. In the combined pre-diffusion test, the smallest inhibition zone diameter obtained was 23 mm. The predominant species in the sample was *K. pneumoniae*, but a significant fraction of the other species in the complex was also observed in the sample. The clonal spread observed in this study contrasts with the clonal diversity described elsewhere in the world for NDM-producing isolates, except Greece and China. Considering the current cut-off points for ATM, it is likely that there is an adequate clinical response in the use of ATM-AVI in infections caused by NDM-producing and KPC-NDM co-producing isolates in Brazil. Using the cutoff value of 5 mm for the difference between inhibition zones, of MEM with AFB and EDTA and the second largest zone of MEM with inhibitor, the sensitivity was 100% and the specificity was 96.1%. The pre-diffusion method with CAZ-AVI and ATM is a simple method and the diameter  $\geq 23$  mm has excellent correlation with the MIC for ATM-AVI  $\leq 1/4$  mg/L.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; *Klebsiella quasipneumoniae*; *Klebsiella variicola*; ceftazidime-avibactam; NDM; KPC; aztreonam-avibactam; disk pre-diffusion



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Taxonomia do gênero <i>Klebsiella</i> .....	12
1.2 Ceftazidima-avibactam .....	16
1.3 New Delhi metalo-betalactamase (NDM) .....	18
1.4 New Delhi Metalo-betalactamase (NDM) no mundo.....	25
1.5 New Delhi Metalo-betalactamase (NDM) no Brasil.....	27
2. OBJETIVOS .....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1 Testes fenotípicos para detecção de carbapenemases .....	30
3.2 Teste Blue Carba .....	31
3.3 Disco aproximação de ceftazidima/avibactam com aztreonam .....	32
3.4 Determinação de concentrações inibitórias mínimas para ATM e ATM-AVI e cálculo do ponto de corte epidemiológico (ECOFF) .....	32
3.5 Pré-difusão com disco combinado.....	33
3.6 Identificação da espécie .....	33
3.7 Detecção dos genes <i>bla<sub>NDM</sub></i> e <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....	34
3.5 Tipagem molecular por eletroforese de campos pulsados (PFGE) .....	35
4 RESULTADOS.....	36
5 DISCUSSÃO .....	55
6 CONCLUSÕES .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXO 1 .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

*Klebsiella* é um gênero bacilos Gram-negativos que pertence à família *Enterobacteriaceae*. O perfil de resistência, que algumas das espécies deste gênero podem expressar, representa uma grande ameaça à saúde humana, particularmente quando resistentes aos carbapenêmicos, e principalmente em pacientes hospitalizados (ELLIOTT et al., 2016; HERRIDGE et al., 2020; OLIVEIRA, C. B. S. D. et al., 2011).

A resistência bacteriana observada nesses bacilos Gram-negativos tem se tornado um dos problemas mais frequentes em âmbito hospitalar, causando a falha em tratamentos, aumento de custos e de mortalidade. A expansão dessa multirresistência é facilitada pela pressão seletiva decorrente do uso de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), tanto no Brasil, como no mundo (GOLZARRI et al., 2019).

Os carbapenêmicos pertencem à classe dos  $\beta$ -lactâmicos. O primeiro composto desta classe, a penicilina, foi descoberto por acaso em 1928, quando Alexander Fleming, observou em seus experimentos o crescimento de um fungo do gênero *Penicillium* em uma placa onde havia cultura de estafilococos. Ele verificou que as colônias não cresciam ao redor do fungo. Apesar da grande descoberta, o uso da penicilina só foi iniciado em 1939; porém em 1940 já se observou cepas resistentes a este composto (TAVARES, 2000).

Os betalactâmicos consistem em uma classe de antimicrobianos que incluem derivados de penicilinas, e diferem de acordo com a estrutura química dos radicais ligados ao anel betalactâmico, essencial para sua ação antimicrobiana. Podem ser divididos em classes como penicilinas, associações de  $\beta$ -lactâmicos e inibidores de betalactamases, cefens, monobactâmicos e penens (MIGUEL, 2013).

Abraham e Chain relataram em 1940 a inativação enzimática de  $\beta$ -lactâmicos realizada por betalactamases, que são enzimas que hidrolisam o anel betalactâmico. Desde então foram descritas diversas outras betalactamases, o que tornou necessária a sua classificação de acordo com características químicas e moleculares. Foram divididas em dois grandes grupos, de acordo com seu grupo ativo: metalo-betalactamases (MBLs), pela presença de íons de zinco no sítio catalítico e serino-betalactamases com resíduo de serina em seu sítio ativo (BERTONCHELI; HORNER, 2008; BUSH, 1998).

Em 1980, Ambler classificou as betalactamases de acordo com a sequência de aminoácidos, dividindo-as em grupos A, B, C e D. As classificações A, C e D incluem as serino-betalactamases enquanto o grupo B abrange as metalo-betalactamases (AMBLER, 1980).

Anos mais tarde, em 1989, Bush e Jacoby subdividiram as classificações de A, B, C e D em mais 4 grupos, além de algumas modificações. Essas classificações foram realizadas de acordo com sequenciamento e atividade de hidrólise preferencial dos substratos; portanto, os quatro grupos foram subdivididos em 1, 1e, 2a, 2b, 2be, 2br, 2f, 2de, 2df, 3a e 3b. Dentro dessas subdivisões estão classificadas as diversas enzimas atualmente conhecidas. Destacando-se pela alta disseminação e capacidade de inativação da maioria absoluta dos  $\beta$ -lactâmicos, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e New Delhi Metalo-betalactamase (NDM) são os grupos de enzimas de maior importância clínica atualmente. O primeiro tem um resíduo de serina e o segundo duas moléculas de zinco em seu sítio ativo (BUSH, 2013; BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

A primeira descrição de metalo-betalactamase foi em 1966 em um isolado de *Bacillus cereus*. Mediada por plasmídeos em microrganismos de importância clínica e capazes de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos disponíveis no mercado, com exceção do monobactâmico aztreonam (ATM), esse grupo de enzimas tem se tornado um problema crescente em função das limitadas opções terapêuticas (BERTONCHELI; HORNER, 2008).

O aztreonam foi o primeiro  $\beta$ -lactâmico totalmente sintético. É capaz de inibir a síntese da parede celular, devido à sua afinidade pela proteína de ligação à penicilina (PBP3), atuando na última fase da síntese. Aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1986, é um monobactâmico eficaz contra bactérias Gram-negativas. Não sofre hidrólise pelas metalo-betalactamases de classe B, devido a ligações pobres com essas enzimas; entretanto, são instáveis perante outras betalactamases, como serino-betalactamases, incluindo ESBLs, AmpCs e KPCs. A grande preocupação é que cepas produtoras de NDM muitas vezes também possuem genes que codificam ESBLs ou KPCs, ambas capazes de hidrolisar o aztreonam (BIEDENBACH et al., 2015; CHILDS; BODEY, 1986; RAMSEY; MACGOWAN, 2016; SHIELDS; DOI, 2020; TAMMA; HSU, 2019).

Com a disseminação de cepas produtoras de carbapenemases, houve uma demanda crescente pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos. Em 2011, a

agência Food and Drug Administration (FDA), através do programa Antibiotic Incentives Now Act 2011, elaborou ações para o desenvolvimento e aprovação de novos antimicrobianos e aumentar as opções de tratamento de infecções por microrganismo multirresistentes, além de propor medidas de controle da disseminação dessas cepas. Em 2015, foi introduzida em uso clínico a combinação ceftazidima-avibactam (MOSLEY et al., 2016). Apesar do uso no Brasil ter sido aprovado em novembro de 2018 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018), a comercialização só foi iniciada em março de 2019.

As suas indicações de bula são infecção intra-abdominal complicada, infecções graves do trato urinário, incluindo pielonefrite, pneumonia adquirida no hospital (PAH) e casos de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV). Possui potente ação inibidora de betalactamases, com atividade *in vitro* contra *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, expressando KPC ou OXA-48, mas não contra outras betalactamases das classes B e D de Ambler (SHIELDS et al., 2018).

Há estudos datados de 2017 que demonstraram o surgimento de cepas resistentes a esta combinação, o que torna preocupante o fato da administração desse antibiótico para tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, sem a identificação correta da enzima produzida, considerando que ceftazidima-avibactam não tem atividade contra isolados produtores de metalo-betalactamases, incluindo NDM (SHIELDS et al., 2017).

Devido ao surgimento de cepas resistentes a CAZ-AVI, principalmente quando há a presença de genes *bla*<sub>NDM</sub>, diversos estudos têm sido desenvolvidos para verificar a atividade *in vitro* e *in vivo* da associação de CAZ-AVI e ATM. Muitos deles têm demonstrado a eficácia clínica dessa associação. Há também, ainda em desenvolvimento clínico, a combinação aztreonam-avibactam, a qual vem demonstrando ser muito eficaz no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, mas ainda não há disponibilidade para uso clínico dessa combinação (BIEDENBACH et al., 2015; EMERAUD et al., 2019; SADER et al., 2018).

Vários trabalhos têm demonstrado a disseminação clonal de isolados produtores de KPC no Brasil e no mundo. Este trabalho tem como objetivos avaliar a epidemiologia molecular de *Klebsiella* spp. produtora de NDM e coprodutora de NDM e KPC nos períodos pré e pós introdução da ceftazidima-avibactam em uso clínico no

Brasil e desenvolver um teste simples para prever a atividade da combinação aztreonam com avibactam.

### 1.1 Taxonomia do gênero *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella* é composto por bacilos Gram-negativos, que podem expressar cápsula, medem cerca de 0,5 a 5,0 µm e são anaeróbios facultativos. Este gênero tem sofrido revisões taxonômicas frequentes, com descrição de novas espécies, inclusão e transferência de espécies para outro gênero. Atualmente, o gênero *Klebsiella* abrange 14 espécies e sete subespécies (DRANCOURT et al., 2001; **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**, 2021; PARTE et al., 2020; TINDALL ; SUTTON; GARRITY, 2017).

Tabela 1 - Nomenclatura das espécies e subespécies de *Klebsiella*

Nomenclatura anterior	Nomenclatura atual
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
<i>Klebsiella africanensis</i>	<i>Klebsiella africana</i>
<i>Klebsiella alba</i>	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i>
<i>Klebsiella granulomatis</i>	<i>Klebsiella granulomatis</i>
<i>Klebsiella grimontii</i>	<i>Klebsiella grimontii</i>
<i>Klebsiella huaxiensis</i>	<i>Klebsiella huaxiensis</i>
<i>Klebsiella indica</i>	<i>Klebsiella indica</i>
<i>Klebsiella michiganensis</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>
<i>Klebsiella mobilis</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
<i>Klebsiella pasteurii</i>	<i>Klebsiella pasteurii</i>
<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Raoultella planticola</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>Klebsiella singaporensis</i>	<i>Klebsiella variicola</i>
<i>Klebsiella spallanzanii</i>	<i>Klebsiella spallanzanii</i>
<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i>
<i>Klebsiella trevisanii</i>	<i>Raoultella planticola</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i>
<i>Klebsiella variicola</i> subsp. <i>tropicalensis</i>	<i>Klebsiella variicola</i> subsp. <i>tropica</i>
	<i>Klebsiella variicola</i> subsp. <i>variicola</i>

Fonte: (**List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**, 2021) Acesso em: 19 de setembro de 2021.

A principal espécie deste gênero, agente de infecções em humanos, é a *K. pneumoniae*, responsável por 75% a 86% das infecções, seguida pela *K. oxytoca* (13% a 25%). Estas duas espécies podem ser diferenciadas pela produção de indol. As espécies *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* guardam grande semelhança fenotípica entre si e, portanto, a diferenciação entre elas só pode ser realizada de forma segura por métodos moleculares. As publicações científicas sobre a frequência das espécies do complexo *K. pneumoniae* têm demonstrado que a maioria dos casos de infecções em humanos é causada por *K. pneumoniae*, com uma proporção menor de infecções causadas por *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

Frequentemente, os isolados de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*, por compartilharem as mesmas características bioquímicas e fenotípicas, são identificados equivocadamente como *K. pneumoniae*. O sequenciamento dos genes rRNA16S, *rpoB*, *fusA*, *gapA*, *gyrA* e *leuS* permitiu evidenciar a presença de grupos filogenéticos distintos denominados KpI, KpII-A, KpII-B e KpIII, no qual *K. pneumoniae* corresponde ao grupo KpI, enquanto *K. quasipneumoniae* aos grupos KpII-A e KpII-B e *K. variicola* ao grupo KpIII (BLIN et al., 2017; BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014).

Apesar de *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* se apresentarem como patógenos oportunistas e menos virulentos em humanos que *K. pneumoniae*, eles têm se revelado importantes na clínica (BRISSE et al., 2014).

Visando facilitar a identificação das espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae*, foi criada uma PCR multiplex, baseada no fato de que os genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OKP</sub>* e *bla<sub>LEN</sub>* estão presentes em *K. pneumoniae*; *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* respectivamente, flanqueados pelo mesmo gene *deorR*. Em função dessas diferenças, foi possível desenvolver uma PCR multiplex obtendo-se produtos de amplificação com tamanhos distintos para as três espécies (FONSECA et al., 2017).

Nos últimos anos, *K. pneumoniae*, tornou-se uma grande preocupação clínica, devido à sua prevalência crescente em infecções humanas, e por frequentemente apresentarem perfil de multirresistência (SAMPAIO, J. L.; GALES, 2016; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

No Brasil, um estudo epidemiológico abordou pacientes com câncer entre 2017 e 2019, foram incluídos nesse estudo diferentes amostras clínicas, dos quais foram realizados testes de sensibilidade aos antibióticos e testes moleculares de detecção

a carbapenemases. Verificou-se a alta prevalência de infecções por *K. pneumoniae* multirresistentes adquiridas até 72h após a internação. Outros estudos também relataram a presença de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 resistente a polimixina B com uma taxa alarmante de 27,1%. Recentemente outro estudo foi publicado com uma taxa também preocupante de 23,8% de cepas resistentes a polimixina B. Esses estudos evidenciam a necessidade de medidas mais rígidas de controle de infecções e maior racionalização do uso de antimicrobianos (SAMPAIO, S. C. F. et al., 2021; SANTOS et al., 2020; WYRES et al., 2020).

*K. variicola* foi descrita em 2004, tendo sido isolada da superfície de vegetais e de ambientes hospitalares. Após a descrição inicial já foi detectada em diversas fontes ambientais e como patógeno humano em sangue, aspirado traqueal, secreções do trato respiratório e urinário e feridas cirúrgicas causando diversas infecções graves (BARRIOS-CAMACHO et al., 2019; ROSENBLUETH et al., 2004).

Alguns estudos demonstram que a prevalência real de infecções causadas por *K. variicola* são subestimadas em função do uso de métodos imprecisos de identificação. Apesar de não ser tão bem estudada quanto a *K. pneumoniae*, alguns trabalhos evidenciaram características diferentes em relação às infecções causadas por esse microrganismo, como por exemplo menor virulência que a *K. pneumoniae*; por isso a importância da identificação correta e precoce (DE CAMPOS et al., 2021; RAMOS; NASCIMENTO, 2021).

No Brasil, recentemente foi publicado um estudo que avaliou cepas recuperadas de pacientes entre os anos de 1987 e 1999, as quais foram identificadas inicialmente com *K. pneumoniae*. Quando reavaliadas, das 68 cepas identificadas, cinco eram *K. variicola*. Esses isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, e foi verificada a já resistência a alguns antibióticos, como fluoroquinolonas e ertapenem. Curiosamente este último antimicrobiano só foi aprovado pelo FDA 14 anos após o isolamento dessa cepa. Esse estudo evidencia que esse patógeno já circula pelo país desde a década de 1980 (VALIATTI et al., 2021).

Diversos outros estudos têm identificado isolados clínicos de *K. variicola* pelo Brasil, tanto em infecções humanas, quanto em plantas e alimentos. Apontando para presença de genes de ESBL e de carbapenemases como KPC e NDM. Mutações no gene *mgrB* também foram encontradas mediando a resistência às polimixinas. Um estudo também verificou características moleculares e genômicas de *K. variicola*,

descrevendo a presença de fatores de virulência em grupos clonais (ALVES et al., 2006; COURA et al., 2021; DE CAMPOS et al., 2021; DOS SANTOS MELO-NASCIMENTO et al., 2020; LENZI et al., 2021; LONG et al., 2017; TAGLIAFERRI et al., 2020).

Na Suécia, um estudo analisou 139 isolados de pacientes com infecção da corrente sanguínea por *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* entre 2007 e 2009 e verificou que pacientes infectados com *K. variicola* apresentavam uma maior taxa de mortalidade em 30 dias e houve uma frequência significativa de *K. variicola* (24,4%), demonstrando assim sua importância clínica (MAATALLAH et al., 2014).

A espécie *K. quasipneumoniae* foi escrita em 2014, juntamente com duas subespécies *K. quasipneumoniae* subsp *quasipneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae*. A princípio achava-se que essa espécie estava relacionada apenas à agricultura e meio ambiente, porém foi detectada como agente de infecções em humanos. Alguns relatos recentes descrevem a capacidade dessa espécie em albergar fatores de virulência e adquirir genes de resistência a antimicrobianos (BARRIOS-CAMACHO et al., 2019; MATHERS et al., 2019).

No Brasil não há muitos relatos dessa espécie, entretanto alguns estudos analisaram a sequência genômica de isolados clínicos de *K. quasipneumoniae*. Amostras provenientes de um hospital universitário brasileiro foram identificadas como *K. quasipneumoniae* subsp *quasipneumoniae* produzindo KPC-2 e *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae* produzindo NDM-1 em 2014 e 2017 respectivamente. Um outro estudo relatou um isolado de *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae* de uma infecção nosocomial, em um hospital do sudeste do Brasil, produzindo KPC-2 e OKP-B-6. Esses dados contribuem para melhor entendermos a epidemiologia das infecções causadas por esta espécie (FUGA et al., 2020; NICOLAS et al., 2018).

*K. quasipneumoniae* tem sido detectada não só em amostras clínicas, mas estudos também relataram a presença desses microrganismos em moscas e em água de tratamento de esgoto. No Rio de Janeiro foram encontradas *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae* produtora do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>CTXM-15</sub>, o que mostra os insetos como reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos (CARRAMASCHI et al., 2021; FURLAN et al., 2020).

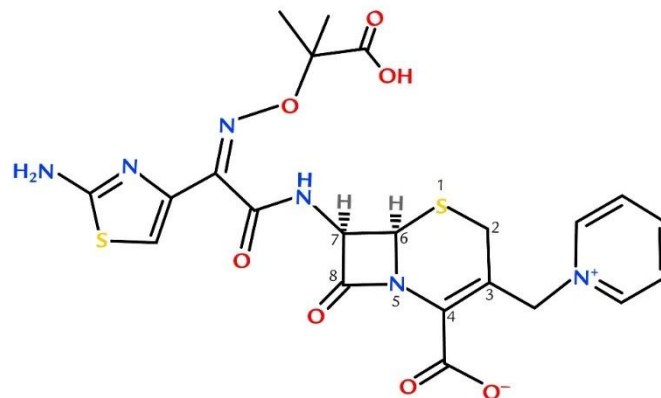


## 1.2 Ceftazidima-avibactam

Com a aprovação em fevereiro de 2015 pela agência FDA, a ceftazidima/avibactam foi liberada para o tratamento de adultos com infecções intra-abdominais complicadas (cIAC) em associação ao metronidazol, e infecções do trato urinário (cUTI), incluindo pielonefrite. Também recebeu aprovação para uso em casos de pneumonia adquirida no hospital (PAH) e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV)(FDA, 2015).

Trata-se de uma combinação de um antibiótico betalactâmico com um inibidor não betalactâmico de betalactamase. O primeiro componente é ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração. A ceftazidima atua ligando-se às transpeptidases, também designadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP's), fundamentais para a síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana. Possui em sua estrutura química um radical com o grupo 2-aminotiazol que confere aumento na afinidade pelas PBP's e uma vantagem sobre as outras cefalosporinas de terceira e quarta gerações, pois com esse radical elas se tornam um substrato ruim para algumas betalactamases (Figura 1), como TEM e algumas variantes de SHV (MOSLEY et al., 2016; SHARMA; PARK; MOY, 2016; SHIRLEY, 2018).

Figura 1 - Estrutura química da ceftazidima



Fonte: Sharma; Park, Moy (2016)

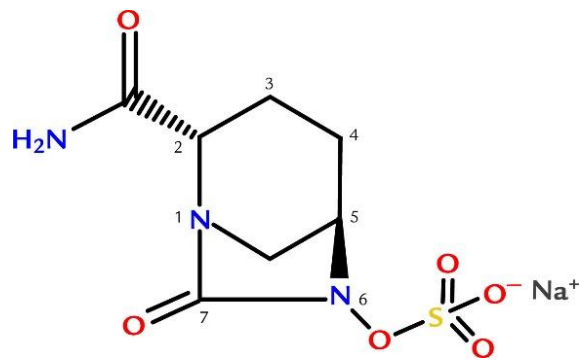
A ceftazidima apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas e alguma atividade contra bactérias Gram-positivas; entretanto, diferente de outros antimicrobianos de sua geração, a ceftazidima apresenta um radical ácido dimetilacético  $\alpha$ -carbono ao invés do metoxiamino. Isso aumenta sua potência contra *Pseudomonas* e em menor grau contra *Enterobacterales*. Por outro lado, essa

alteração lhe confere menor atividade contra bactérias Gram-positivas do que aquelas das cefalosporinas de primeira e segunda gerações. Também há a inclusão de cadeias laterais de propilcarboxi, que aumentam a afinidade por PBPs de *Pseudomonas*, e menor indução de algumas betalactamases de classes A e C (SHARMA et al., 2016).

O avibactam é um inibidor de betalactamases não betalactâmico, diferentemente de outros inibidores em uso clínico, como o tazobactam, clavulanato e sulbactam. Possui uma estrutura de ácido diazobiciclo-octano (DBO) (Figura2), e um anel de cinco membros que foi projetado para ser semelhante ao grupo carbonila dos betalactâmicos. Este mimetismo molecular permite um rápido reconhecimento e formação rápida de um aduto com as betalactamases (DRAWZ; PAPP-WALLACE; BONOMO, 2014; FALCONE; PATERSON, 2016).

Diferentemente dos outros inibidores, que se ligam irreversivelmente às betalactamases caracterizando uma ação “suicida”, o avibactam se liga reversivelmente às betalactamases pela ligação carbamoil entre o inibidor e o resíduo de serina no sítio ativo (DRAWZ et al., 2014).

Figura 2 Estrutura química do avibactam



Fonte: Sharma; Park, Moy (2016)

O avibactam em combinação com a ceftazidima possui atividade de inibição de amplo espectro podendo inibir as betalactamases das classes de A e C e algumas da classe D de Ambler; entretanto para bactérias anaeróbicas e Gram-positivas sua atividade é limitada e para betalactamases de classe B e a maioria daquelas de classe D não possui ação inibitória. Diversos estudos descrevem a redução nos valores de CIM para espécies como *E. coli* e *Klebsiella* resistentes à ceftazidima, *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de betalactamases dos tipos PER, OXA, TEM e VEB, e

*Acinetobacter baumannii* produtor de betalactamases dos tipos OXA-40, OXA-69 e OXA-95 (SHIRLEY, 2018; WANG et al., 2020).

Estudos já comprovaram a resistência a este antimicrobiano, pela expressão de genes de carbapenemases de classe B e alguns de classe D, mas também pelo aumento da atividade de bombas de efluxo, perda de porinas, aumento da expressão do gene *bla<sub>KPC</sub>*. Também tem sido descrita a resistência decorrente de mutações nas PBPs relacionadas à resistência à ceftazidima, que não pode ser revertida pelo avibactam, e por mutações na alça  $\Omega$  das KPCs, que aumentam a eficiência de hidrólise da ceftazidima e reduzem significativamente sua afinidade pelo avibactam (YAHAV et al., 2020).

### 1.3 New Delhi metalo-betalactamase (NDM)

As metalo-betalactamases diferem das serino-betalactamases pela presença de íons de zinco em seu sítio ativo e são subclassificadas em B1, B2 e B3 de acordo com o número de íons de zinco presentes. As enzimas da subclasse B1 e B3 possuem dois íons de zinco no sítio ativo, já a subclasse B2 apresenta apenas um íon de zinco. A maioria das metalo-betalactamases conhecidas, a exemplo de NDM (New Delhi Metalo-betalactamase), VIM (metalo-betalactamase de Verona codificada por integron) e IMP (imipenemase), pertence à subclasse B1. Apesar da semelhança com outras metalo-betalactamases, as NDMs diferem das demais metalo-betalactamases por possuírem lipidação e serem ancoradas no folheto interno da membrana externa das bactérias Gram-negativas (BASU, 2020; GALLENINI et al., 2001; GARAU et al., 2004).

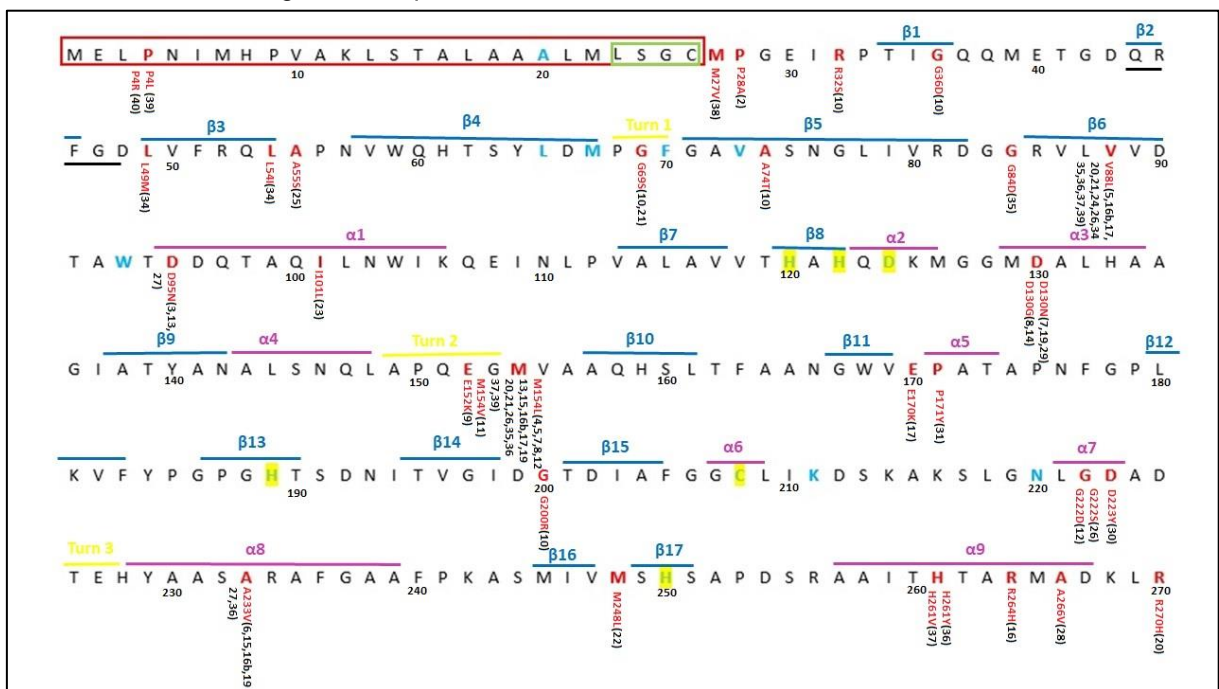
A New Delhi Metalo-betalactamase (NDM) é um grupo que atualmente abrange 41 variantes e pertence ao subgrupo 3a de Bush e Jacoby. São capazes de hidrolisar betalactâmicos, incluindo carbapenêmicos, mas não são ativas contra monobactâmicos, e são inibidas por quelantes de metal, como por exemplo o EDTA (BUSH et al., 1995; NAAS, 2017).

As NDMs são lipoproteínas que se ancoram no folheto interno da membrana externa das bactérias Gram-negativas, devido à presença de uma sequência de aminoácidos lipidados LSGC no final do peptídeo sinal. Essa ancoragem provoca o aumento da sua estabilidade quando há escassez de zinco, e facilita a secreção de NDMs nas vesículas de membrana externa. A privação de zinco reduz a atividade das

NDMs, porém as vesículas de membrana contendo as enzimas protegem as bactérias ao seu redor da ação dos betalactâmicos, além de servir como meio de transporte de NDM (GONZALEZ et al., 2016; WU et al., 2019).

As enzimas NDM são compostas por 270 ou mais aminoácidos, contendo dois íons de zinco essenciais para a hidrólise do anel betalactâmico. Sua estrutura secundária possui nove hélices  $\alpha$ , 17 cadeias  $\beta$  e três giros. Até o momento, há relatos de substituições em 28 posições e na variante NDM-18 há uma repetição de cinco aminoácidos, resultando em 41 variantes de NDMs (Figura 3), das quais duas ainda estão atribuídas. A substituição mais comum é a M154L, observada em 16 das 41 variantes, a V88L observada em 12 das variantes e A233V observada em seis das 41 variantes já identificadas. Geralmente ocorrem cerca de um a cinco substituições de aminoácidos de uma variante de NDM para outra (NAAS, 2017; WU et al., 2019).

Figura 3 - Sequência de aminoácidos NDM-1 e suas variantes



Legenda: Sinal peptídico enquadrado com linhas vermelhas; caixa de lipidação em verde; as hélices  $\alpha$  indicadas com retas roxas; hélices  $\beta$  com retas azuis; giros em retas amarelas; as letras em negrito azul são aminoácidos ativos de NDM-1 e os resíduos da ligação com o zinco estão destacados em amarelo; os aminoácidos em vermelho são para destacar as substituições com as variantes marcadas entre parênteses em preto. Fonte: Modificado pelo autor, de Wu et al (2019); de NAAS (2017) Acesso em 30 de novembro de 2021.

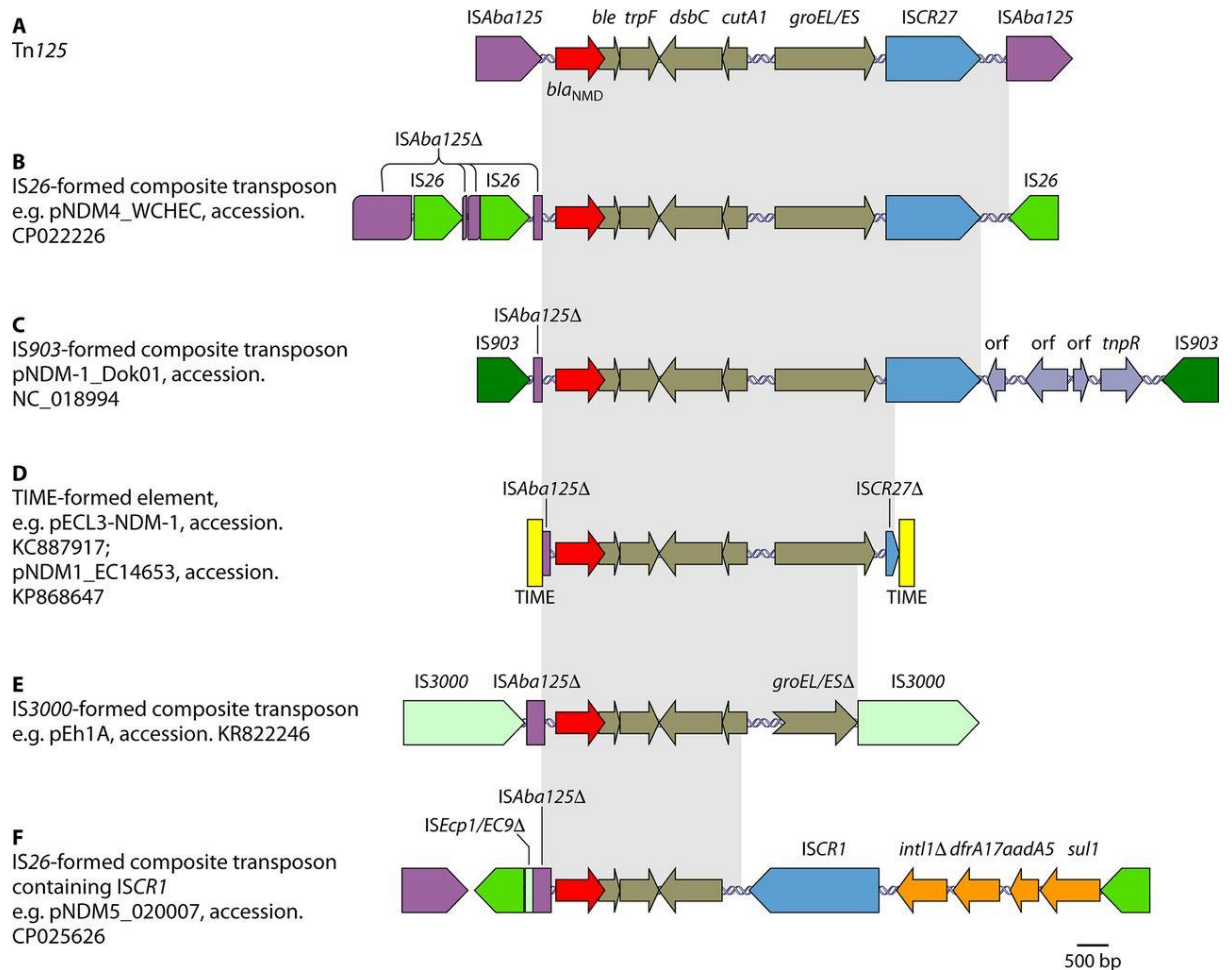
Os genes *bla*<sub>NDM</sub> são encontrados em plasmídeos altamente heterogêneos quanto ao tamanho, grupo de incompatibilidade e presença de outros genes de resistência. Já foram descritos no GenBank mais de 350 plasmídeos portadores dos

genes *bla*<sub>NDM</sub>. Existem cerca de 20 réplicons de plasmídeo que albergam os genes *bla*<sub>NDM</sub> em *Enterobacterales*, como por exemplo IncC, IncB / O / K / Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL / M, IncP, IncR, IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY e ColE10, sendo o mais comum o IncX3, encontrado em 112 dos plasmídeos, seguido pelo IncII em 99 dos plasmídeos. Há descrições de plasmídeos IncX3 codificando as variantes NDM-1, NDM-4, NDM-5, NDM-6, NDM-7, NDM-13, NDM-17, NDM-19, NDM-20 e NDM-21, o que sugere a importância desse grupo de incompatibilidade de plasmídeos quanto à disseminação. (WU et al., 2019; ROZALES et al., 2017).

Uma revisão bibliográfica, sobre *K. pneumoniae* produtoras de NDM, detectadas durante o período de 2010 a 2019, cepas de a partir de amostras clínicas em diferentes países dos cinco continentes, foi evidenciada uma grande variedade de clones. Observou-se a presença de 86 STs, e dentre eles os mais encontrados foram ST11, ST290, ST147, ST340, ST15, ST278 e ST14. A China destaca-se por possuir cerca de 80,2% dos tipos de STs, sendo 48 tipos de STs diferentes. No Brasil os STs com maior prevalência encontrados foram 1773, 3371, 3372 e 1069 (SAFAVI et al., 2020).

Um estudo realizado em 766 genomas bacterianos positivos para NDM disponíveis no GenBank, verificou que os gêneros e espécies que mais comumente albergam NDM são *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* e *Enterobacter*. Constatou-se que cepas positivas para NDM possuem origens clonais heterogêneas, pois estão distribuídas em diversos STs. Foi detectada a produção de NDM em *E. coli* ST131, ST167, ST410, ST617. Os STs 167 e 617 são os mais disseminados mundialmente. Em *K. pneumoniae*, foram encontradas cepas positivas para NDM nas linhagens ST11, ST14, ST15 e ST147, sendo os mais comuns encontrados em diferentes países (WU et al., 2019).

Alguns estudos indicam que os genes *bla*<sub>NDM</sub> podem estar localizados em outros elementos genéticos móveis, como sequências de inserção, transpósons e integrons (Figura 4) (KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017; ROZALES et al., 2017).

Figura 4 -Contextos genéticos de *bla*<sub>NDM</sub> mais frequentes

Legenda: (A) Tn125 formado por duas cópias de ISAbA125; (B) Transpósão formado por duas cópias do IS26; (C) Transpósão formado por duas cópias do IS903; (D) Elemento formado por duas cópias do TIME; (E) Transpósão formado por duas cópias do IS3000; (F) Contextos genéticos contendo ISCR1. Este elemento também é flanqueado por duas cópias do IS26. Os nomes dos plasmídeos e os números de acesso ao GenBank são mostrados. Δ representa genes ou elementos truncados. Fonte: WU et al (2019).

Em cepas de *Enterobacter* foram encontrados até hoje clones endêmicos, apenas em *E. hormaechei* (ST78 e ST114) e *E. xiangfangensis* (STN1). Há relatos de *Acinetobacter* spp. positivos para NDM de diversas linhagens, porém a mais comum é o ST85. Em *P. aeruginosa*, o ST mais comum é o ST308 (WU et al., 2019). Na Tabela 2 estão descritas as variantes de NDM e as espécies nas quais foram detectadas, cujas sequências nucleotídicas estão depositadas no GenBank.

Tabela 2 Espécies bacterianas já descritas albergando variantes de NDM

Tipo	Família ou Ordem	Espécie
	<i>Enterobacterales</i>	<i>Cedecea lapagei</i> , <i>Citrobacter braakii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter portucalensis</i> , <i>Citrobacter sedlakii</i> , <i>Citrobacter werkmanii</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>Enterobacter kobei</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> , <i>Klebsiella variicola</i> , <i>Leclercia adecarboxylata</i> , <i>Lelliottia nimipressuralis</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pseudocitrobacter faecalis</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia</i>
	<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. baumannii</i> , <i>Acinetobacter baylyi</i> , <i>Acinetobacter beijerinckii</i> , <i>Acinetobacter bereziniae</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Acinetobacter defluvii</i> , <i>Acinetobacter dijkshoorniae</i> , <i>Acinetobacter guillouiae</i> , <i>Acinetobacter haemolyticus</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Acinetobacter junii</i> , <i>Acinetobacter lwoffii</i> , <i>Acinetobacter nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter pittii</i> , <i>Acinetobacter radioresistens</i> , <i>Acinetobacter schindleri</i> , <i>Acinetobacter soli</i> , <i>Acinetobacter townneri</i> , <i>Acinetobacter variabilis</i>
NDM-1	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>V. cholerae</i>
	<i>Cardiobacteriaceae</i>	<i>Suttonella indologenes</i>
	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Kingella denitrificans</i>
	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter spp</i>
	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanellaceae spp.</i>
	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
NDM-2	<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. baumannii</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-3	<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. baumannii</i>

Continua

Tipo	Família	Espécie
NDM-4	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
		<i>C. freundii</i> , <i>Citrobacter europaeus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. michiganensis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
NDM-5	<i>Enterobacteriaceae</i>	
	<i>Morganellaceae</i>	<i>P. mirabilis</i>
NDM-6	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. aerogenes</i>
NDM-7	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>C. freundii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>
NDM-8	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-9	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. variicola</i> , <i>S. enterica</i>
NDM-10	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-11	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-12	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-13	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-14	<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. lwoffii</i>
NDM-15	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-16	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-16b	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-17	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-18	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-19	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-20	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>

Continua



Tipo	Família	Espécie
NDM-21	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-22	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. cloacae</i>
NDM-23	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-24	<i>Morganellaceae</i>	<i>P. stuartii</i>
NDM-25	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-26	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-27	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-28	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-29	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-30	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. oxytoca</i>
NDM-31	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter werkmanii</i>
NDM-32		<i>Atribuído</i>
NDM-33		<i>Atribuído</i>
NDM-34	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
NDM-35	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-36	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-37	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
NDM-38	<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
NDM-39	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
NDM-40	<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. baumannii</i>

Fonte: Modificado pelo autor de WU et al (2019); Conforme o banco de dados BLDB (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=B1#NDM> Acesso em 30/11/2021).

#### 1.4 New Delhi Metallo-betalactamase (NDM) no mundo

A primeira NDM foi identificada, na Suécia, em uma cepa de *K. pneumoniae* (ST14) em amostra de urina de um paciente com histórico de hospitalização em Nova Delhi, na Índia em 2008. A partir desse momento outras variantes de NDMs foram encontradas em *Enterobacterales*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Até a redação deste texto, 31 variantes já haviam sido identificadas (NAAS, 2017; YONG et al., 2009).

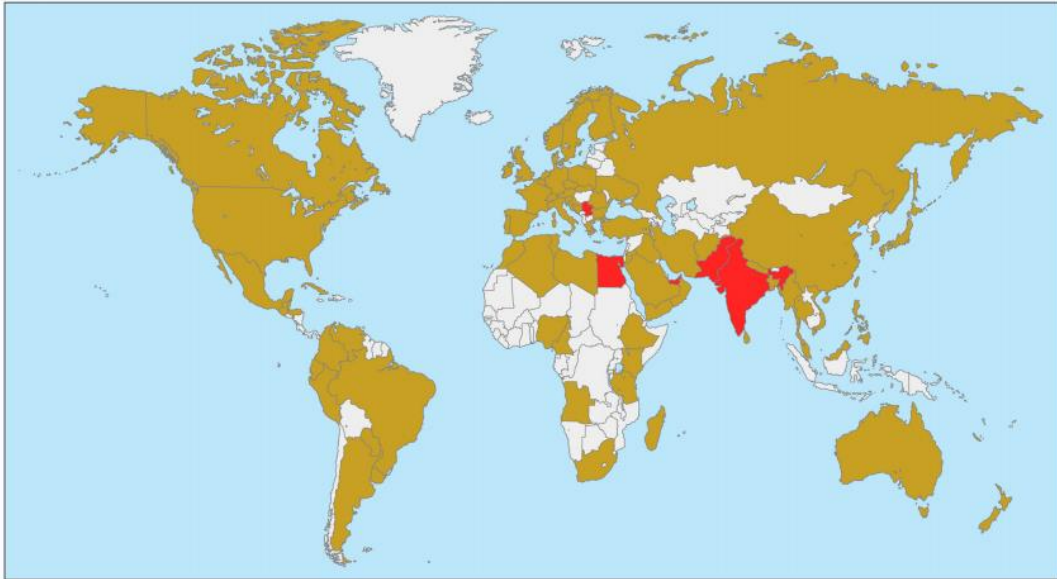
A positividade para o gene *bla<sub>NDM-1</sub>* em amostras do trato digestório de pacientes de New Delhi, descrita por vários autores, facilita a transmissão fecal-oral pela limitação do acesso a saneamento básico e água potável. Um outro fator que contribui para essa disseminação é o uso inadequado de antimicrobianos (RIBEIRO; COMARELLA, 2015).

Em 2010, essa enzima foi identificada em diversas espécies de *Enterobacterales* isoladas em amostras ambientais e em pacientes com infecções comunitárias e hospitalares na Índia, Paquistão e Bangladesh (RIBEIRO; COMARELLA, 2015).

A partir de então, a disseminação desses microrganismos atingiu países da Europa, Japão, Austrália, Canadá, Estados Unidos e vários países da América do Sul, como o Brasil. Pode-se afirmar que a disseminação de NDM pelo mundo está diretamente relacionada a viagens globais (Figura 5) (RIBEIRO; COMARELLA, 2015).

Na Figura 5, observamos em vermelho países como Egito, Índia, Paquistão, Sérvia e Emirados Árabes Unidos que demonstraram evidências de cepas positivas com  $\geq 5\%$  de prevalência; entretanto os países colocados em cor castanho claro são aqueles com prevalência menor que 5% e os em branco são os que não relataram nenhuma positividade para NDM (WU et al., 2019).

Figura 5 Distribuição mundial de cepas positivas para NDM



Legenda: Em vermelho países com prevalência  $\geq 5\%$  de cepas positivas para NDM; em castanho claro prevalência  $< 5\%$  e em branco não há relato de cepas positivas. Fonte: WU et al (2019).

Estudos relataram que 57% das primeiras confirmações de NDM na Europa em 2011 eram correlacionadas às hospitalizações em regiões Indianas. Em 2014, na Grécia, pacientes infectados com *K. pneumoniae* portadora do gene *bla<sub>NDM</sub>* tinham histórico de viagens para região leste dos Balcãs. A transferência de cepas produtoras de NDM de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* para a América do Norte também era originária da Índia (WU et al., 2019).

Em um estudo publicado em 2018, foi realizada uma análise de amostras de efluentes hospitalares em Jawaharlal Nehru Medical College e Hospital (JNMCH) de Aligarh Universidade Muçulmana (Aligarh, Índia), onde foram encontrados 32 isolados com variantes de NDM: nove *bla<sub>NDM-1</sub>*, 11 *bla<sub>NDM-4</sub>*, 10 *bla<sub>NDM-5</sub>* e duas *bla<sub>NDM-7</sub>*. Esses dados aumentam ainda mais a preocupação com a disseminação ambiental dessas cepas (PARVEZ; KHAN, 2018).

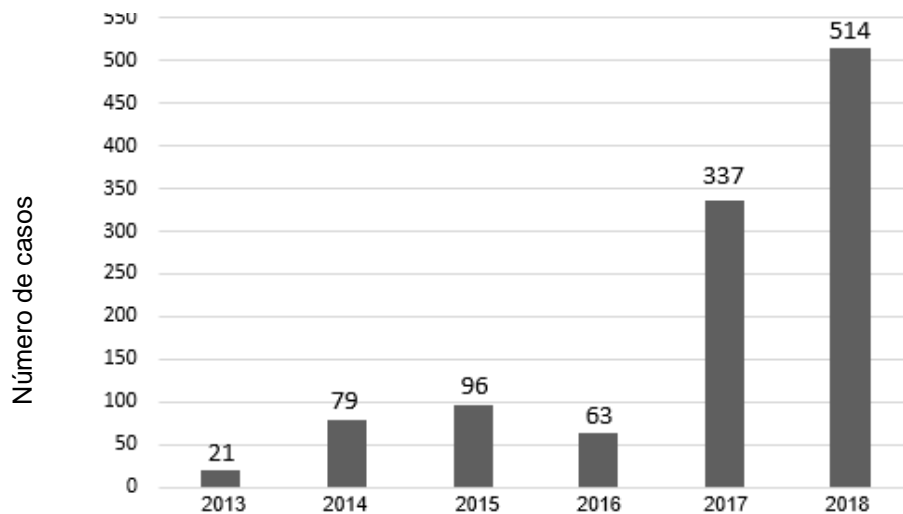
Um relatório expôs a distribuição global de *K. pneumoniae* produtores de NDM em 202 artigos publicados entre 2010 e 2019. Seus resultados evidenciaram que o continente com maior número de *K. pneumoniae* produtores de NDM foi a Ásia, principalmente China (44,1%) e Índia (15,1%), seguido pela Europa (20,1%); América (9%); África (5,2%) e Oceania (0,4%). As variantes mais comuns foram *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>NDM-4</sub>*, *bla<sub>NDM-5</sub>* e *bla<sub>NDM-7</sub>*, onde o *bla<sub>NDM-1</sub>* foi relatado nos 5 continentes e as variantes *bla<sub>NDM-4</sub>*, *bla<sub>NDM-6</sub>*, *bla<sub>NDM-9</sub>*, *bla<sub>NDM-10</sub>* e *bla<sub>NDM-19</sub>* foram encontrados apenas na Ásia (SAFAVI et al., 2020).

### 1.5 New Delhi Metallo-betalactamase (NDM) no Brasil

Em março de 2013 foi confirmado o primeiro caso de NDM-1 no Brasil. Um paciente diabético com infecção no pé deu entrada no hospital onde foi tratado por algumas vezes e precisou retornar ao hospital para amputação parcial. Uma amostra de tecido foi enviada para cultura e nela foi detectado o crescimento de *Providencia rettgeri* com sensibilidade reduzida para imipenem, que albergava o gene *bla<sub>NDM-1</sub>* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). No mesmo hospital foram detectados isolados de *Enterobacter hormaechei* portadores do gene *bla<sub>NDM-1</sub>* (CARVALHO-ASSEF et al., 2014).

A Coordenação Municipal de Controle de Infecção Hospitalar (CMCIH) de Porto Alegre apresentou indicadores de infecções notificadas por hospitais do município. No ano de 2017 observou-se um aumento considerável - 16 vezes - do número de isolados (337) em relação a 2013 (21), e ainda maior em 2018 (Figura 6).

Figura 6- Número de enterobactérias produtoras de NDM notificados no município de Porto Alegre, 2013 a 2018



Fonte: Modificado pelo autor de Boletim CMCIH (2019)

O mesmo relatório descreve que dentre os microrganismos notificados com NDM de janeiro a dezembro de 2017, 81,3% eram de cultura de vigilância e 18,7% eram de amostras clínicas. As espécies ou gêneros de maior frequência foram *K. pneumoniae* (33,5%), *Enterobacter* (27,5%), *Citrobacter* (18,6%), *Escherichia coli* (6,8%) e *Providencia* (6,23%).

Após o primeiro caso confirmado, foi realizado um estudo de abril a outubro de 2013, onde foram analisados isolados de *Enterobacteriaceae* de 17 hospitais de Porto Alegre. Foi detectada a presença de *bla*<sub>NDM-1</sub> em 11 isolados de hospitais diferentes, sendo nove isolados do complexo *Enterobacter cloacae* e dois isolados de *Morganella morganii* (ROZALES et al., 2017).

Ainda em 2013, dois casos no Rio de Janeiro, um paciente pediátrico colonizado por *E. coli* e *E. cloacae* com NDM-1 e um paciente de 60 anos com colonização do trato digestório por *K. pneumoniae* com o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> foram reportados. Neste mesmo ano no Rio de Janeiro, foram descritas as primeiras sequências nucleotídicas completas de plasmídeos albergando *bla*<sub>NDM-1</sub>. Em *E. hormaechei* o gene foi encontrado no IncFIK e na *E. coli* (ST2) no plasmídeo IncX3, os dois plasmídeos continham o transpóson Tn3000 (CAMPOS et al., 2015; RIBEIRO; COMARELLA, 2015).

Em 2014, um paciente de 71 anos deu entrada em hospital de Londrina apresentando doença pulmonar obstrutiva crônica. A cultura de urina detectou a presença de *Acinetobacter baumannii* produtor de NDM-1. Análises realizadas mostraram que o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> estava localizado em um plasmídeo de 100 Kb e a análise de tipagem MLST mostrou que a cepa pertence ao ST25 (PILLONETTO et al., 2014).

Um estudo de vigilância realizado entre janeiro de 2014 e março de 2017 em um hospital universitário de Londrina, analisou 825 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos onde foram identificados quatro isolados apresentando a coprodução do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>. Esses isolados pertenciam aos STs ST1773, ST3372, ST1067 e ST3371 (NAVA et al., 2019).

Estudos realizados em cepas isoladas no Rio de Janeiro demonstraram que a associação do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> com outros genes de resistência, como por exemplo o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> pode ser responsável pela rápida capacidade de manter e adquirir diferentes genes de resistência (QUILES et al., 2014).

No ano de 2015, um informe técnico da prefeitura do município de São Paulo, anunciou que foram identificados seis casos de infecção/colonização por bactérias produtoras de NDM em seis hospitais diferentes, em diferentes espécies bacterianas: *Providencia rettgeri*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (HOSPITALAR; (NMCIH/CCD/COVISA), 2015).

Uma pesquisa realizada no Brasil, estudou 81 isolados de bactérias gram-negativas de 9 estados brasileiros, incluindo 11 espécies diferentes, em todos os isolados foram encontrados NDM-1 e foram considerados multirresistentes (DA SILVA et al., 2019).

O primeiro relato de NDM-1 na região nordeste ocorreu em Salvador em 2015. Dois pacientes foram internados no hospital Universitário Federal de Salvador, no qual foram isolados *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii* portadores do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> (BARBERINO et al., 2018).

No início de 2019, a prefeitura de Belo Horizonte emitiu um alerta de surto de bactérias produtoras de NDM. Os primeiros casos surgiram entre janeiro e fevereiro de 2018 seguindo a partir de julho com 18 casos, e as espécies descritas eram *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (CIEVS et al., 2019).

Em um hospital público de Sergipe, foi realizado um estudo com 147 isolados de *K. pneumoniae*, onde foram analisados quanto às carbapenemases presentes. Em 50,3% dos isolados foi detectada a presença do gene *bla*<sub>NDM</sub>, seguida por 8% de produtores de *bla*<sub>KPC</sub>, além da presença de um isolado que albergava ambos os genes *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>KPC</sub> (VIVAS et al., 2020).

Um estudo realizado entre janeiro de 2015 e maio de 2020 com 3.005 isolados de oito espécies diferentes, produtores de carbapenemases, evidenciou 85,8% dos isolados produtores de *bla*<sub>KPC</sub> e 10% produtores do *bla*<sub>NDM</sub>, além de um aumento expressivo na frequência de *bla*<sub>NDM</sub> de 4,2% em 2015 para 24% em 2020 (WINK et al., 2021).

Segundo Khan e colaboradores, o continente americano abriga 10,8% dos produtores de NDM-1, onde o Brasil é o principal reservatório dessa variante. Até o momento da redação este texto não havia relatos de outra variante de NDM no Brasil a não ser NDM-1, e não há dados que evidenciam que a disseminação no Brasil está relacionada a viagens globais (KHAN et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a epidemiologia molecular e características fenotípicas de *Klebsiella* spp. produtoras de NDM detectadas em períodos pré e pós a introdução da ceftazidima-avibactam em uso clínico no Brasil.

## 2.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies do gênero *Klebsiella* por PCR multiplex;
- Analisar a clonalidade dos isolados por PFGE;
- Avaliar a presença de genes que codificam carbapenemases por PCR;
- Avaliar o desempenho do disco combinado com inibidores para a detecção de coprodução de NDM e KPC;
- Validar o método de pré-difusão para avaliar a sensibilidade a ATM-AVI;

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos no estudo um total de 113 isolados consecutivos, um por paciente, produtores de NDM, provenientes de 19 hospitais brasileiros e clínicas do externo e classificados por MALDI-ToF MS como complexo *Klebsiella pneumoniae*. Todos os isolados foram submetidos no Grupo Fleury a PCR para detecção dos genes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*.

Foram incluídos 54 isolados detectados antes de março de 2019 e 59 detectados a partir deste mês, data de início do uso clínico de CAZ-AVI. Neste estudo todos os isolados incluídos pertencem ao complexo *Klebsiella pneumoniae* detectados em diferentes amostras clínicas e swabs de vigilância, provenientes da coleção do Fleury de Medicina e Saúde, coletadas entre maio/2017 e novembro/2019. Os isolados foram mantidos em caldo LB com 20% de glicerol a -70°C e subcultivados em ágar sangue de carneiro ou em ágar LB quando necessário.

### 3.1 Testes fenotípicos para detecção de carbapenemases

O teste fenotípico de disco combinado de meropenem com ácido fenilborônico (AFB) baseia-se no princípio de que as carbapenemases de classe A são inibidas por este composto e a combinação de meropenem com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) resulta na inibição das carbapenemases da classe B. O EDTA possui propriedade de quelante, por isso compete por íons de zinco do sítio ativo presente nas metalo-betalactamases, impedindo assim sua atividade catalítica, enquanto o AFB atua como um bloqueador enzimático (BERTONCHELI; HORNER, 2008).

Para a triagem de produção de carbapenemases, as bactérias armazenadas a  $-70^{\circ}$  foram repicadas em ágar sangue ou LB e incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas em salina 0,9% estéril com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. O inóculo foi realizado em placas de ágar Mueller Hinton (MH). O inóculo foi espalhado uniformemente por toda a placa e a seguir foram aplicados os discos de meropenem (10 $\mu\text{g}$ ), meropenem com 10 $\mu\text{l}$  de ácido fenilborônico com azul de Evans (AFB) na concentração de 40 $\mu\text{mg/ml}$ , meropenem com 10  $\mu\text{l}$  de EDTA 0,1 M com Ponceau BS, meropenem com 10  $\mu\text{l}$  de AFB e 10  $\mu\text{l}$  de EDTA, ceftazidima/avibactam, ceftazidima/avibactam com 10 $\mu\text{l}$  de ácido dipicolínico (DPA) 100  $\text{mg/ml}$ . As placas foram incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. O diâmetro dos halos foi aferido e interpretado de acordo as orientações do EUCAST (BRCast, 2018) para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica, exceto quanto ao disco combinado com AFB e EDTA, para o qual o critério interpretativo foi avaliado neste estudo (EUCAST, 2017). Foram calculadas as sensibilidade e especificidade para o disco combinado contendo meropenem, EDTA e ácido borônico, utilizando-se a PCR como padrão ouro. A sensibilidade foi o quociente entre total de verdadeiros positivos sobre verdadeiros positivos somados aos falsos negativos. A especificidade foi o quociente entre total de verdadeiros negativos sobre verdadeiros negativos somados aos falsos positivos.

### **3.2 Teste Blue Carba**

As bactérias inoculadas em ágar Muller Hinton foram incubadas por 18 a 24hs a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em um microtubo foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  da solução Blue Carba (BC) para ser utilizado como controle negativo e em outro microtubo foi adicionado 100 $\mu\text{l}$  da solução BC com 10  $\text{mg/mL}$  de imipenem/cilastatina. Foi adicionada massa de crescimento bacteriano equivalente a meia alça calibrada de 10  $\mu\text{l}$  a cada um dos dois microtubos, que a seguir foram incubados a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Foram realizadas duas leituras: a primeira com 15 min e a segunda com 120 min. A interpretação foi verificada de acordo com a coloração da suspensão, comparando os tubos com solução BC mais imipenem com o controle negativo. Caso positivo, a suspensão apresenta a cor amarela. Cepas que apresentaram a suspensão amarela foram consideradas produtoras de carbapenemases (SECO et al., 2019).



### 3.3 Disco aproximação de ceftazidima/avibactam com aztreonam

As bactérias inoculadas em ágar LB foram incubadas por 18 a 24hs a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ . Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas em salina 0,9% estéril com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. O inóculo foi espalhado uniformemente por toda a placa de ágar Mueller Hinton (MH) e a seguir foram aplicados os discos de ceftazidima-avibactam (10+4  $\mu\text{g}$  – Liofilchem) e aztreonam (30  $\mu\text{g}$  - Oxoid) a uma distância de 15mm borda a borda. As placas foram incubadas a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas e posteriormente avaliadas pela formação de zonas de inibição.

### 3.4 Determinação de concentrações inibitórias mínimas para ATM e ATM-AVI e cálculo do ponto de corte epidemiológico (ECOFF)

Todos os isolados foram submetidos a microdiluição em caldo recomendado pela ISO-20776-1 para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A microdiluição foi realizada em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB). As placas foram previamente preparadas com ATM nas concentrações finais de 0,03 a 32 mg/L ou ATM+AVI, sendo a concentração de AVI fixa e igual a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . As concentrações da combinação foram de 0,03/4 a 32/4 mg/L. As placas foram congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento de uso. Foi preparada a suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) em salina 0,9% estéril. Esta suspensão foi diluída (1/150) em CAMHB, inoculada em cada poço da placa e incubadas a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 16 a 20 horas.

As cepas de referência *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade. Os valores de referência para essas cepas ao testar ATM-AVI foram aqueles definidos no documento CLSI M100 ED31-2021 e para ATM foram aqueles definidos pelo EUCAST. Os critérios interpretativos de CIM para ATM foram aqueles recomendados pelo EUCAST; entretanto, para ATM-AVI, não há critérios interpretativos, e o valor de corte epidemiológico (ECOFF) foi calculado utilizando-se a calculadora ECOFF do EUCAST.

### 3.5 Pré-difusão com disco combinado

O teste de pré-difusão com disco combinado, padronizado neste estudo, é uma modificação do método originalmente descrito por Frolund Thomsen (THOMSEN, 1962). O disco de CAZ-AVI (10+4 µg – Liofilchem) foi aplicado na superfície de uma placa de ágar Muller Hinton (MH), não inoculado, como espessura média de 4mm, e então incubado a 36±1°C por 2 horas. Após a incubação, com auxílio de uma pinça esterilizada, o disco de CAZ-AVI foi removido. Foram preparadas suspensões bacterianas em salina 0,9% estéril com crescimento recente e turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. O inóculo foi realizado nas placas de ágar Mueller Hinton (MH) e no mesmo local onde estava o disco de CAZ-AVI foi aplicado o disco de ATM (30 µg - Oxoid). Em seguida, outro disco de CAZ-AVI (10+4 µg – Liofilchem) e ATM (30 µg - Oxoid) foram aplicados em outros pontos da mesma placa, exclusivamente para confirmação da resistência a esses dois antimicrobianos. A placa foi incubada a 36±1 °C por 16 a 20 horas. Após a incubação, o diâmetro dos halos foi aferido com auxílio de um paquímetro digital e correlacionado com as CIMs para ATM-AVI. Para o controle positivo do teste de pré-difusão de disco combinado, foi selecionada a cepa *K. pneumoniae* L1153780 (este estudo), coprodutora de KPC e NDM. A cepa *K. pneumoniae* L7215213 (este estudo), que é negativa para o teste Blue-Carba e negativa para *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>, foi utilizada como controle negativo. Ambas são resistentes a ATM e CAZ-AVI quando testados isoladamente. Essas duas cepas foram testadas 20 vezes, em pelo menos cinco dias, em ensaios independentes, para definir a faixa de controle de qualidade aceitável.

### 3.6 Identificação da espécie

Considerando que a espectrometria de massas não permite a identificação acurada das espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae*, foi realizada PCR multiplex conforme descrito por (FONSECA et al., 2017). Foram utilizados os oligonucleotídeos SHV-F GCTGGCGGTACACGCCAGCCCG, LEN-F CACGCTGCGYAACTACTGACYGCGCAGCA, OKP-F GGCCGGYGAGCGGGGCTCA e DeoR-R AGAAGCATCCTGCTGTGCG 3'. As reações de PCRs foram padronizadas utilizando-se Platinum Green Hot Start PCR Master Mix (Thermo) sob as seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a

95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de amplificação, no qual 30s a 94°C para desnaturação, 30s a 56°C para anelamento e 1min a 72°C para extensão e 1 ciclo final de 10 min a 72°C. Devido à indisponibilidade de kit, algumas PCRs foram realizadas utilizando-se Go Taq Hot Start Green Master Mix (Promega) sob as seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de amplificação, no qual 30 s a 94°C na desnaturação, 20s a 60°C no anelamento e 30s a 72°C na extensão e um ciclo final de 5 min a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se o marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen) como referência. Em seguida o gel foi corado em solução de Gel Red por 30 minutos, visualizado no transiluminador UV e fotografado utilizando-se sistema Alphamager. A amplificação de produto de 995 pb indica *K. pneumoniae*, enquanto os produtos de 485 bp e 348 bp indicam, respectivamente *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*. As cepas controles utilizadas foram: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705; *K. variicola* J1061397 (este estudo) e *K. quasipneumoniae* CCBH 16302 (FIOCRUZ). Dois isolados de *K. aerogenes* (7656 e 7744) foram incluídos no estudo para avaliar especificidade da PCR multiplex.

### 3.7 Detecção dos genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*

O DNA foi extraído por fervura de suspensão bacteriana (1 colônia em 200 µL de água ultrapura estéril) por 10 min. Para controle positivo de *bla<sub>NDM</sub>* foi utilizada a cepa *K. pneumoniae* NCTC 13443; para controle positivo de *bla<sub>KPC</sub>* foi utilizada a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 e para controle negativo *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706. A sequência completa dos genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*, foi amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos da Tabela 3. As PCRs foram padronizadas utilizando-se a Taq Platinum (Thermo), sob as condições de bula.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X a 100V por 70min, utilizando-se o marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen) como referência. Em seguida, o gel foi corado em Gel Red por 30 minutos, visualizado no transiluminador UV e fotografado utilizando-se o sistema Alphamager.

Tabela 3- Lista de primers utilizados para detecção de *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>

Gene	Sequência (5' – 3')	Condições do ciclo	Referência
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	94°C/10' (94°C/40''-	(POIREL et al., 2011)
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	67°C/40''-72°C/1')72°C/7' x 30	
KPC- F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	94°C/2'(94°C/30''-	(POIREL et al., 2011)
KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	55°C/20''-72°C/30'') 72°C/7' x 30	

Fonte: Autoria própria.

### 3.5 Tipagem molecular por eletroforese de campos pulsados (PFGE)

A partir de cultura pura recente em ágar sangue ou ágar Mueller-Hinton foi preparada uma suspensão bacteriana em tampão de lise celular (100mM Tris e 100mM EDTA pH 8,0) com turbidez equivalente ao padrão 3,8 a 3,99 da escala de McFarland. À suspensão (300 µL) foram adicionados 15 µL de proteinase K (20 mg/ml). Após homogeneização, a suspensão foi mantida em banho seco a 60°C por cerca de 10 minutos e a seguir foram adicionados 300µL de agarose a 1% previamente aquecida e a suspensão foi transferida para molde plástico para preparo dos blocos. O molde foi mantido sob refrigeração (2 a 8 °C) por 10 a 15 minutos, para solidificação da agarose. Os blocos foram transferidos para uma placa de 24 poços para cultura de células com 2 mL de tampão de lise celular e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e foram incubados a 54°C sob agitação (160 rpm) durante a noite. Após a incubação, os blocos foram lavados duas vezes com água ultrapura estéril a 50°C por 15 minutos, sob agitação de 160 rpm. A seguir os blocos foram lavados seis vezes com o tampão TE (Tris 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0) pré-aquecido a 50°C por 15 minutos, a 160 rpm.

Para clivagem do DNA, os blocos foram lavados previamente três vezes com tampão TE pré-aquecido (10mM Tris – 1 mM EDTA, pH 8,0) à 37 °C. Foi preparada uma solução de 100µl de tampão 1x com 6U da enzima de restrição XbaI (Invitrogen) para cada reação. As reações foram incubadas a 36±1 °C por 18 horas. Os blocos foram submetidos à PFGE em gel de agarose a 1% em sistema CHEF-DR III (BioRad), nas condições de corrida: tempo de pulso inicial: 2,1 segundos; tempo de pulso final:

63,8 segundos; voltagem: 6V; ângulo: 120°; tempo total da corrida de 19 horas; temperatura 14°C (BARTOLLETTI et al., 2016)

Após a eletroforese, o gel foi imerso com solução de GelRed (Uniscience) por 30 minutos, e fotografado utilizando-se o sistema Alphamager sob luz ultravioleta. Os padrões de bandas de DNA foram analisados visualmente segundo os critérios de Tenover e colaboradores e com auxílio do programa Bionumerics 7.5 (AppliedMaths NV, St-Martens-Latem Belgium), para construção de dendrogramas. A similaridade genômica entre as cepas foram determinadas pelo coeficiente de Dice e o dendrograma foi produzido segundo o método UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância de 1,25% (TENOVER et al., 1995)

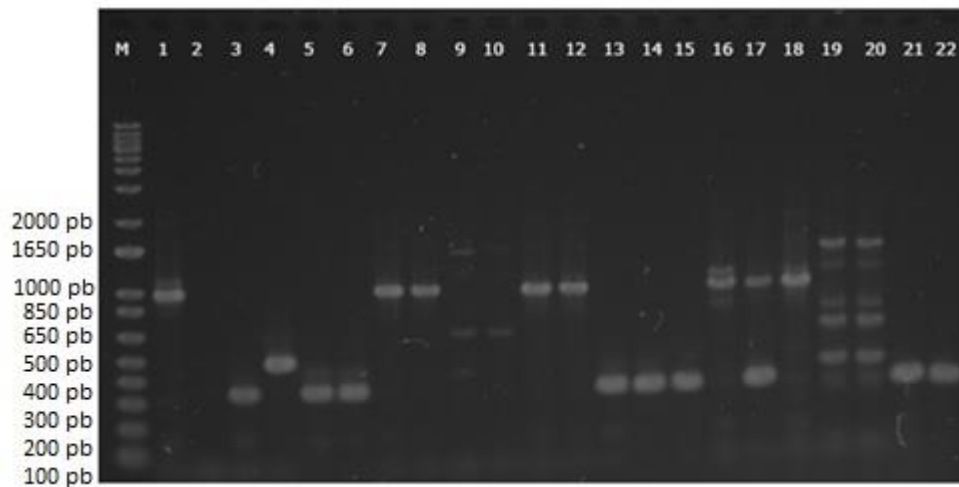
## 4 RESULTADOS

### **Frequência das espécies do complexo *K. pneumoniae***

Antes da realização dos testes fenotípicos e dos testes moleculares para confirmação da presença dos genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*, a sua pureza foi confirmada e a seguir os isolados foram submetidos a PCR multiplex para identificação das espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae*.

A distribuição das espécies entre os 113 isolados foi 75,2% (n=85) *Klebsiella pneumoniae*; 16,8% (n=19) *Klebsiella quasipneumoniae* e 8% (n=9) *Klebsiella variicola*. Os resultados obtidos evidenciam um número significativo de *K. pneumoniae*, mas também destacando a presença de *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*. Alguns isolados de *K. aerogenes* produtores de NDM foram incluídos no estudo para avaliar a especificidade da PCR multiplex. Como observado na Figura 7, a PCR gera múltiplos amplicons com tamanhos distintos daqueles observados nas espécies do complexo *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*).

Figura 7 -Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR multiplex para identificação de espécie do complexo *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: (M) 1 Kb Plus DNA Ladder (1) Controle *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (995pb); (2) Controle negativo; (3) Controle *Klebsiella quasipneumoniae* CCBH 16302 (348 pb) (4) Controle *Klebsiella variicola* J1061397 (485 pb); Canaletas:5,6,13,14, 15, 21 e 22 isolados de *Klebsiella quasipneumoniae*; Canaletas 7, 8, 11, 12, 16 e 18 isolados de *Klebsiella pneumoniae*. A canaleta 17 contém uma cultura mista de *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella quasipneumoniae*. Canaletas 19 e 20 isolados de *K. aerogenes*. Fonte: Autoria própria.

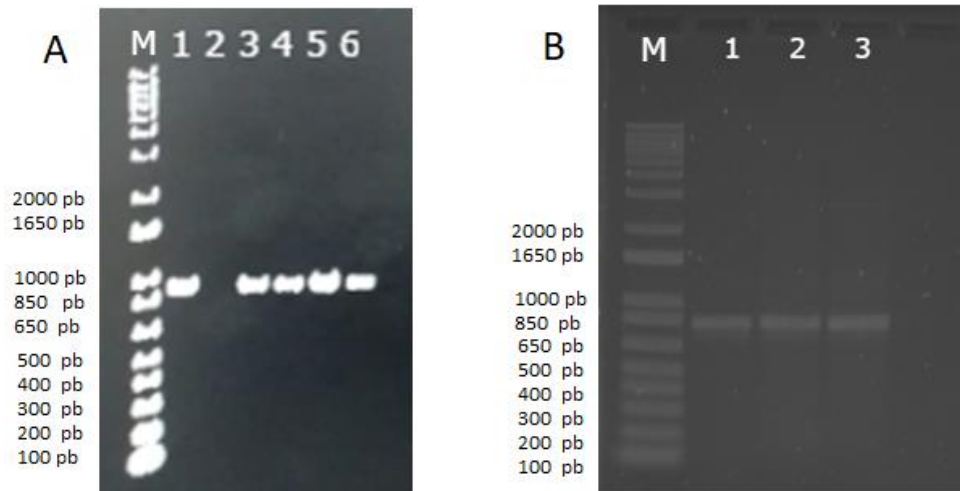
### Triagem de produção de carbapenemases por disco-difusão

Segundo as orientações do EUCAST (BRCAST, 2018), para a triagem de carbapenemases, o meropenem oferece melhor sensibilidade e especificidade, possuindo o valor de corte do halo de inibição menor que 28 mm na disco-difusão, diferentemente do valor de corte clínico. Todas as amostras foram submetidas ao teste de disco-difusão com meropenem, e apresentaram halo de inibição menor que 28 mm e foram submetidas aos demais testes fenotípicos.

### Detecção dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*

Os resultados obtidos evidenciaram que 12,4% (n=14) dos isolados apresentavam os genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>* e 87,6% (n=99) apresentaram apenas o gene *bla<sub>NDM</sub>* (Tabela 4 e figura 8).

Figura 8 Gel de agarose com produtos de amplificação dos genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*

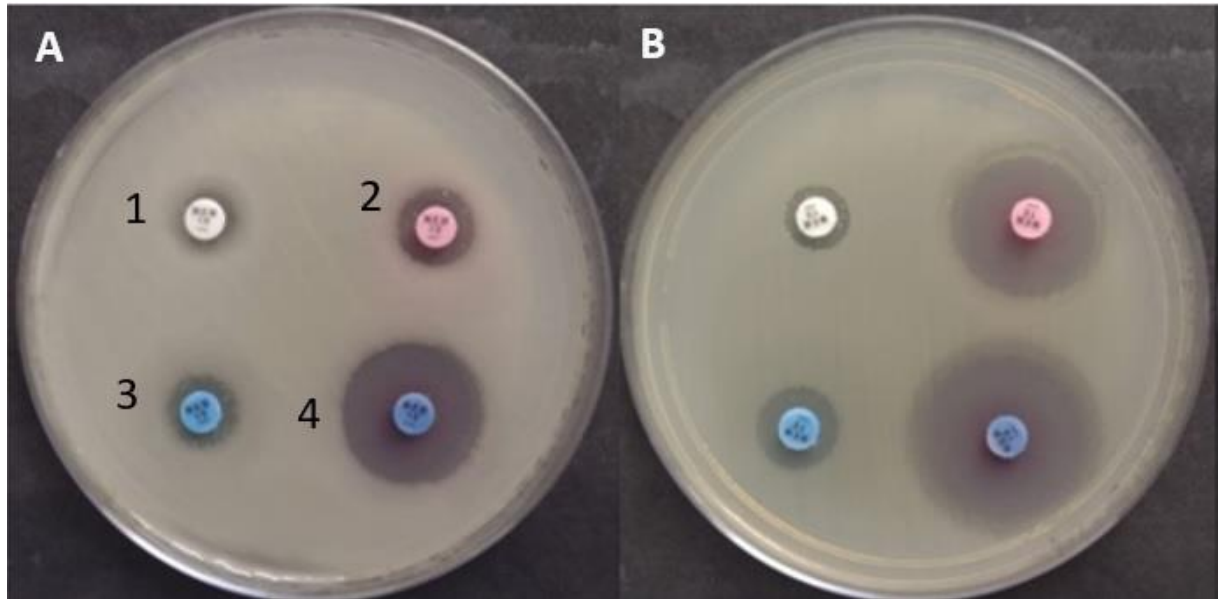


Legenda: (A) Detecção do gene *bla<sub>KPC</sub>*; (M) Padrão molecular; (1) Controle positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (826 pb); (2) Controle negativo *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706; Canaletas 3, 4, 5 e 6 Isolados que albergam o gene *bla<sub>KPC</sub>* respectivamente isolados 7084-7499-7310-7309- ; (B) Detecção do gene *bla<sub>NDM</sub>* (M) Padrão molecular; Canaletas 1, 2 e 3 Isolados que albergam o gene *bla<sub>NDM</sub>* (822pb), respectivamente isolados 7485-7204- K8244046. Fonte: Autoria própria.

### Detecção de carbapenemases utilizando discos de meropenem com inibidores

Segundo a nota técnica N°01/2013, o halo de inibição com disco de meropenem com EDTA deve apresentar um diâmetro pelo menos 5 mm maior que o halo do disco de meropenem sem aditivo para que o isolado seja considerado produtor de metalo-betalactamase. O halo de inibição do disco de meropenem com ácido fenilborônico deve possuir um diâmetro pelo menos 5 mm maior em relação ao disco de meropenem sem aditivo, para que o isolado seja considerado produtor de serino-betalactamase. Todos os isolados produtores de apenas de NDM apresentaram diferença de halo de inibição de meropenem com EDTA superior a 5 mm em relação ao meropenem sem aditivos (Tabela 4 e figura 9), independente da espécie de *Klebsiella*. Entretanto, em relação ao halo de inibição com e sem AFB, essa diferença para os isolados de *K. pneumoniae* positivos apenas para *bla<sub>NDM</sub>*, em sua grande maioria, foi < 5 mm; entretanto, 14,2% (n=16) dos isolados apresentaram diferença de halo de  $\geq 5$  mm, tendo os valores variado de 5 a 9mm e seriam classificados incorretamente como coprodutores de carbapenemases de classes A e B.

Figura 9 - Imagem representativa do teste de disco-difusão com discos de meropenem e inibidores de carbapenemases



Legenda: (1) Disco de meropenem; (2) Disco de meropenem com EDTA; (3) Disco de meropenem com Ác. Fenilborônico; (4) Disco de meropenem com EDTA e Ác. Fenilborônico; (A) Cepa 7918 provável produtora de carbapenemase- NDM+ KPC; Diâmetro dos halos 1- 9mm; 2- 12mm; 3- 13mm e 4- 24mm. (B) Cepa 7050 provável produtora de carbapenemase- NDM; Diâmetro dos halos 1- 12mm; 2- 23mm; 3- 16mm e 4- 25mm. Fonte: Autoria própria.

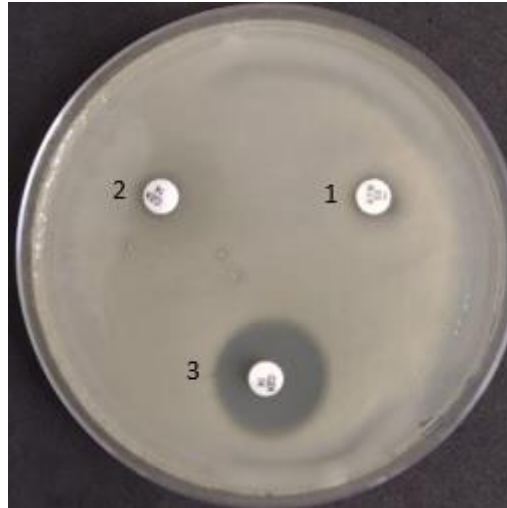
Oito dos 14 isolados coprodutores de KPC e NDM apresentaram diferença de halo de meropenem com e sem EDTA  $\geq 5$ mm, e seriam classificados como produtores de carbapenemases de classe B. Em relação ao meropenem com e sem AFB, todos os isolados coprodutores, exceto um (7699) apresentaram a diferença de halo  $\leq 4$ mm. Calculando-se a diferença de halo entre o maior halo de inibição de meropenem mais inibidor isolado e meropenem+EDTA+AFB observou-se que todas os isolados coprodutores de KPC e NDM apresentaram valor  $\geq 5$  mm e, portanto observou-se 100% de sensibilidade. Entretanto, quatro isolados positivos apenas para *bla*<sub>NDM</sub> apresentaram diferenças de halo de 5 a 8 mm, e portanto, a especificidade do teste foi de 96,1% (Tabela 4).

Visando avaliar se CAZ-AVI com ácido dipicolínico poderia ser um teste adequado para a detecção de coprodução de KPC e NDM, os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade por disco-difusão com ceftazidima-avibactam e a combinação de ceftazidima-avibactam e ácido dipicolínico (DPA) como inibidor (figura 10). Todas as amostras apresentaram-se resistentes a ceftazidima-avibactam segundo o EUCAST e, quando adicionado o DPA, apresentaram uma diferença de halo de inibição  $\geq 10$  mm em relação ao halo de ceftazidima-avibactam (Tabela 4)



Utilizando este teste não foi possível diferenciar os isolados produtores de NDM daqueles coprodutores de KPC e NDM.

Figura 10 - Teste de sensibilidade ao ATM, CAZ-AVI e CAZ-AVI com ácido dipicolínico



Legenda: (1) Disco de aztreonam; (2) Disco de ceftazidima-avibactam; (3) Disco de ceftazidima-avibactam com ácido dipicolínico. Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 Distribuição dos isolados segundo o diâmetro do halo com ou sem inibidores e PCR para genes de carbapenemases

Banco	Espécie	Ceftazidima-Avibactam					Meropenem							
		<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	A	B	$\Delta$ de halo de B-A (mm)	C	D	$\Delta$ de halo de D-C (mm)	E	$\Delta$ de halo de E-C (mm)	F	G	$\Delta$ de halo F-G (mm)
3827	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	10	23	13	14	4	25	23	2
4648	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	14	26	12	17	3	27	26	1
4732	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	9	19	10	10	21	11	11	1	25	21	4
4773	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	15	25	10	20	5	27	25	2
4779	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	18	27	9	20	2	30	27	3
5116	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	15	27	12	20	5	28	27	1
5119	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	25	19	18	30	12	20	2	31	30	1
5120	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	16	25	9	18	2	26	25	1
5170	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	13	26	13	16	3	27	26	1
5256	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	23	16	15	26	11	21	6	27	26	1
5377	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	23	17	16	26	10	17	1	29	26	3
5999	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	18	27	9	18	0	30	27	3
6113	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	16	28	12	17	1	29	28	1
6265	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	24	18	24	34	10	25	1	37	34	3
6292	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	27	21	6	30	24	9	3	33	30	3
6344	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	22	16	7	29	22	11	4	31	29	2
6438	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	15	28	13	19	4	30	28	2
6442	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	9	22	13	14	5	30	22	8
6447	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	9	27	18	15	6	30	27	3
6448	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	8	24	16	13	5	26	24	2

Continua.

Banco	Espécie	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Ceftazidima-Avibactam				Meropenem						
				A	B	C	D	E	F	G	Maior halo c/ inibidor (mm)	Δ de halo F-G (mm)		
				CAZ-AVI (mm)	CAZ-AVI+ DPA (mm)	Δ de halo de B-A (mm)	MEM (mm)	MEM+EDTA (mm)	Δ de halo de D-C (mm)	MEM+AFB (mm)			Δ de halo de E-C (mm)	MEM+EDTA+ AFB (mm)
6523	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	27	13	19	5	29	27	2
6535	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	24	18	12	29	17	14	2	30	29	1
6549	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	22	16	15	28	13	16	1	30	28	2
6659	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	10	25	15	15	5	25	25	0
6710	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	17	29	12	19	2	31	29	2
6712	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	15	25	10	20	5	29	25	4
6733	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	22	16	14	26	12	15	1	27	26	1
6735	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	24	18	10	29	19	15	5	30	29	1
6773	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	16	28	12	18	2	30	28	2
6804	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	12	25	13	15	3	26	25	1
6812	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	6	22	16	15	9	25	22	3
6860	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	7	24	17	10	3	29	24	5
6973	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	24	18	8	29	21	12	4	31	29	2
7048	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	6	24	18	15	9	26	24	2
7052	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	6	24	18	7	1	25	24	1
7281	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	9	20	11	14	27	13	17	3	29	27	2
7303	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	9	22	13	14	26	12	16	2	27	26	1
7434	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	20	28	8	20	0	29	28	1
7485	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	11	25	14	15	4	25	25	0
7501	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	13	25	12	15	2	26	25	1
7543	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	23	17	12	24	12	15	3	25	24	1
7672	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	22	16	14	27	13	15	1	27	27	0

Continua

Banco	Espécie	Ceftazidima-Avibactam					Meropenem							
		<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	A	B		C	D		E		F	G	
				CAZ-AVI (mm)	CAZ-AVI+ DPA (mm)	Δ de halo de B-A (mm)	MEM (mm)	MEM+EDTA (mm)	Δ de halo de D-C (mm)	MEM+AFB (mm)	Δ de halo de E-C (mm)	MEM+EDTA +AFB (mm)	Maior halo c/ inibidor (mm)	Δ de halo F-G (mm)
7694	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	12	22	10	14	2	24	22	2
7739	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	15	21	6	15	0	22	21	1
7796	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	22	16	17	29	12	19	2	30	29	1
7909	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	9	21	12	12	23	11	16	4	25	23	2
7917	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	15	25	10	13	-2	26	25	1
7945	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	15	24	9	15	0	25	24	1
8011	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	18	26	8	20	2	27	26	1
8057	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	15	24	9	17	2	26	24	2
8059	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	12	26	14	15	3	28	26	2
8061	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	7	24	17	11	4	25	24	1
8126	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	16	27	11	18	2	28	27	1
8157	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	20	25	5	20	0	26	25	1
8159	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	13	23	10	16	3	24	23	1
8160	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	24	10	17	3	26	24	2
8167	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	15	25	10	16	1	25	25	0
8170	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	15	25	10	20	5	27	25	2
8200	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	18	12	14	22	8	16	2	29	22	7
8205	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	25	11	15	1	26	25	1
8211	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	25	11	16	2	26	25	1
8221	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	8	22	14	14	27	13	16	2	27	27	0

Continua

Banco	Espécie	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Ceftazidima-Avibactam						Meropenem							
				A		B		C		D		E		F		G	
				CAZ-AVI (mm)	CAZ-AVI+ DPA (mm)	Δ de halo de B-A (mm)	MEM (mm)	MEM+EDTA (mm)	Δ de halo de D-C (mm)	MEM+AFB (mm)	Δ de halo de E-C (mm)	MEM+EDTA +AFB (mm)	MAIOR HALO c/ inibidor (mm)	Δ de halo F-G (mm)			
8226	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	17	25	8	20	3	26	25	1			
8226	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	17	25	8	20	3	26	25	1			
8227	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	14	25	11	16	2	26	25	1			
8258	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	8	20	12	9	28	19	15	6	29	28	1			
8263	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	8	20	12	7	24	17	15	8	25	24	1			
8388	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	13	25	12	14	1	27	25	2			
8393	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	7	24	17	9	2	26	24	2			
8461	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	22	15	12	25	12	15	3	26	26	0			
8480	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	23	16	15	26	11	15	0	28	26	2			
8611	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	7	24	17	7	24	17	9	2	26	24	2			
8630	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	9	20	11	14	25	11	17	3	27	25	2			
8811	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	8	20	12	6	25	19	15	9	26	25	1			
4604	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	22	15	16	28	12	20	4	30	28	2			
5174	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	20	13	14	26	12	15	1	26	26	0			
5332	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	24	18	14	31	17	14	0	32	31	1			
6972	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	20	13	13	26	13	15	2	27	26	1			
7085	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	19	13	6	18	12	14	8	24	18	6			
7502	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	14	25	11	15	1	25	25	0			
7671	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	13	24	11	15	2	25	24	1			
7693	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	15	26	11	16	1	29	26	3			
7697	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	12	25	13	15	3	25	25	0			
7701	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	15	27	12	16	1	28	27	1			

Continua

Banco	Espécie	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Ceftazidima-Avibactam						Meropenem				
				A	B	C	D	E	F	G	MEM+EDTA +AFB (mm)	Maior halo c/ inibidor (mm)	Δ de halo F-G (mm)	
				CAZ-AVI (mm)	CAZ-AVI+ DPA (mm)	Δ de halo de B-A (mm)	MEM (mm)	MEM+EDTA (mm)	Δ de halo de D-C (mm)	MEM+AFB (mm)				Δ de halo de E-C (mm)
7702	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	13	26	13	13	0	27	26	1
7801	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	21	15	16	26	10	15	-1	28	26	2
7804	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	16	26	10	17	1	27	26	1
7876	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	13	25	12	13	0	28	25	3
7944	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	26	12	15	1	26	26	0
8004	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	27	21	13	26	13	15	2	28	26	2
8005	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	12	24	12	16	4	26	24	2
8168	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	10	26	16	16	6	27	26	1
8440	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	8	22	14	10	26	16	14	4	26	26	0
7876	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	13	25	12	13	0	28	25	3
7944	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	26	12	15	1	26	26	0
8004	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	27	21	13	26	13	15	2	28	26	2
8005	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	6	20	14	12	24	12	16	4	26	24	2
8168	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	7	21	14	10	26	16	16	6	27	26	1
8440	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	8	22	14	10	26	16	14	4	26	26	0
5238	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	23	17	17	29	12	20	3	30	29	1
5336	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	21	15	14	26	12	15	1	26	26	0
6615	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	21	15	15	26	11	17	2	28	26	2
7049	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	25	19	6	23	17	6	0	25	23	2

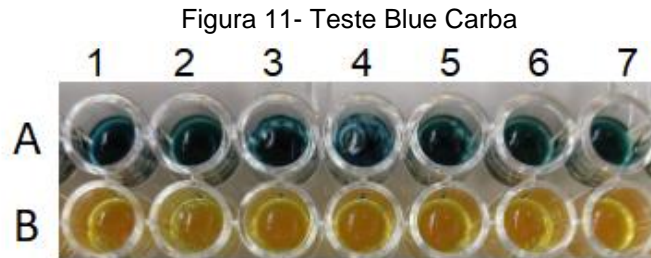
Continua

Banco	Espécie	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Ceftazidima-Avibactam				Meropenem						
				A	B	C	D	E	F	G	Maior halo c/ inibidor (mm)	Δ de halo F-G (mm)		
				CAZ-AVI (mm)	CAZ-AVI+ DPA (mm)	Δ de halo de B-A (mm)	MEM (mm)	MEM+EDTA (mm)	Δ de halo de D-C (mm)	MEM+AFB (mm)			Δ de halo de E-C (mm)	MEM+EDTA+AFB (mm)
7050	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	21	15	10	25	15	16	6	27	25	2
7083	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	22	16	6	22	16	12	6	26	22	4
7500	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	6	20	14	14	24	10	15	1	26	24	2
6770	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	8	22	14	12	19	7	15	3	26	19	7
7018	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	7	27	20	10	11	1	8	-2	21	11	10
7084	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	9	22	13	11	16	5	15	4	25	16	9
7643	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	8	21	13	16	21	5	20	4	27	21	6
7699	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	8	22	14	11	15	4	16	5	24	16	8
7803	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	8	21	13	15	21	6	16	1	27	21	6
7805	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	10	20	10	16	21	5	20	4	26	21	5
7911	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	7	21	14	16	24	8	20	4	29	24	5
7918	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	6	21	15	9	12	3	13	4	24	13	11
8154	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	7	21	14	10	14	4	14	4	25	14	11
8644	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	7	21	14	15	18	3	18	3	26	18	8
9949	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	7	20	13	12	15	3	15	3	23	15	8
8078	<i>K. variicola</i>	Pos	Pos	6	21	15	12	19	7	13	1	26	19	7
8124	<i>K. variicola</i>	Pos	Pos	7	20	13	10	17	7	13	3	26	17	9

Fonte: Autoria Própria

### Detecção de produção de carbapenemases com o Blue-Carba

Como teste fenotípico complementar realizamos o Blue-Carba (Figura 10), que consiste na detecção da hidrólise de imipenem utilizando-se o azul de bromotimol de como indicador de pH. Todos os isolados analisados apresentaram positividade para o teste Blue-Carba (Figura 11).



Legenda: (A) Solução de azul de bromotimol sem adição de imipenem; (B) Solução de azul de bromotimol com adição de imipenem. Todos os isolados foram capazes de hidrolisar o imipenem. (1) 7281 (2) 7303 (3) 7306 (4) 7307 (5) 7308 (6) 7434 (7) 7485. Fonte: Autoria própria.

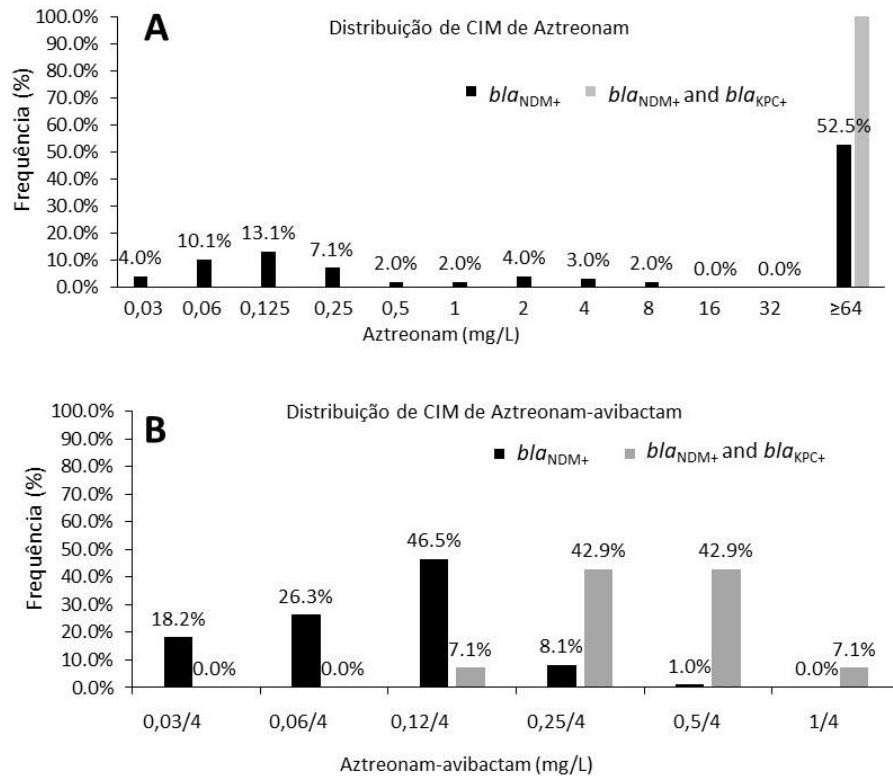
### Concentração inibitória mínima para ATM e ATM-AVI

Todos os isolados coprodutores de KPC e NDM apresentaram CIM para ATM  $\geq 64$  mg/L. Quanto aos isolados produtores apenas de NDM, 38,3% apresentaram CIM  $\leq 1$  mg/L e foram classificados como sensível, dose padrão, enquanto 7,0% foram classificados como sensível aumentando exposição (Figura 12 A).

Comparando-se as CIM de ATM e ATM-AVI, houve uma redução significativa. Todos os isolados apresentaram CIM para ATM-AVI  $\leq 1$  mg/L sendo este valor o ECOFF calculado utilizando-se a ferramenta ECOFF Calculator do EUCAST. A CIM<sub>90</sub> para isolados produtores exclusivamente de NDM foi de 0,12/4 mg/L, enquanto este valor foi de 0,5/4 mg/L para coprodutores de KPC e NDM (Figura 12 B).



Figura 12- Distribuição de CIMs para aztreonam e aztreonam-avibactam estratificado por genes de carbapenemases

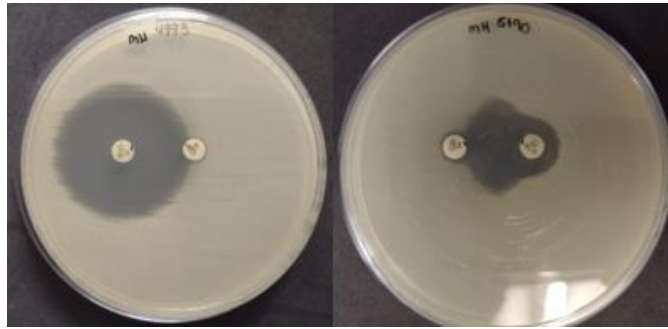


Fonte: Autoria própria.

### Disco-aproximação e pré-difusão com ATM e CAZ-AVI

Os testes de disco-aproximação com ATM e CAZ-AVI, foram realizados preliminarmente para escolha da distância, 10mm, 15mm ou 20mm. Após a escolha, foram então inoculados a bactéria em uma placa de Ágar Muller Hinton e adicionados os discos de CAZ/AVI (14µg) e ATM (30µg) a uma distância de 15 mm (Figura 13). Em 66,4 % (n=75) dos isolados houve distorção do halo de inibição com aparecimento de “zona fantasma” compatível com provável efeito sinérgico. Os isolados em que não foi observada a distorção do halo eram sensíveis ao ATM (33,6% n=38) Figura 11.

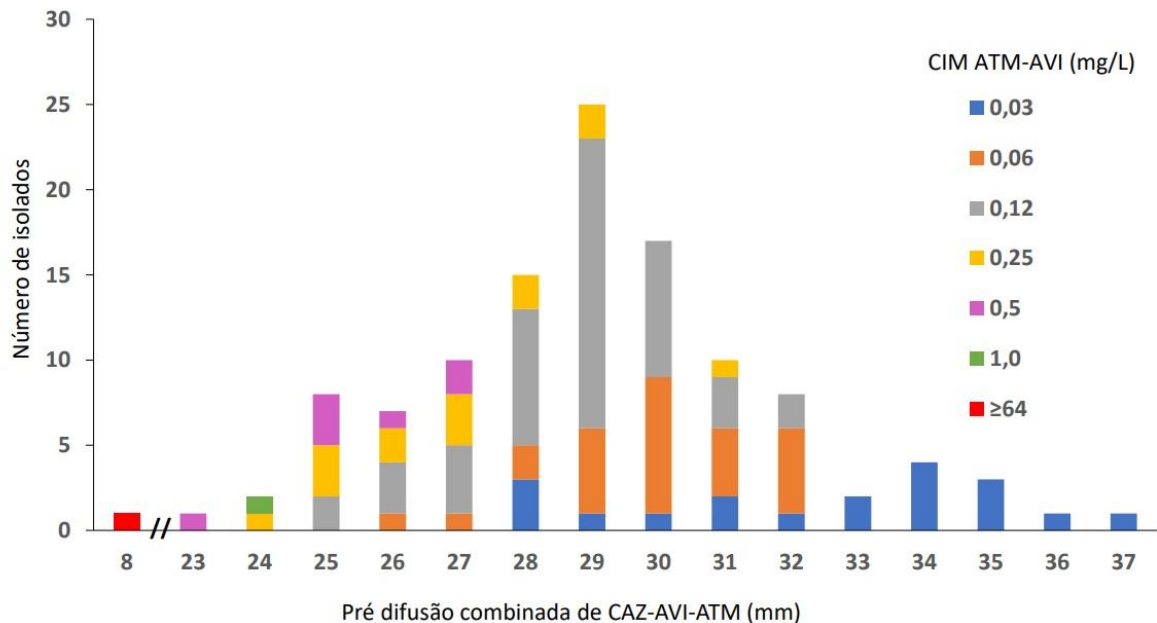
Figura 13 Teste de sinergismo



Legenda: (A) Isolado 4773. Notar ausência de distorção do halo, indicando provável ausência de sinergismo; (B) Isolado 5190. Notar presença de “zona fantasma” indicando provável sinergismo.

O diâmetro médio e o desvio padrão para pré-difusão de disco combinado, calculados neste estudo, para cepa controle positivo *K. pneumoniae* L1153780 foram  $23,92 \pm 0,98$  mm e para cepa controle negativo *K. pneumoniae* L7215213 esses valores foram de  $7,56 \pm 0,68$  mm. Portanto, propomos os seguintes limites de controle de qualidade: 22 a 26mm e 6 a 9mm. Todos os isolados deste estudo apresentaram o halo de inibição na pré-difusão de disco combinado de ATM e CAZ-AVI  $\geq 23$ mm (Figura 14).

Figura 14- Correlação entre diâmetro do halo com pré-difusão do disco combinado e CIM para aztreonam-avibactam (ATM-AVI)



Legenda: CAZ-AVI - ceftazidima-avibactam; ATM – Aztreonam; CIM - concentração inibitória mínima (N=113). Fonte: Autoria Própria

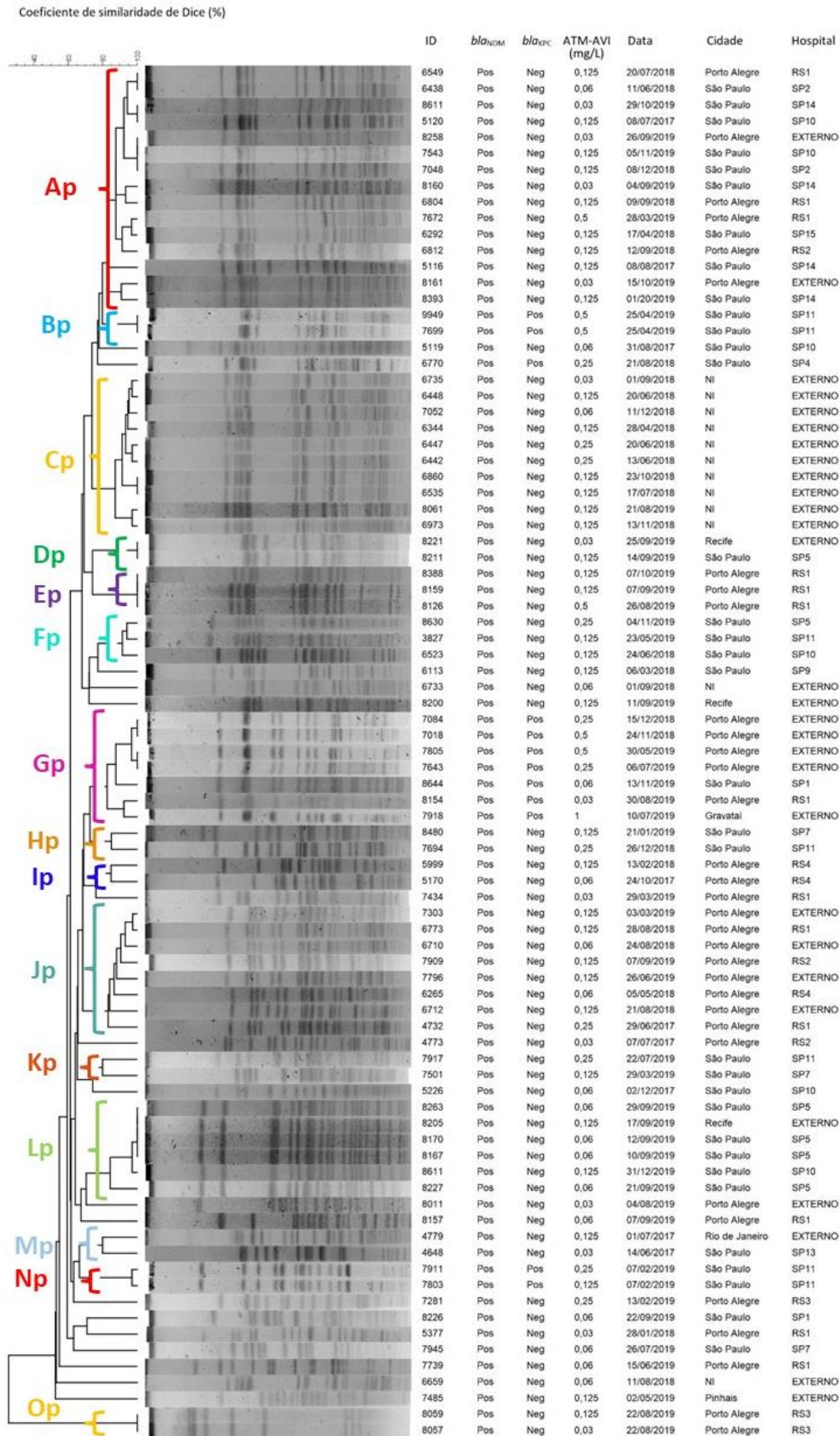
O menor halo existente entre os isolados na pré-difusão de disco combinado com ATM e CAZ-AVI foi de 23mm. Consequentemente, houve uma boa correlação entre o diâmetro do halo de inibição da pré-difusão com a CIM de ATM-AVI  $\leq 1$  mg/L.

### **Avaliação da clonalidade por eletroforese em campos pulsados**

O DNA genômico de todos os isolados foi submetido à clivagem com XbaI e a seguir os fragmentos foram separados por PFGE. Foi possível obter perfis eletroforéticos para todos os isolados e a similaridade entre eles foi avaliada calculando-se o índice de Dice.

Analisando-se em conjunto todos os perfis obtidos para a espécie *K. pneumoniae*, em todo o período do estudo, foram identificados 15 grupos clonais. O grupo clonal mais numeroso, contendo 15 isolados foi designado Ap. Isolados deste grupo clonal foram detectados em hospitais das cidades de São Paulo e Porto Alegre e houve persistência deste clone de 2017 a 2019 (Figura 15). O grupo clonal Gp contendo sete isolados, coprodutores de KPC e NDM foi detectado nas cidades de São Paulo, Porto Alegre e Gravataí durante os anos de 2018 e 2019. O grupo clonal Lp foi detectado nas cidades de São Paulo e Recife durante o ano de 2019 e os perfis detectados nestas duas cidades eram indistinguíveis entre si. O grupo clonal Jp, com oito isolados, foi detectado apenas na cidade de Porto Alegre.

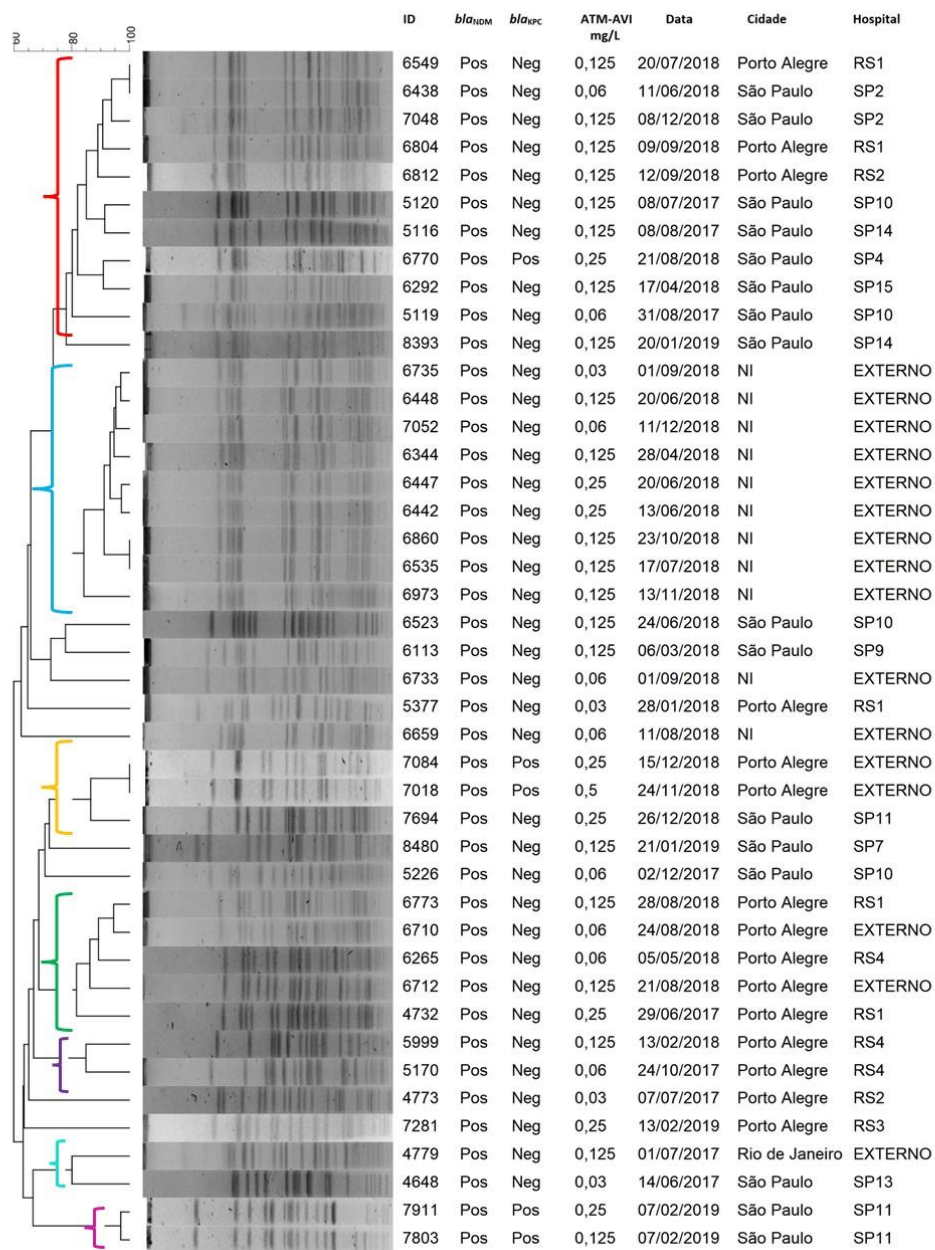
Figura 15- Diversidade clonal entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae*



Fonte: Autoria própria

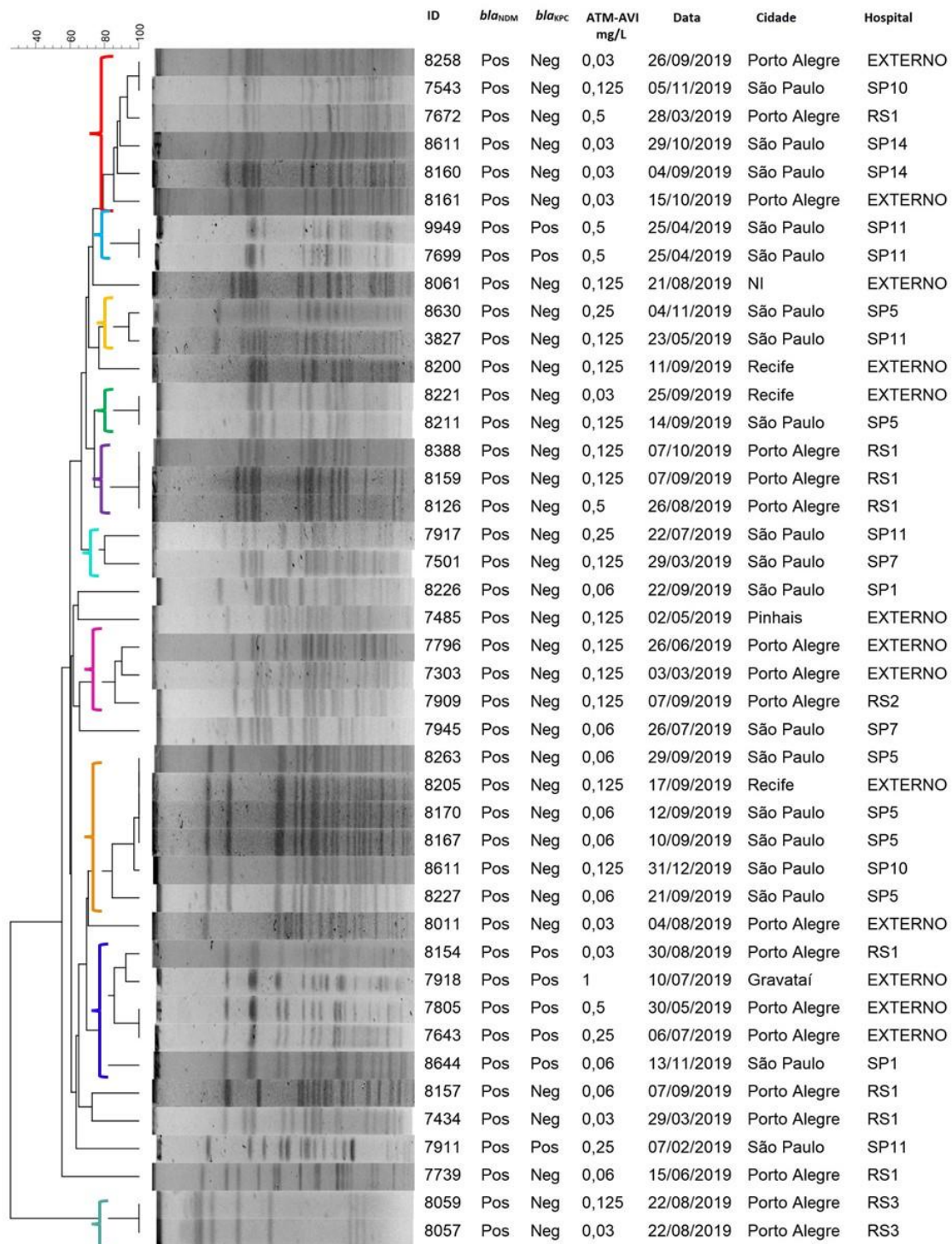
Quando analisados separadamente os isolados pré e pós início do uso de CAZ-AVI, observou-se que os grupos clonais pré o uso de CAZ-AVI era mais numeroso, para produtores de NDM e continham menos coprodutores de KPC e NDM. Pré o uso de CAZ-AVI este grupo clonal continha cinco isolados, e no período de vigência do uso de CAZ-AVI este grupo continha sete isolados. Enquanto no período pré-CAZ-AVI os três maiores grupos clonais continham 10, 9 e cinco isolados, no período de uso de CAZ-AVI os três principais grupos clonais apresentaram menor número de isolados, respectivamente seis, seis e cinco (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Diversidade clonal entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* pré introdução de CAZ-AVI



Fonte: Autoria própria

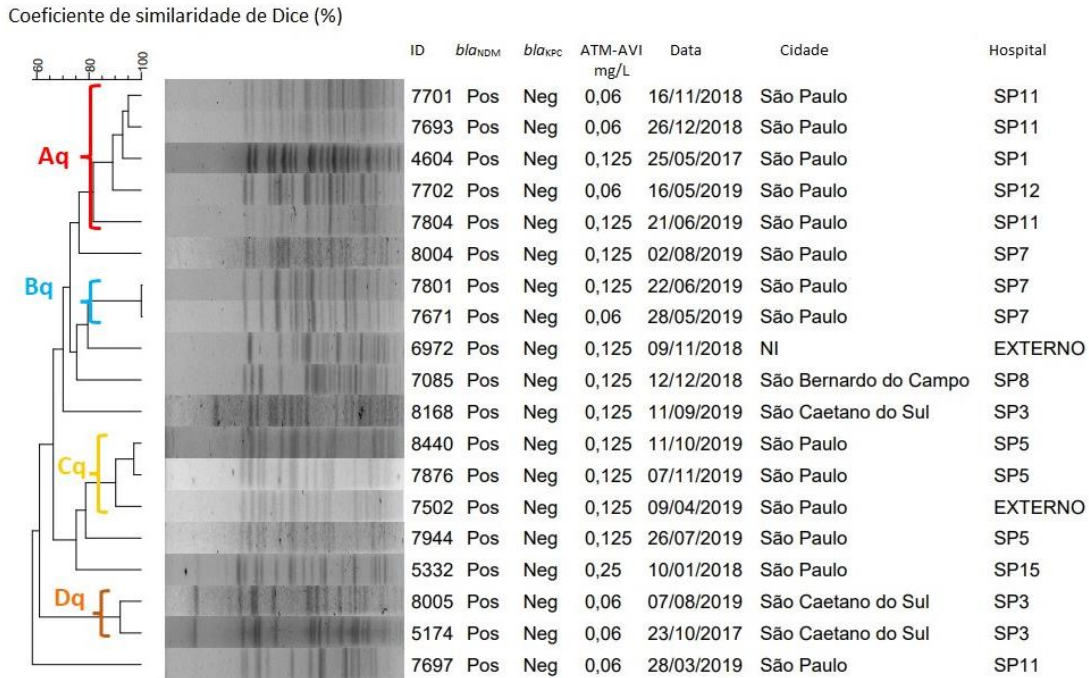
Figura 17 Diversidade clonal entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* pós introdução de CAZ-AVI



Fonte: Autoria Própria

Os perfis de PFGE de *K. quasipneumoniae* evidenciaram quatro grupos clonais predominantes, e presentes apenas no estado de São Paulo, com persistência do grupo clonal Aq desde 2017 (Figura 18).

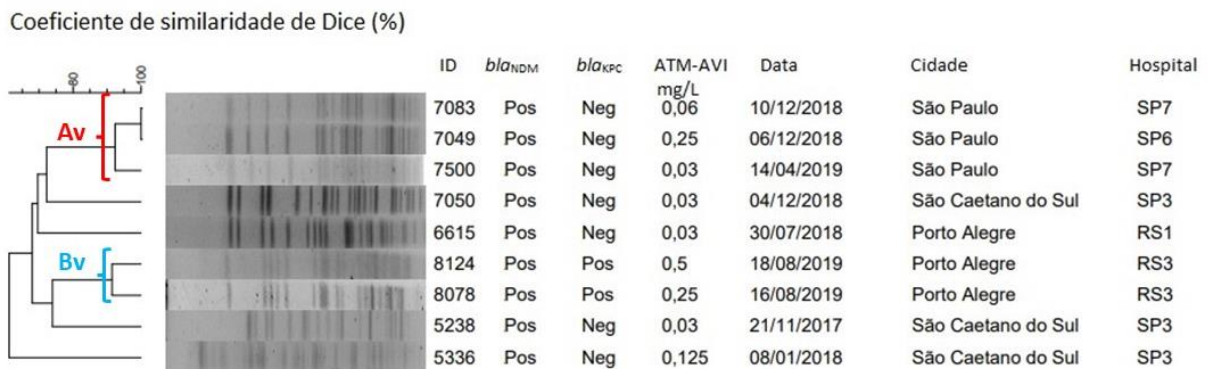
Figura 18- Diversidade clonal entre os isolados de *Klebsiella quasipneumoniae*



Fonte: Autoria própria.

Quanto à *K. variicola* (figura19), foram observados dois grupos clonais predominantes Av e Bv, o primeiro presente apenas em São Paulo desde 2018 e o segundo em Porto Alegre apenas em 2019.

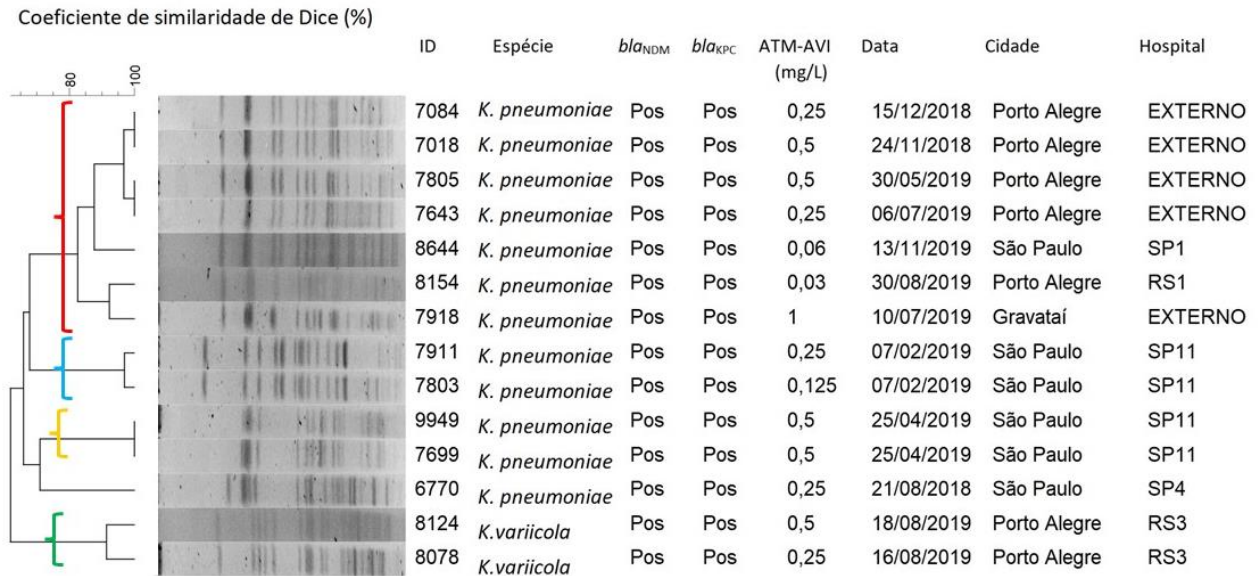
Figura 19- Diversidade clonal entre os isolados de *Klebsiella variicola*



Fonte: Autoria própria

Quando analisamos os perfis de clonalidade das cepas coprodutoras de NDM e KPC (figura 20) observamos quatro grupos clonais, dentre deles o maior grupo clonal possui sete isolados, distribuídos em dois grandes estados do Brasil, São Paulo e Rio Grande do Sul.

Figura 20- Diversidade clonal entre os isolados do complexo *Klebsiella pneumoniae* que albergam os genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*



Fonte: Autoria própria

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados 113 isolados do complexo *K. pneumoniae*, que inclui *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*, isolados em pelo menos cinco cidade brasileiras, das regiões sul, sudeste e nordeste. Todos os isolados pertencentes ao complexo, detectados nos hospitais atendidos pelo Grupo Fleury durante o período 2018 a 2019 e positivos para *bla<sub>NDM</sub>*, um por paciente, foram incluídos no estudo. Utilizando-se a PCR multiplex, a espécie mais frequente foi a *K. pneumoniae* (75,2%), seguida pela *K. quasipneumoniae* (16,8%) e *K. variicola* (8%). Alguns autores, a exemplo de Maatallah et al (2014) encontraram a *K. variicola* como a segunda espécie mais frequente, além de ser mais comumente associada a mortalidade. Essa aparente discrepância é provavelmente decorrente do fato de que neste estudo foram incluídos apenas isolados produtores de NDM e coprodutores de NDM e KPC, enquanto em seu estudo Maatallah et al. analisaram todas os isolados



de *Klebsiella* causadoras de infecções na corrente sanguínea. Ainda não são conhecidas as variáveis que influenciam a potencial maior virulência de *K. variicola*.

Um outro estudo realizado com isolados do Japão entre 2014 e 2017, avaliou características clínicas e microbiológicas entre os três grupos filogenéticos. O número de infecções causadas *K. variicola* também foi significativo; entretanto, diferentemente de Maatallah et al (2014), não houve diferenças significativas nas taxas de mortalidade entre as espécies do complexo *K. pneumoniae* (IMAI et al., 2019).

No teste fenotípico para triagem de carbapenemases utilizando-se discos de meropenem com EDTA 0,1M, todos os isolados produtores apenas de NDM apresentaram o halo de inibição de meropenem com EDTA pelo menos 5mm maior que o halo de inibição do meropenem sem aditivo. Para serem considerados possíveis produtores de serino-betalactamases o halo de inibição do disco de meropenem com AFB deve possuir o diâmetro  $\geq 5$  mm. Alguns desses isolados, que possuíam apenas o gene *bla<sub>NDM</sub>*, confirmados por PCR, também apresentaram um aumento do diâmetro do halo  $\geq 5$  mm para meropenem com AFB, consistindo em resultados falsos positivos. A menor especificidade do EDTA como inibidor já foi descrita previamente por Dalmolin e colaboradores, que relataram 48% de seus isolados produtores do gene *bla<sub>KPC</sub>* deram valores de meropenem com EDTA superiores a 5mm, mas não a falsa positividade com AFB para produtores de KPC.

Há relatos de outros estudos, que também realizaram a combinação de meropenem com os inibidores AFB e EDTA, para identificação de possíveis coprodutores de serino-betalactamases e metalo-betalactamases, porém esses estudos verificaram a diferença do diâmetro do halo de meropenem com AFB+EDTA em comparação com o disco apenas de meropenem. A diferença entre o halo de meropenem com AFB+EDTA e o segundo maior halo de meropenem com inibidor, proposto neste estudo, tem 100% de sensibilidade, mas 96,1% de especificidade; portanto a confirmação por PCR ou teste imunocromatográfico é essencial para a identificação precisa das carbapenemases presentes.

O aztreonam até hoje continua sendo o único antimicrobiano lactâmico monocíclico disponível para o tratamento clínico contra as meta-betalactamases. Uma revisão bibliográfica publicada recentemente analisou estudos que verificavam perfis de resistência e genes de resistências de *K. pneumoniae* na Ásia. Nove estudos referentes à resistência ao aztreonam nesses microrganismos demonstraram que a

prevalência de resistência a esse antimicrobiano é de 59,9% a 83,4%. Nossos resultados verificaram uma resistência também dentro desse intervalo, tanto na disco difusão quanto na CIM, onde foram observados que 60,5% dos isolados foram resistentes, 33,3% foram sensíveis e 6,1% sensíveis com exposição aumentada (BROGDEN; HEEL, 1986; EFFAH et al., 2020; ZHANG et al., 2020)

As metalo-betalactamases são capazes de hidrolisar todos os betalactâmicos, com exceção do aztreonam, entretanto esse antimicrobiano não pode ser utilizado como monoterapia, devido à coprodução de enzimas principalmente do tipo ESBL. O tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores de metalo-betalactamases, ainda não está bem definido, mas a combinação CAZ-AVI com ATM tem sido considerada uma opção terapêutica com grande potencial. Neste estudo, quando avaliados somente os produtores de NDM verificamos que aproximadamente metade (52,5%) eram resistentes ao aztreonam. Este achado apoia a estratégia proposta para o uso combinado de um inibidor de serino-betalactamase como o avibactam, caso seja utilizado o aztreonam para tratar as infecções causadas por metalo-betalactamases (FALCONE et al., 2021).

Antes de testarmos a combinação CAZ-AVI + ATM, realizamos o teste de disco-difusão com CAZ-AVI puro e com ácido dipicolínico, todos nossos isolados foram resistentes a CAZ-AVI, porém notamos uma potencialização do antimicrobiano com o uso do inibidor de metalo-betalactamase, assim como diversos estudos relataram essa ação do DPA e de seus derivados em metalo-betalactamases quando adicionado a diferentes betalactâmicos ao testar *Klebsiella* e *Pseudomonas*. (CHEN et al., 2019; CHEN et al., 2017; GISKE et al., 2011; KIMURA; ISHII; YAMAGUCHI, 2005)

Testamos inicialmente em nossos isolados o ensaio de sinergismo por disco-aproximação de ATM com CAZ-AVI; entretanto as interpretações deste teste é subjetiva, pois não é possível avaliar numericamente, e quando há sensibilidade ao aztreonam o sinergismo não é revelado.

A CIM<sub>90</sub> para CAZ-AVI observada neste estudo (0,125 mg/L) é o mesmo observado por Esposito et al (2021) ao estudar isolados de *K. pneumoniae* da Ásia, Oriente Médio, Asia-Pacífico, e uma diluição menor que a observada para a Europa e América Latina. Quando os diâmetros do halo de inibição, obtidos para o teste de disco combinado de pré-difusão com ATM e CAZ-AVI, foram comparados com a CIMs ATM-AVI, foi observado que um diâmetro  $\geq 23$ mm apresentava excelente correlação com CIMs de ATM-AVI  $\leq 1$  mg/L, o ECOFF calculado. O ponto de corte de

sensibilidade para ATM definido pelo EUCAST e o ECOFF para ATM-AVI são 1mg/L; conseqüentemente é possível que ATM-AVI tenha o mesmo ponto de corte atualmente utilizado para ATM. O método de pré-difusão de disco combinado tem duas limitações. Os pontos de corte foram definidos utilizando-se um único lote de ágar Mueller-Hinton e discos uma única da marca. Além disso, isolados ATM-AVI produtores de NDM com CIMs maiores 1mg/L não estavam disponíveis para teste; conseqüentemente, não é possível interpretar diâmetros de zona de inibição menores que 23mm.

Por outro lado, o teste padronizado neste estudo permite inferir a sensibilidade ao ATM-AVI e atende às necessidades dos laboratórios clínicos para o momento atual, pois não há discos nem fitas de ATM-AVI comercialmente disponíveis atualmente. Além disso é um teste de baixo custo e pode ser implementado em qualquer laboratório clínico no mundo. Comprar avibactam e manter soluções congeladas a -70°C não é viável para a maioria absoluta dos laboratórios clínicos em todo o mundo.

Recentemente foi publicado um estudo realizado em um hospital público de Aracaju, onde 50,3% das amostras foram positivas para NDM, assim como Silva et al (2019), que também relatou um número elevado de isolados produtores de NDM em nove estados diferentes do Brasil, demonstrando assim uma elevada capacidade de disseminação do gene *bla*<sub>NDM</sub> pelo país (VIVAS et al., 2020)

A coexpressão de carbapenemases já foi relatada em outras espécies bacterianas, como *Enterobacter hormaechei*, mas também há estudos que relataram em *Klebsiella pneumoniae*, tanto no Brasil como em outros países. No Brasil e no Paquistão observou-se a coprodução de NDM-1 e KPC-2, na Coreia do Sul NDM-1 e OXA-181 e na China NDM-1 e IMP-4. Essa coexpressão de genes de resistência é preocupante, pois confere à bactéria a capacidade de sobrevivência frente à exposição a todos os betalactâmicos atualmente em uso clínico no Brasil. No caso de coprodução, uma das alternativas é o uso combinado de CAZ-AVI e ATM (BENCHETRIT et al., 2020).

A frequência de coprodução de NDM e KPC no complexo *K. pneumoniae* observada nesse trabalho foi de 12,4%. Não há muitos estudos que tenham avaliado essa frequência; entretanto, há muitos relatos de coprodução de carbapenemases em todo mundo, inclusive relatos de *K. pneumoniae* abrigando até genes de quatro carbapenemases diferentes. Em 2019, um estudo avaliou 117 cepas de *K.*

*pneumoniae* onde 24 dessas cepas apresentaram a coprodução de *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>KPC</sub> (FLORES et al., 2020; LIU et al., 2019)

O achado de coprodução em uma parcela significativa dos isolados reforça a importância da detecção adequada dos tipos de carbapenemases. Os ensaios fenotípicos que utilizam apenas bloqueadores de metalo-betalactamases não permitem o diagnóstico preciso da coprodução de KPC e NDM (MAGALHÃES, 2018; PEREIRA et al., 2015; QUILES et al., 2015).

Os perfis eletroforéticos obtidos por PFGE foram comparados, considerando-se parte do mesmo grupo clonal os isolados com índice de similaridade de Dice igual ou superior a 80%.

Não há grandes estudos que avaliam a diversidade clonal em cepas produtoras de NDM. Os estudos presentes até hoje fornecem evidências para a propagação de genes por plasmídeos com diferentes grupos de incompatibilidade em diferentes grupos clonais, espécies e gêneros. Esses autores concluíram que há uma grande diversidade clonal entre cepas produtoras de NDM e disseminação de NDM está associada a diversos STs (JAIN et al., 2014; WU et al., 2019)

Contrastando com as descrições mais frequentes na literatura em outros locais do mundo para produtores de NDM, exceto Grécia e China, neste estudo observamos a predominância de grandes grupos clonais, com presença de isolados do mesmo clone em cidades Brasileiras de diferentes regiões geográficas. Digno de nota, os grupos clonais observados no período de uso de CAZ-AVI possuíam um número menor de isolados cada, que pode ser compatível com maior disseminação de plasmídeos, como já descrito na literatura.

No Brasil, recentemente um estudo foi realizado em *K. pneumoniae* produtoras de NDM, KPC e coprodutoras de NDM e KPC. O IncFIB e o IncQ foram os plasmídeos mais frequentes, seguidos por IncA / C, IncHI1B e IncL / M, indicando que existia variabilidade plasmidial nesses isolados e indica a habilidade dessa espécie de adquirir genes de resistência e disseminá-los por meio de plasmídeos conjugativos e mobilizáveis (OLIVEIRA, E. M. et al., 2020).

## 6 CONCLUSÕES

- A espécie predominante na amostragem foi *K. pneumoniae*.
- A disseminação clonal, observada neste estudo, contrasta com a diversidade clonal descrita em outros locais do mundo para produtores de NDM.
- Considerando os pontos de corte atuais para ATM, é provável que haja resposta clínica adequada no uso de ATM-AVI no tratamento de infecções causadas por isolados produtores de NDM e coprodutores de KPC e NDM.
- Utilizando-se o valor de corte de 5 mm para a diferença entre halos de inibição, de MEM com AFB e EDTA e o segundo maior halo com inibidor, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade foi de 97,0%.
- O método de pré-difusão com CAZ-AVI e ATM é um método simples e o diâmetro  $\geq 23$  mm tem excelente correlação com a CIM para ATM-AVI  $\leq 1/4$  mg/L.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. S. et al. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3640-6, Oct 2006.
- AMBLER, R. P. A estrutura das  $\beta$ -lactamases. . **Philos Trans Soc Biol Sci** **321–31.**, p. 321–31. , 1980.
- ANVISA. Aprovados dois novos medicamentos Eplusa e Torgena obtêm registro junto ao órgão para comercialização no Brasil., 26/06/2018 2018.
- BARBERINO, M. G. et al. Isolation of blaNDM-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 1, p. 47-50, Jan - Feb 2018.
- BARRIOS-CAMACHO, H. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 10610, Jul 23 2019.
- BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 10, p. 1849-51, Oct 2016.
- BASU, S. Variants of the New Delhi metallo-beta-lactamase: new kids on the block. **Future Microbiol**, v. 15, p. 465-467, May 2020.
- BENCHETRIT, L. et al. Successful treatment of septic shock due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* using ceftazidime/avibactam combined with aztreonam in solid organ transplant recipients: report of two cases. **Int J Antimicrob Agents**, v. 55, n. 1, p. 105842, Jan 2020.
- BERTONCHELI, C. D. M.; HORNER, R. Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. . **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577-599 dez 2008.
- BIEDENBACH, D. J. et al. In vitro activity of aztreonam-avibactam against a global collection of Gram-negative pathogens from 2012 and 2013. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 7, p. 4239-48, Jul 2015.
- BLIN, C. et al. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. **Environ Microbiol**, v. 19, n. 5, p. 1881-1898, May 2017.
- BRCAST. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas p. 1-44, september 2018.
- BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*

*subsp. nov.* and *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov.*, and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, n. Pt 9, p. 3146-52, Sep 2014.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 64, 2014.

BROGDEN, R. N.; HEEL, R. C. Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 31, n. 2, p. 96-130, Feb 1986.

BUSH, K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. **Clin Infect Dis**, v. 27 Suppl 1, p. S48-53, Aug 1998.

\_\_\_\_\_. The ABCD's of beta-lactamase nomenclature. **J Infect Chemother**, v. 19, n. 4, p. 549-59, Aug 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211-33, Jun 1995.

CAMPOS, J. C. et al. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7387-95, Dec 2015.

CARRAMASCHI, I. N. et al. Multidrug-resistant *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* carrying blaNDM-blaCTX-M15 isolated from flies in Rio de Janeiro, Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 24, p. 1-5, Mar 2021.

CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 12, p. 2956-7, Dec 2013.

CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 4, p. 2475-6, 2014.

CHEN, A. Y. et al. Investigation of Dipicolinic Acid Isosteres for the Inhibition of Metallo-beta-Lactamases. **ChemMedChem**, v. 14, n. 13, p. 1271-1282, Jul 3 2019.

CHEN, A. Y. et al. Dipicolinic Acid Derivatives as Inhibitors of New Delhi Metallo-beta-lactamase-1. **J Med Chem**, v. 60, n. 17, p. 7267-7283, Sep 14 2017.

CHILDS, S. J.; BODEY, G. P. Aztreonam. **Pharmacotherapy**, v. 6, n. 4, p. 138-52, Jul-Aug 1986.

CIEVS, C. D. I. E. E. V. E. S.-. et al. Nota Técnica nº 04/2019 – Alerta surto de bactéria multirresistente p. 2, 18/01/2019 2019.

COURA, F. M. et al. Virulence Genes Profile and Antimicrobial Susceptibility of Community-Acquired Bacterial Urinary Tract Infections in a Brazilian Hospital. **Curr Microbiol**, Sep 14 2021.

DA SILVA, I. R. et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 25, n. 3, p. 394-399, Apr 2019.

DE CAMPOS, T. A. et al. Multidrug-Resistant (MDR) *Klebsiella variicola* Strains Isolated in a Brazilian Hospital Belong to New Clones. **Front Microbiol**, v. 12, p. 604031, 2021.

DOS SANTOS MELO-NASCIMENTO, A. O. et al. Complete genome reveals genetic repertoire and potential metabolic strategies involved in lignin degradation by environmental ligninolytic *Klebsiella variicola* P1CD1. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. e0243739, 2020.

DRANCOURT, M. et al. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 7, 2001 2001.

DRAWZ, S. M.; PAPP-WALLACE, K. M.; BONOMO, R. A. New beta-lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 4, p. 1835-46, 2014.

EFFAH, C. Y. et al. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 19, n. 1, p. 1, Jan 9 2020.

ELLIOTT, A. G. et al. Complete Genome Sequence of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Strain ATCC 700603. **Genome Announc**, v. 4, n. 3, May 26 2016.

EMERAUD, C. et al. Aztreonam plus Clavulanate, Tazobactam, or Avibactam for Treatment of Infections Caused by Metallo-beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 5, May 2019.

EUCAST. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas p. 1-43, jun 2017.

FALCONE, M. et al. Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo-beta-lactamase-Producing Enterobacterales. **Clin Infect Dis**, v. 72, n. 11, p. 1871-1878, Jun 1 2021.

FALCONE, M.; PATERSON, D. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 10, p. 2713-22, Oct 2016.



FDA. **Aprovações de medicamentos novos para 2015** 2015.

FLORES, C. et al. Genetic Relatedness of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Co-Occurring VIM, KPC, and OXA-48 Enzymes from Surveillance Cultures from an Intensive Care Unit. **Microb Drug Resist**, v. 26, n. 10, p. 1219-1226, Oct 2020.

FONSECA, E. L. et al. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 87, n. 4, p. 315-317, Apr 2017.

FUGA, B. et al. Genome Sequences of Clinical Isolates of NDM-1-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* and KPC-2-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* from Brazil. **Microbiol Resour Announc**, v. 9, n. 10, Mar 5 2020.

FURLAN, J. P. R. et al. Genomic Characterization of a Multidrug-Resistant and Hypermucoviscous/Hypervirulent *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* ST4417 Isolated from a Sewage Treatment Plant. **Microb Drug Resist**, v. 26, n. 11, p. 1321-1325, Nov 2020.

GALLENI, M. et al. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 3, p. 660-3, Mar 2001.

GARAU, G. et al. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 7, p. 2347-9, Jul 2004.

GISKE, C. G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 4, p. 552-6, Apr 2011.

GOLZARRI, M. F. et al. Colonization by fecal extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and surgical site infections in patients with cancer undergoing gastrointestinal and gynecologic surgery. **Am J Infect Control**, v. 47, n. 8, p. 916-921, Aug 2019.

GONZALEZ, L. J. et al. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo-beta-lactamase. **Nat Chem Biol**, v. 12, n. 7, p. 516-22, Jul 2016.

HERRIDGE, W. P. et al. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. **J Med Microbiol**, v. 69, n. 2, p. 176-194, Feb 2020.

HOSPITALAR, N. M. D. C. D. I.; (NMCIH/CCD/COVISA). Infome técnico: infecção/colonização microbiana por bactérias multirresistentes produtoras de NDM (New Delhi metalobetalactamase) 2015.

IMAI, K. et al. Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. **BMC Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 946, Nov 8 2019.

JAIN, A. et al. NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 7, p. 1777-84, Jul 2014.

KHAN, A. U.; MARYAM, L.; ZARRILLI, R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. **BMC Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 101, Apr 27 2017.

KIMURA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, n. 3, p. 241-4, Nov 2005.

LENZI, M. H. et al. A New Mutation in *mgrB* Mediating Polymyxin Resistance in *Klebsiella variicola*. **Int J Antimicrob Agents**, p. 106424, Aug 19 2021.

**List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.** 2021.

LIU, X. et al. Diversity and frequency of resistance and virulence genes in *bla* KPC and *bla* NDM co-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from China. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 2819-2826, 2019.

LONG, S. W. et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. **mSphere**, v. 2, n. 4, Jul-Aug 2017.

MAATALLAH, M. et al. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113539, 2014.

MAGALHÃES, V. C. R. S., VALÉRIA MARTINS. . Analysis of resistance mechanisms related to enterobacteria with decreased susceptibility to carbapenems isolated from a referral hospital in infectious diseases. . **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 1214-1221, jun 2018.

MATHERS, A. J. et al. *Klebsiella quasipneumoniae* Provides a Window into Carbapenemase Gene Transfer, Plasmid Rearrangements, and Patient Interactions with the Hospital Environment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 6, Jun 2019.

MIGUEL, G. C. O., EDUARDO ADILSON E SIMIOBATO, ANA VALÉRIA COLNAGHI. Quantificação de antibióticos beta-lactâmicos em medicamentos veterinários: determinação de amoxicilina e ampicilina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Scientific Electronic Library Online**, v. 36, n. 8, p. 1214-1221. , jun 2013.

MOSLEY, J. F., 2ND et al. Ceftazidime-Avibactam (Avycaz): For the Treatment of Complicated Intra-Abdominal and Urinary Tract Infections. **P T**, v. 41, n. 8, p. 479-83, Aug 2016.

NAAS, T. O., S.; BONNIN, RA; DABOS, ML; ZAVALA, A.; DORTET, L.; RETAILLEAU, P.; IORGA, BI,. Base de Dados Beta-Lactamase (BLDB) - Estrutura e Função.. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 32, p. 917-919., 2017.

NAVA, R. G. et al. New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the blaNDM-1-encoding gene in Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 79, p. 101-103, Feb 2019.

NICOLAS, M. F. et al. Comparative Genomic Analysis of a Clinical Isolate of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, a KPC-2 and OKP-B-6 Beta-Lactamases Producer Harboring Two Drug-Resistance Plasmids from Southeast Brazil. **Front Microbiol**, v. 9, p. 220, 2018.

OLIVEIRA, C. B. S. D. et al. Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **J Bras Patol Med La**, v. 47, p. 589-594 dez 2011.

OLIVEIRA, E. M. et al. High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with bla KPC and bla NDM from patients at a public hospital in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 53, p. e20200397, 2020.

PARTE, A. et al. A lista de nomes procarióticos com Standing in Nomenclature (LPSN) é movida para o DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 70 p. 6, 2020.

PARVEZ, S.; KHAN, A. U. Hospital sewage water: a reservoir for variants of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, n. 1, p. 82-88, Jan 2018.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 21, n. 2, p. 234-6, Apr 2015.

PILLONETTO, M. et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 12, p. 7592-4, Dec 2014.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, n. 1, p. 119-23, May 2011.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 2, p. 174-7, Feb 2015.

RAMOS, G.; NASCIMENTO, J. D. S. Antibiotic resistance profile and detection of degradative enzymes by Enterobacteriaceae isolated from raw goat milk. **Germes**, v. 11, n. 2, p. 211-220, Jun 2021.

RAMSEY, C.; MACGOWAN, A. P. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 10, p. 2704-12, Oct 2016.

RIBEIRO, J. L.; COMARELLA, L. Bactérias Multirresistentes e Emergência da Resistência Tipo New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase -1 (NDM-1) v. 16, n. 2, p. 109-118, jan 2015.

ROSENBLUETH, M. et al. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Syst Appl Microbiol**, v. 27, n. 1, p. 27-35, Feb 2004.

ROZALES, F. P. et al. Characterization of Transformants Obtained From NDM-1-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 38, n. 5, p. 634-636, May 2017.

SADER, H. S. et al. Antimicrobial Activities of Aztreonam-Avibactam and Comparator Agents against Contemporary (2016) Clinical Enterobacteriaceae Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 1, Jan 2018.

SAFAVI, M. et al. Global genotype distribution of human clinical isolates of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; A systematic review. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 23, p. 420-429, Dec 2020.

SAMPAIO, J. L.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol**, v. 47 Suppl 1, p. 31-37, Dec 2016.

SAMPAIO, S. C. F. et al. Genotyping of paired KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates with and without divergent polymyxin B susceptibility profiles. **Braz J Microbiol**, Aug 30 2021.

SANTOS, A. et al. First Insights into Clinical and Resistance Features of Infections by *Klebsiella pneumoniae* among Oncological Patients from a Referral Center in Amazon Region, Brazil. **Infect Dis Rep**, v. 12, n. 3, p. 110-120, Dec 3 2020.

SECO, B. M. S. et al. Improved blood culture workflow for faster identification of KPC-producing Enterobacteriales. **Braz J Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 127-132, Jan 2019.

SHARMA, R.; PARK, T. E.; MOY, S. Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/beta-Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms. **Clin Ther**, v. 38, n. 3, p. 431-44, Mar 2016.

SHIELDS, R. K. et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 3, Mar 2017.

SHIELDS, R. K.; DOI, Y. Aztreonam Combination Therapy: An Answer to Metallo-beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria? **Clin Infect Dis**, v. 71, n. 4, p. 1099-1101, Aug 14 2020.

SHIELDS, R. K. et al. Colistin Does Not Potentiate Ceftazidime-Avibactam Killing of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae In Vitro or Suppress Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 8, Aug 2018.

SHIRLEY, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 78, n. 6, p. 675-692, Apr 2018.

TAGLIAFERRI, T. L. et al. Exploring the Potential of CRISPR-Cas9 Under Challenging Conditions: Facing High-Copy Plasmids and Counteracting Beta-Lactam Resistance in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. **Front Microbiol**, v. 11, p. 578, 2020.

TAMMA, P. D.; HSU, A. J. Defining the Role of Novel beta-Lactam Agents That Target Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms. **J Pediatric Infect Dis Soc**, v. 8, n. 3, p. 251-260, Jul 1 2019.

TAVARES, W. [Problems with gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 3, p. 281-301, May-Jun 2000.

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

THOMSEN, V. F. Correlation of the plate-dilution method to the agar diffusion method (disc and tablet methods) with a special view to the importance of pre-diffusion. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 54, p. 107-20, 1962.

TINDALL, B. J.; SUTTON, G.; GARRITY, G. M. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche e Edwards 1960 (Listas Aprovadas 1980) e *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Listas Aprovadas 1980) compartilham o mesmo tipo nomenclatural (ATCC 13048) nas Listas Aprovadas e são sinônimos homotípicos, com consequências para o nome *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (listas aprovadas em 1980). **microbiol Int J Syst Evol** v. 67, n. 2, p. 3, 02/2017 2017.

VALIATTI, T. B. et al. Characterization of virulent *Klebsiella variicola* recovered from inpatients with intestinal and extraintestinal infections between 1987 and 1999. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 101, n. 3, p. 115482, Jul 9 2021.

VIVAS, R. et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 53, p. e20200064, 2020.

WANG, Y. et al. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 22, p. 18-27, Sep 2020.

WINK, P. L. et al. Increased frequency of bla<sub>NDM</sub> in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 299-301, Mar 2021.

WU, W. et al. NDM Metallo-beta-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. **Clin Microbiol Rev**, v. 32, n. 2, Mar 20 2019.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nat Rev Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 344-359, Jun 2020.

YAHAV, D. et al. New beta-Lactam-beta-Lactamase Inhibitor Combinations. **Clin Microbiol Rev**, v. 34, n. 1, Dec 16 2020.

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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, Dec 2009.

ZHANG, B. et al. In vitro activity of aztreonam-avibactam against metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae-A multicenter study in China. **Int J Infect Dis**, v. 97, p. 11-18, Aug 2020.

## ANEXO 1

Correlação pré-difusão disco combinado e Concentração inibitória mínima

ID	Espécies	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	ATM (mg/L)	ATM-AVI (mg/L)	Pré- difusão combinada (mm)	ATM (mm)	CAZ-AVI (mm)
3827	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,44	10	7
4648	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,03	33,69	35	7
4732	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,25	23,97	6	9
4773	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,03	0,03	35,2	39	6
4779	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	25,48	6	7
5116	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	25,9	6	6
5119	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	29,55	9	6
5120	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,31	7	6
5170	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,06	31,62	33	6
5256	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	30,99	14	7
5377	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,03	35,22	40	6
5999	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,125	28,99	28	6
6113	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	31,48	15	6
6265	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	26,78	6	6
6292	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	27,15	6	6
6344	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,125	29,6	30	6
6438	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	28,71	7	6
6442	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,5	0,25	31,07	33	6
6447	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,25	29,4	31	6
6448	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,125	30,69	34	6
6523	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	29,14	10	6
6535	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,125	29,9	32	6
6549	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,5	0,125	29,91	30	6
6659	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,06	30,1	31	6
6710	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	26,41	6	6
6712	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	26,07	6	6
6733	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	30,47	13	6
6735	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,03	29,76	32	6
6770	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,25	24,62	7	8
6773	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	25,37	6	6
6804	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,125	28,68	31	6
6812	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,125	29,43	31	6
6860	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,125	29,21	34	6
6973	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,125	30,82	31	6
7018	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,5	26,62	7	7
7048	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,77	7	6

Continua

ID	Espécies	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	ATM (mg/L)	ATM-AVI (mg/L)	Pré- difusão combinada (mm)	ATM (mm)	CAZ-AVI (mm)
7052	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,06	31,94	33	6
7084	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,25	24,76	7	9
7281	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,25	28,03	8	9
7303	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	27,12	10	9
7434	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,03	35,81	36	6
7485	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	31,56	14	6
7501	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	29,09	6	6
7543	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,57	7	6
7643	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,25	26,32	6	8
7672	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	1	0,5	25,71	32	6
7694	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,25	26,92	6	6
7699	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,5	24,65	6	8
7739	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	4	0,06	30,24	24	7
7796	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	27,94	6	6
7803	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,125	28,28	10	8
7805	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,5	27,21	6	10
7909	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	30,43	6	9
7911	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,25	27,82	6	7
7917	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,25	27,27	6	7
7918	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	1	23,92	6	6
7945	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	30,86	15	6
8011	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	8	0,03	28,44	20	6
8057	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,03	0,03	32,68	30	6
8059	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,03	0,03	31,23	31	6
8061	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,125	30,36	30	6
8126	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	2	0,125	31,85	25	6
8154	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,5	22,95	6	7
8157	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,03	0,03	33,59	34	6
8159	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	2	0,06	32,18	24	6
8160	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,94	9	6
8167	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,03	31,67	30	6
8170	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,06	29,01	30	6
8200	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	8	0,06	28,91	14	6
8205	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,125	28,61	30	6
8211	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	26,16	7	6
8221	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	26,66	7	8
8226	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	4	0,03	28,41	22	6
8227	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,06	32,14	33	6

**Continua**



ID	Espécies	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	ATM (mg/L)	ATM-AVI (mg/L)	Pré- difusão combinada (mm)	ATM (mm)	CAZ-AVI (mm)
8258	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,06	29,98	28	8
8263	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,03	33,63	30	8
8388	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	2	0,06	30,4	24	7
8393	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,93	7	7
8461	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,25	0,125	28,38	28	7
8480	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	2	0,03	34,61	35	7
8611	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	26,54	6	7
8630	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,03	33,44	33	9
8644	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,25	25,36	6	7
8811	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	28,43	8	8
9949	<i>K. pneumoniae</i>	Pos	Pos	≥64	0,5	24,77	6	7
4604	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,73	12	7
5174	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	0,125	0,06	28,54	30	7
5332	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,25	29,27	9	6
6972	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	29,74	11	7
7085	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	29,04	11	6
7502	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	27,71	13	6
7671	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	31,04	13	6
7693	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	27,81	13	7
7697	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	30,65	13	6
7701	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	29,77	9	6
7702	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	29,31	10	6
7801	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	29,23	11	6
7804	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,58	11	7
7876	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,84	12	6
7944	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,52	12	6
8004	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	29,51	10	6
8005	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	0,06	0,06	30,01	30	6
8168	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	27,97	10	7
8440	<i>K. quasipneumoniae</i>	Pos	Neg	≥64	0,125	28,14	15	8
5238	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	1	0,03	29,48	23	6
5336	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	4	0,125	29,99	25	6
6615	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	0,06	0,03	30,89	33	6
7049	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	≥64	0,25	26,36	6	6
7050	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	0,06	0,03	36,77	34	6
7083	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	≥64	0,06	32,4	14	6
7500	<i>K. variicola</i>	Pos	Neg	0,125	0,03	34,29	35	6
8078	<i>K. variicola</i>	Pos	Pos	≥64	0,25	26,58	7	6
8124	<i>K. variicola</i>	Pos	Pos	≥64	0,5	24,61	8	7

Fonte: Autoria própria