



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ELZA FERREIRA FIRMO

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIDROGA-RESISTENTES
PROVENIENTES DE HOSPITAIS DE RECIFE-PE: avaliação morfológica e
ultraestrutural após ação antimicrobianos e análise de antibioticoterapia *in vitro***

Recife
2020

ELZA FERREIRA FIRMO

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIDROGA-RESISTENTES
PROVENIENTES DE HOSPITAIS DE RECIFE-PE: avaliação morfológica e
ultraestrutural após ação antimicrobianos e análise de antibioticoterapia *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Profa Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Coorientadora: Dra. Dyana Leal Veras

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecário: Mônica Uchôa, CRB4:1010

F525i	<p>Firmo, Elza Ferreira.</p> <p>Investigação de genes de resistência a antimicrobianos em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes provenientes de hospitais de Recife-PE: avaliação morfológica e ultraestrutural após ação antimicrobianos e análise de antibioticoterapia <i>in vitro</i> / Elza Ferreira Firmo. – 2020. 102 f.; tab.; 30 cm.</p> <p>Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.</p> <p>Inclui referências, apêndices e anexos.</p> <p>1. Bactérias gram-negativas. 2. Resistência microbiana a medicamentos. 3. Sinergismo farmacológico. 4. Combinação antimicrobiana. 5. Alterações ultraestruturais. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (orientadora). II. Título.</p> <p>616.988 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-102)</p>
-------	--

ELZA FERREIRA FIRMO

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIDROGA-RESISTENTES
PROVENIENTES DE HOSPITAIS DE RECIFE-PE: avaliação morfológica e
ultraestrutural após ação antimicrobianos e análise de antibioticoterapia in vitro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 20/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Aleksandra Maria Lima Scavuzzi (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Jana Messias Sandes (Examinadora Externa)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me dar força e saúde para concluir mais essa etapa em minha vida.

A meus pais e a meus irmãos pelo apoio, compreensão e amor de todas as horas.

Ao meu marido por todo amor, paciência, compreensão e ajuda nos momentos em que mais precisei.

À Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes meu agradecimento sincero pela oportunidade, pela confiança, paciência, ensinamentos e orientação.

Aos colaboradores Prof. Dr. Fábio Brayner, Prof. Dr. Luis Alves e Dra Dyana Veras pelos ensinamentos, pela colaboração e suporte no LBCM e no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LIKA).

Aos técnicos do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE por toda colaboração no sequenciamento das amostras.

Ao biomédico Felipe Ferreira por toda ajuda prestada na coleta dos isolados utilizados neste estudo.

À Dra Jana Sandes por toda contribuição nos experimentos de microscopia eletrônica e conhecimento compartilhado.

À querida amiga Fernanda Lima pela contribuição nos experimentos de *checkerboard* e microscopia eletrônica, pelos conhecimentos trocados e por todos momentos de descontração e amizade ao longo desses quatro anos.

Ao querido amigo Jorge Belém pela contribuição nos experimentos, principalmente me acompanhado ao laboratório à noite, finais de semana e feriados. Pelos conhecimentos compartilhados e por todos momentos de amizade. Gratidão por estar ao meu lado quando tudo parecia sem saída.

À querida amiga Graça Antas por todos momentos de descontração, conselhos, incentivo e ensinamentos sobre Microbiologia. Minha eterna gratidão e carinho!

À querida amiga Cynthia Soares por toda ajuda na quantificação de DNA, amizade, carinho desde a época do mestrado e por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis.

À querida amiga Adriane Cabral por toda amizade, incentivo e apoio.

Às companheiras do grupo de pesquisa, Alexsandra Scavuzzi, Elizabeth Beltrão e Érica Oliveira por toda ajuda prestada, pelo compartilhamento de conhecimento e pelos momentos de descontração nas viagens e congressos.

Aos companheiros do LBCM por toda ajuda prestada, pelo compartilhamento de conhecimento e por todos momentos de descontração e amizade ao longo desses anos.

À Mitaliene por todos momentos de descontração, amizade e por toda ajuda prestada na esterilização, preparação dos materiais e meios utilizados nesse projeto.

Aos colegas de turma, em especial à amiga Maria da Conceição Silva por toda amizade e conhecimento compartilhado nas aulas desde o mestrado.

A todos os professores e funcionários da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Medicina Tropical – UFPE, pelo apoio e amizade de todos esses anos.

Aos professores, técnicos e em especial ao secretário Walter Galdino do Programa de Pós- Graduação em Medicina Tropical por toda ajuda e atenção dispensada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da FACEPE e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.
(KENNEDY, JOHN).

RESUMO

O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de diferentes genes de resistência aos carbapenêmicos, aos aminoglicosídeos, e as polimixinas, em isolados clínicos MDR de enterobactérias provenientes de três hospitais de Recife- PE entre 2016 e 2018. Como também determinar, *in vitro*, a sinergia e a atividade bactericida das combinações de polimixina B, meropenem, amicacina e gentamicina, além de investigar as alterações ultraestruturais causadas por essas associações. Inicialmente, isolados clínicos de enterobactérias resistentes a pelo menos um aminoglicosídeo e a um carbapenêmico foram selecionadas para a investigação da ocorrência de genes codificadores de carbapenemases (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SME}), enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (*aac*(3)-Ia, *aac*(3)-IIa, *aac*(6')-Ib, *ant*(2'')-Ia e *aph*(3')-VI), metilases 16S rRNA (*armA*, *rmtD* e *rmtG*) e o gene *mcr-1*. Esses isolados foram genotipados pela técnica ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction), a concentração inibitória mínima foi determinada por microdiluição em caldo e a detecção desses genes foram realizadas por PCR e sequenciamento. Foram obtidos no total 35 isolados, provenientes de diferentes espécimes, sendo: 16 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, 10 de *Proteus mirabilis* e 09 de *Serratia marcescens* uma alta variabilidade genética entre as espécies. Dentre eles, 89% apresentaram o gene *bla*_{KPC-2}, 26% apresentaram o gene *bla*_{NDM-1} e 97% apresentaram genes EMAs. Esse é o primeiro relato publicado da associação dos genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} e genes EMAs em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *S. marcescens* no Brasil. Após a caracterização fenotípica e genotípica, foram selecionados quatro isolados portadores do gene *bla*_{NDM-1} e resistentes a polimixina B, para determinação *in vitro* da ação das combinações antimicrobianas. Os isolados (K7R2 e K11R2) foram submetidos a combinações de polimixina B, meropenem, amicacina e gentamicina para investigação das atividades sinérgica e bactericida por meio das técnicas de *checkerboard* e *time-kill*. Polimixina B combinada com meropenem e com amicacina foram mais eficazes contra esses isolados. Os isolados P3R3 e S9U foram submetidos a combinações de meropenem com amicacina e gentamicina, além disso, foram selecionados para avaliação de alterações ultraestruturais causadas por essas combinações, através da microscopia eletrônica. Em ambos isolados a combinação de meropenem e gentamicina foi mais eficaz, porém no isolado P3R3 essa combinação foi bactericida com eliminação das células bacterianas após 6h da utilização desses antimicrobianos. Alterações ultraestruturais mais intensas foram observadas quando as células bacterianas foram expostas a combinações sinérgicas e bactericidas. Pode-se concluir que

apesar da circulação de uma nova carbapenemase (NDM) em Recife-PE, o uso de antimicrobianos já conhecidos na prática clínica, como polimixina B, amicacina, meropenem e gentamicina, em associação, podem ser uma alternativa para a antibioticoterapia e para impedir a disseminação de espécies MDR. Adicionalmente, dados obtidos neste estudo alertam para a disseminação de genes de resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos entre isolados clínicos e relacionados clonalmente. O que pode indicar uma alta probabilidade de pacientes estarem servindo de reservatórios para bactérias portadoras dos genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2} e outros determinantes de resistência.

Palavras-chave: Bactérias Gram-Negativas. Resistência microbiana a medicamentos. Sinergismo farmacológico. Combinação antimicrobiana. Alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the occurrence of different resistance genes to carbapenems, aminoglycosides, and polymyxins, in MDR clinical isolates from enterobacteria from three hospitals in Recife-PE between 2016 and 2018. How to also determine, in vitro, the synergy and bactericidal activity of the combinations of polymyxin B, meropenem, amikacin and gentamicin, in addition to investigating ultrastructural changes caused by these associations. Initially, clinical isolates of enterobacteria resistant to at least one aminoglycoside and one carbapenem were selected to investigate the occurrence of genes encoding carbapenemases (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SME}), aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) (*aac*(3)-Ia, *aac*(3)-IIa, *aac*(6')-Ib, *ant*(2'')-Ia e *aph*(3')-VI), 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtD* e *rmtG*) and the *mcr-I* gene. These isolates were genotyped by the ERIC-PCR technique (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction), the minimum inhibitory concentration was determined by microdilution in broth and the detection of these genes was performed by PCR and sequencing. A total of 35 isolates, obtained from different specimens, were obtained: 16 isolates from *Klebsiella pneumoniae*, 10 from *Proteus mirabilis* and 09 from *Serratia marcescens*, with a high genetic variability between species. Among them, 89% had the *bla*_{KPC-2} gene, 26% had the *bla*_{NDM-1} gene and 97% had AMEs genes. This is the first published report of the association of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} and AME genes in clinical isolates of *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *S. marcescens* in Brazil. After phenotypic and genotypic characterization, four isolates carrying the *bla*_{NDM-1} gene and resistant to polymyxin B were selected for in vitro determination of the action of antimicrobial combinations. The isolates (K7R2 and K11R2) were subjected to combinations of polymyxin B, meropenem, amikacin and gentamicin to investigate synergistic and bactericidal activities using checkerboard and time-kill techniques. Polymyxin B combined with meropenem and amikacin were more effective against these isolates. The isolates P3R3 and S9U were subjected to combinations of meropenem with amikacin and gentamicin, in addition, these isolates were selected for evaluation of morphological and ultrastructural changes caused by these combinations, using electron microscopy. In both isolates, the combination of meropenem and gentamicin was more effective, but in isolate P3R3 this combination was bactericidal with elimination of bacterial cells after 6 hours of using these antimicrobials. By electron microscopy, more intense ultrastructural changes were observed when the bacterial cells were exposed to synergistic and bactericidal combinations. It can be concluded that despite the circulation of a new carbapenemase (NDM) in Recife-PE, often

associated with KPC and EMAs, the use of antimicrobials already known in clinical practice, such as polymyxin B, amikacin, meropenem and gentamicin, in combination, may be an alternative to antibiotic therapy and to prevent the spread of MDR species. Additionally, data obtained in this study alert to the spread of genes for resistance to carbapenems and aminoglycosides among clinical and clonally related isolates. This may indicate a high probability that patients are serving as reservoirs for bacteria carrying the blaNDM-1 and blaKPC-2 genes and other resistance determinants.

Keywords: Gram-negative bacteria. Drug resistance microbial. Drug synergism. Antimicrobial combination. Ultrastructural changes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Klebsiella pneumoniae* cultivada em meio de cultura MacConkey.....24
- Figura 2 - *Serratia marcescens* cultivada em meio de cultura ágar MacConkey e ágar BHI..26
- Figura 3 - *Proteus mirabilis* semeada em ágar MH.....28
- Figura 4 - Modos de ação dos antimicrobianos.....30
- Figura 5 - Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.....33
- Figura 6 - Distribuição de isolados portadores do gene *bla*_{NDM} nos estados brasileiros.....43
- Figura 7 - Disseminação global das principais carbapenemases em enterobactérias.....46
- Figura 8 - Distribuição mundial das metiltransferases 16S rRNA.....53
- Figura 9 - Relatórios de isolados produtores de MCR-1 no mundo.....56
- Figura 1 - Perfil de resistência antimicrobiana da *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*. Todos isolados foram pré-selecionados baseado na resistência ao carbapenêmicos e aminoglicosídeos.....80
- Figura 2 - Dendrograma mostrando o perfil genético de A-*P. mirabilis*; B-*S. marcescens*; C-*K. pneumoniae*. Análise de agrupamentos por ERIC-PCR usando o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA. A escala indica a porcentagem de similaridade genética.....80
- Figura 1 - Curva de morte do isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (K7R2) sob ação de polimixina B (PMB), meropenem (MEM), amicacina (AMI) e gentamicina (GEN) isoladamente e em combinação.....96
- Figura 2 - Curva de morte do isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (K11R2) sob ação de polimixina B (PMB), meropenem (MEM), amicacina (AMI) e gentamicina (GEN) isoladamente e em combinação.....96
- Figura 1 - Curva de morte do isolado de *Proteus mirabilis* (P3R3) sob ação de meropenem (MEM), amicacina (AMI) e gentamicina (GEN) isoladamente e em combinação..110
- Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura do isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente.....111
- Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura das combinações usadas contra do isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente.....112
- Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão do isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente.....114
- Figura 5 - Micrografia eletrônica de transmissão das combinações utilizadas no isolado clínico

de <i>Proteus mirabilis</i> (P3R3) multidroga-resistente.....	114
Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura do isolado clínico de <i>Serratia marcescens</i> (S9U) multidroga-resistente.....	127
Figura 2 - Micrografia eletrônica de transmissão do isolado clínico de <i>Serratia marcescens</i> (S9U) multidroga-resistente.....	129
Figura 3- Micrografia eletrônica de transmissão das combinações utilizadas no isolado clínico de <i>Serratia marcescens</i> (S9U) multidroga-resistente.....	130

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Classificação das β -lactamases de acordo com Ambler (1989) e Bush-Jacoby (2010).....	35
Tabela 2 - Fenótipo de resistência esperado de acordo com a produção das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs).....	49
Tabela 3 - Primers utilizados na PCR e sequenciamento dos genes.....	72
Tabela 1- Origem e perfil de resistência antimicrobiana da <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Serratia marcescens</i> provenientes de três hospitais de Recife-PE, Brasil	81
Tabela 2 - Perfil clonal, fenotípico e genotípico dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Serratia marcescens</i> provenientes de três hospitais de Recife, Brasil..	83
Tabela 3 - Prevalência dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) e correlação com antibiogramas esperados e observados em 35 isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemases.....	85
Tabela 1 - Concentrações inibitórias mínimas de amicacina, gentamicina, meropenem e polimixina B isoladamente e resultados de ensaios de <i>checkerboard</i> para isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> positivos para <i>bla</i> _{NDM-1} e <i>bla</i> _{KPC-2}	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Aminoglicosídeos acetiltransferases
AIM	“Australian Imipenemase”
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANT	Aminoglicosídeos adenililtransferases
APH	Fosfotransferases
ArmA	"Aminoglycosides Resistance Methylase"
ASB	Ampicilina/sulbactam
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATM	Aztreonam
BHI	Caldo Brain Heart Infusion
BKC	Brazilian <i>Klebsiella</i> Carbapenemase
<i>bla</i>	Gene codificador de betalactamase
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
BrCAST	Brazilian Committee for Sensitivity Test
Ca⁺⁺	Cálcio
CAMHB	Caldo Müeller-Hinton cátion ajustado
CAUTI	Infecções do trato urinário associado ao cateter
CAZ	Ceftazidima
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxime
DIM	“Dutch Imipenemase”
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
EMAs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ERT	Ertapenem
ESBL	"Extended Spectrum Betalactamase" (Betalactamase de espectro estendido)
F	Forward
FICI	Índice da Concentração Inibitória Fracional
FIM	"Florence Imipenemase"
GEN	Gentamicina
GES	Guiana Extended Spectrum
GIM	"German imipenemase"
h	Horas
ICIF	Índices de Concentrações Inibitórias Fracionárias
IMI	Imipenem
IMP	Imipenemase
IRAs	Infecções relacionadas a assistência à saúde
ITU	Infecções do Trato Urinário
K	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kb	1000 pares de bases
KHM	"Kyorin Health Science MBL"
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MBL	Metalo betalactamase
<i>mcr</i>	"Mobile colistin resistance"
MDR	Multidroga-resistente
MEM	Meropenem
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mg/L	Miligrama por litro
NDM	"New Delhi Metallo-beta-lactamase"

NpmA	rRNA adenine N-1-methyltransferase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
P	<i>Proteus mirabilis</i>
PAV	pneumonia associada à ventilação mecânica
Pb	Pares de bases
PBP	"Penicilin Binding Protein" (Proteínas ligadoras de penicilinas)
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
pEtN	Fosfoetanolamina
pH	potencial hidrogeniônico
PIT	Piperacilina/tazobactam
PMB	Polimixina B
R	Reverse
Rmt	Gene codificador de metiltransferase 16S rRNA
RNA	Ácido ribonucleico
S	<i>Serratia marcescens</i>
SIM	"Seul imipenemase"
SME	"Serratia marcescens enzyme"
SPM	"São Paulo metalo- β -lactamase"
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TIG	Tigeciclina
TKC	Time-Kill Curves
TMB	"Tripoli MBL"
TOB	Tobramicina
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
UV	Ultravioleta
V	Volts
VIM	Verona metallo-beta-lactamase
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma

μl	Microlitro
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	ORDEM ENTEROBACTERALES	23
2.1.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.1.2	<i>Serratia marcescens</i>	25
2.1.3	<i>Proteus mirabilis</i>	28
2.2	ANTIMICROBIANOS	29
2.2.1	Carbapenêmicos	30
2.2.2	Aminoglicosídeos	31
2.2.3	Polimixinas.....	32
2.3	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ENTEROBACTÉRIAS	33
2.3.1	Resistência aos Carbapenêmicos	34
2.3.2	Resistência aos Aminoglicosídeos	46
2.3.3	Resistência às Polimixinas	53
2.4	OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>ENTEROBACTERALES</i> MULTIDROGA-RESISTENTES ⁵⁷	
2.4.1	Terapia combinada	58
2.5	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS POR ANTIMICROBIANOS	60
3	OBJETIVOS	63
3.1	GERAL	63
3.2	ESPECÍFICOS.....	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS.....	64
4.2	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	64
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL	65
4.4	ERIC2-PCR	65
4.5	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SME} E <i>bla</i> _{GES}	65
4.6	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{iMP} E <i>bla</i> _{NDM}	66
4.7	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>bla</i> _{OXA-48}	66

4.8	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS	67
4.9	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES 16S RRNA METILASES	67
4.10	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>mcr-1</i>	67
4.11	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	68
4.12	SEQUENCIAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA	68
4.13	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIMS)	68
4.14	TESTE DE SINERGISMO PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO (“CHECKERBOARD”).....	69
4.15	ESTUDO <i>TIME-KILL</i>	69
4.16	ANÁLISE DA MORFOLOGIA BACTERIANA PELA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	70
4.17	DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	70
4.18	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	71
5	RESULTADOS	73
5.1	ARTIGO 1 – ASSOCIAÇÃO DE <i>BLA_{NDM-1}</i> COM <i>BLA_{KPC-2}</i> E GENES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> , <i>PROTEUS MIRABILIS</i> E <i>SERRATIA MARCESCENS</i> NO BRASIL.	73
5.2	ARTIGO 2 – ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DA POLIMIXINA B EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM, AMICACINA E GENTAMICINA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> PORTADORES DE EMAS, <i>BLA_{NDM-1}</i> E <i>BLA_{KPC-2}</i>	91
5.3	ARTIGO 3 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS CAUSADAS POR COMBINAÇÕES SINÉRGICAS DE MEROPENEM-GENTAMICINA E MEROPENEM-AMICACINA CONTRA UM ISOLADO CLÍNICO MULTIDROGA-RESISTENTE DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> PORTADOR DOS GENES <i>BLA_{NDM-1}</i> , <i>AAC(6)-IB</i> , <i>ANT(2)-IA</i> E <i>APH(3)-VI</i>	101
5.4	ARTIGO 4 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM UM ISOLADO CLÍNICO DE <i>SERRATIA MARCESCENS</i> PORTADORA DOS GENES <i>BLA_{NDM-1}</i> E <i>BLA_{KPC-2}</i> E EXPOSTA A COMBINAÇÕES DE MEROPENEM-GENTAMICINA E MEROPENEM-AMICACINA	120

6	CONCLUSÕES.....	134
	REFERÊNCIAS.....	136
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	168
	APÊNDICE B – ARTIGO ACEITO.....	197
	ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO COM O GRUPO DE PESQUISA.....	212
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP.....	214

1 INTRODUÇÃO

A ordem *Enterobacteriales* é constituída por um extenso e heterogêneo grupo de bacilos gram-negativos fermentadores de carboidratos e que podem ser encontrados no solo, na água e como parte da microbiota normal do trato intestinal dos animais e do homem (ADEOLU *et al.*, 2016). Adicionalmente, podem produzir uma grande variedade de enfermidades no ser humano, que incluem diarreias, infecções de feridas e queimaduras, infecções do trato urinário e respiratório, septicemia e meningite (ANVISA, 2013; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER; 2014). Nos últimos anos, as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) tem se tornado um problema de saúde pública mundial e o tratamento dessas infecções ainda permanece um desafio. A *Klebsiella pneumoniae* é uma das enterobactérias mais envolvidas em IRAS em todo mundo, inclusive no Brasil (LAKE *et al.*, 2018; VOIDAZAN *et al.*, 2020).

Além da *Klebsiella pneumoniae*, as espécies *Serratia marcescens* e *Proteus mirabilis* vêm ganhando destaque no cenário de resistência bacteriana em Recife-PE, principalmente na produção de carbapenemases, como *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) e *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM) (CABRAL *et al.*, 2012; CABRAL *et al.*, 2015; MARGATE *et al.*, 2015; FIRMO *et al.*, 2019b; SCAVUZZI *et al.*, 2017; SCAVUZZI *et al.*, 2019). Esses dados ressaltam a necessidade de mais estudos sobre a genética da resistência dessas bactérias, como também do esclarecimento de quais as melhores opções de antibioticoterapia para tratar as IRAS causadas por essas espécies.

As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (QUEENAN e BUSH, 2007; BUSH e JACOBY, 2010). Além disso, cepas produtoras de KPC e NDM frequentemente apresentam resistência a outros antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, o que pode ser justificado pela presença dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* associado a genes codificadores de metilases e de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) em um mesmo plasmídeo (BUENO *et al.*, 2013; BREMMER *et al.*, 2014). Esses mecanismos de resistência bacteriana dificultam o tratamento e resultam em altos índices de morbidade e mortalidade (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016; CUI; ZHANG; DU, 2019).

A resistência aos aminoglicosídeos também vem ganhando destaque mundialmente, visto que, esses antimicrobianos são muitas vezes utilizados em associação com carbapenêmicos contra microrganismos produtores de carbapenemases. O principal mecanismo

de resistência aos aminoglicosídeos comumente encontrado em enterobactérias é a inativação enzimática, que é mediada por três classes de enzimas, as acetiltransferases (AACs), as nucleotidiltransferases (ANTs) e as fosfotransferases (APHs) (DOI e ARAKAWA, 2007). Outro mecanismo descrito inclui a modificação do sítio alvo por mutação do gene 16S rRNA (GALIMAND *et al.*, 2005), resultando numa baixa afinidade do fármaco ao ribossomo bacteriano e a metilação do 16S rRNA, um mecanismo encontrado na maioria dos organismos produtores de aminoglicosídeos e em isolados clínicos bacterianos (WACHINO e ARAKAWA, 2012; DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016; GALANI *et al.*, 2019).

Diante dos diferentes mecanismos de resistência que podem estar presentes nessas bactérias, o tratamento de IRAS causadas por enterobactérias multidroga-resistentes (MDR) ainda permanece um desafio. Dessa forma a retomada de “velhos” antimicrobianos, como as polimixinas, tem sido uma opção para o tratamento dessas infecções, principalmente associada aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos ou tigeciclina (ANVISA, 2013; TANGDEN e GISKE, 2015). Entretanto, as polimixinas são altamente nefrotóxicas e estudos recentes demonstraram o crescimento da resistência a polimixina B e a crescente incidência de espécies intrinsecamente resistente a esse antimicrobiano (FIRMO *et al.*, 2019b; SHEU *et al.*, 2019). Além disso, o uso da polimixina B em monoterapia tem sido associado a maiores taxas de falha no tratamento em comparação a terapias combinadas (PEREZ *et al.*, 2019). Nesse cenário, a terapia combinada tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana e reduzir o surgimento de resistência (RAHIM *et al.* 2015; BULMAN *et al.* 2017; HAGIYA *et al.*, 2018; KULENGOWSKI *et al.*, 2018).

Portanto, diante do exposto, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de diferentes genes de resistência aos carbapenêmicos e aos aminoglicosídeos, e o gene *mcr-1* de resistência às polimixinas, em isolados clínicos MDR de enterobactérias provenientes de três hospitais de Recife- PE entre 2016 e 2018. Como também determinar, *in vitro*, a sinergia e a atividade bactericida das combinações de polimixina B, meropenem, amicacina e gentamicina, além de investigar as alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por essas associações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ordem Enterobacterales

A ordem *Enterobacterales* foi proposta em 2016 e inclui as famílias *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., e *Budviciaceae* fam. nov. (ADEOLU *et al.*, 2016). Essa ordem é composta por um grupo grande e diversificado de bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos.

Os membros desse grupo habitam diferentes nichos ecológicos e são encontrados no solo, na água e em associação com organismos vivos, incluindo plantas, insetos, animais e seres humanos (ADEOLU *et al.*, 2016). Muitos membros da ordem *Enterobacterales* têm sido implicados como patógenos em humanos e animais, como: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Hafnia*, *Providencia* spp. e *Morganella morgannii* (ANVISA, 2013).

2.1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um bacilo gram-negativo, aeróbio facultativo, não móvel e encapsulado, que pertence à família Enterobacteriaceae. Foi descrita pela primeira vez por Carl Friedllander em 1882, isolada dos pulmões de pacientes que faleceram de pneumonia (FRIEDLLANDER, 1882). Nos meios de ágar exibem colônias grandes e apresentam um fenótipo mucóide, conferido pela cápsula de polissacarídeo (Figura 1). Bioquimicamente, são fermentadoras de lactose, produzem a enzima urease e não são capazes de produzir indol nem sulfeto de hidrogênio. Além de utilizar o citrato como única fonte de carbono (KONEMAN, 2008). De acordo com a classificação taxonômica atual, o gênero *Klebsiella* inclui as espécies *K. pneumoniae*, *K. granulomatis*, *K. quasipneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca* e *K. michiganensis*. A espécie *K. pneumoniae* compreende as subespécies: *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*; enquanto *K. quasipneumoniae* compreende as subespécies: *quasipneumoniae* e *similipneumoniae* (LPSN, 2019).

Os membros desse gênero estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em água, solo, plantas e animais. Se destacam como agentes causadores de diversos tipos de infecções em humanos e por apresentarem um grau variável de virulência, principalmente *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* que são as espécies mais comumente isoladas em

infecções nosocomiais (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; ASENSIO *et al.*, 2000; KONEMAN *et al.*, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER; 2014).

Figura 1- *Klebsiella pneumoniae* cultivada em meio de cultura MacConkey.



Fonte: www.microbiologiaitalia.it

Em humanos, *K. pneumoniae* normalmente coloniza as superfícies mucosas da orofaringe e do trato gastrointestinal, cerca de 38% dos indivíduos transportam essa bactéria nas fezes e de 1% a 6% na nasofaringe. No ambiente hospitalar, estão envolvidas em casos de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (SELINA *et al.*, 2014), doença pulmonar crônica, diarreia (VELASCO *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010), infecções de corrente sanguínea, septicemia neonatal, infecções do trato urinário (ITU) e infecções de pele, feridas e tecidos moles (SOUZA LOPES *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2012; MAGILL *et al.*, 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016; ZHOU *et al.*, 2016, FIRMO *et al.*, 2019b). Como patógeno oportunista, são um problema entre neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos hospitalizados e que apresentam sérias doenças de base, como *diabetes mellitus* e doença pulmonar obstrutiva crônica (KONEMAN *et al.*, 2008; MAGILL *et al.*, 2014).

K. pneumoniae é a bactéria gram-negativa mais frequentemente envolvida em infecções hospitalares e surtos nosocomiais. Muitos surtos causados por este organismo têm sido descritos na literatura, principalmente aqueles referentes a infecções respiratórias em recém-nascidos prematuros em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (VELASCO *et al.*, 2009; DEINSTMANN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; BAILÓN; SACSAQUISPE, 2013; GIAMARELLOU *et al.*, 2013, GIROMETTI *et al.* 2014, HAN *et al.*, 2015, KONG *et al.*, 2019). Entre os anos de 2009 e 2010, dados divulgados pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC),

revelaram que *Klebsiella* spp. foi o sexto microrganismo mais isolado de infecções hospitalares nos Estados Unidos (SIEVERT *et al.*, 2013). Entretanto, em 2014, essas espécies já foram identificadas como a terceira principal causa de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) ficando atrás apenas de *Clostridium difficile* e *Staphylococcus aureus* (MAGILL *et al.*, 2014).

Na América Latina, um estudo associado ao sistema de vigilância SENTRY (“SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”) avaliou a prevalência de bactérias causadoras de infecções em hospitais da Argentina, Brasil, Chile e México, neste estudo a espécie *K. pneumoniae* foi o quarto microrganismo mais isolado em infecções pulmonares. Em infecções de pele e tecidos moles e em infecções da corrente sanguínea foi isolado em 10,4% e 12,3% dos casos, respectivamente (GALES *et al.*, 2012).

Em 2012, dados obtidos da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) revelaram que dos pacientes internados, com infecções primárias da corrente sanguínea, em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de 908 hospitais no Brasil, 12,4% eram causadas por *K. pneumoniae* (ANVISA, 2014). Em outros estudos a *K. pneumoniae* aparece como o segundo patógeno mais comum em infecções de corrente sanguínea, perdendo apenas para *E. coli* (LIN *et al.*, 2014; MAGILL *et al.*, 2014; MARTIN; BACHMAN *et al.*, 2018).

O alto envolvimento desta espécie em infecções graves está relacionado à facilidade na aquisição de plasmídeos de multidroga-resistência, os quais podem possibilitar resistência a diferentes classes de antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos e aminoglicosídeos. Além disso, são consideradas disseminadoras dos genes de resistência, visto que, muitos deles agora comumente encontrados em outras espécies multirresistentes, foram descritos pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae* (BENGOECHEA; PESSOA, 2019).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu *Klebsiella pneumoniae* na lista de microrganismos para os quais são necessárias novas terapêuticas. Fato decorrente do crescente isolamento de cepas resistentes a antimicrobianos de “última escolha” que reduz consideravelmente as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por essa bactéria (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019).

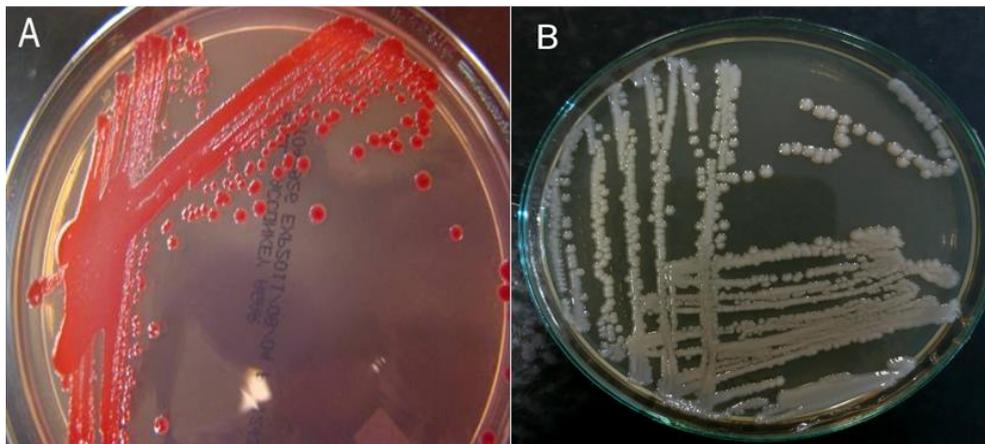
2.1.2 *Serratia marcescens*

O gênero *Serratia* pertence à família *Yersiniaceae* juntamente com os gêneros *Yersinia*, *Chania*, *Ewingella*, *Rahnella*, *Rouxiella* e *Samsonia* (ADEOLU *et al.*, 2016).

Taxonomicamente, existem 14 espécies e 2 subespécies reconhecidas, destas, *S. marcescens* é a mais comumente associada a infecções humanas (MAHLEN, 2011). Esse microrganismo é uma bactéria gram-negativa, móvel, positiva para catalase, citrato, ornitina descarboxilase e lisina. Não produz dissulfeto de hidrogênio nem indol. Além disso, *S. marcescens* é capaz de fermentar sacarose e D-sorbitol, mas não fermenta L-arabinose, rafinose nem lactose. São onipresentes no ambiente e encontradas na água e no solo, além de estarem associadas a plantas, insetos, seres humanos e outros animais (MAHLEN, 2011).

Crescem bem em meios laboratoriais clínicos padrão, como ágar de chocolate ou MacConkey. Suas colônias são grandes, arredondadas com margens inteiras e de coloração variando de esbranquiçadas a avermelhadas. A pigmentação vermelha (produção de prodigiosina) exibida por muitas linhagens ambientais de *S. marcescens*, *S. plymuthica* e *S. rubidaea* é provavelmente a característica mais marcante das colônias desses organismos, porém, em isolados clínicos, que são comumente recuperados de amostras humanas, essas colônias geralmente não são pigmentadas (Figura 2) (MAHLEN, 2011).

Figura 2 - *Serratia marcescens* cultivada em meio de cultura ágar MacConkey e ágar BHI.



Fonte: A: Mahlen, 2011; B: a autora.

Por causa de suas colônias vermelhas facilmente reconhecidas, *S. marcescens* foi considerado como um organismo não patogênico e muito utilizado como marcador biológico (HEJAZI E FALKINER, 1997), porém em 1951, o primeiro surto de infecção nosocomial por essa espécie foi descrito (WHEAT; ZUCKERMAN; RANTZ, 1951). Desde então, *S. marcescens* tem sido frequentemente implicada como um agente etiológico de uma variedade de infecções humanas, sobretudo meningite infantil, endocardites, pneumonias, sepse, ceratite, conjuntivite, infecções do trato urinário, da corrente sanguínea e de feridas cirúrgicas (SU *et*

al., 2003; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; CHAIDAROON; SUPALASET, 2016; RUIZ-SADA; ESCALANTE; LIZARRALDE, 2016).

Embora apresente virulência relativamente baixa, causa infecções associadas à assistência à saúde (IRAS) em pacientes gravemente imunocomprometidos, submetidos a dispositivos médicos, em ambientes hospitalares como unidades de terapia intensiva (UTI) e especialmente em unidades neonatais (UTIN) (REDONDO-BRAVO *et al.*, 2018; CRISTINA; SARTINI; SPAGNOLO, 2019). Raramente, causam infecções invasivas adquiridas na comunidade entre indivíduos não imunocomprometidos (MUSHAM; JARATHI; AGARWAL, 2012; RUIZ-SADA; ESCALANTE; LIZARRALDE, 2016). Além disso, outra característica importante desse microrganismo como patógeno nosocomial é sua resistência intrínseca e adquirida a vários antimicrobianos, incluindo ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, cefalosporinas de espectro estreito, cefuroxima, nitrofurantoína, macrolídeos e polimixinas. Muitos dos isolados clínicos desta bactéria possuem determinantes genéticos cromossômicos e codificados por plasmídeos que especificam resistência a uma ampla gama de antimicrobianos, tornando os surtos ainda mais devastadores para os pacientes comprometidos (MAHLEN, 2011; KARKEY *et al.*, 2018; IOVENE *et al.*, 2019).

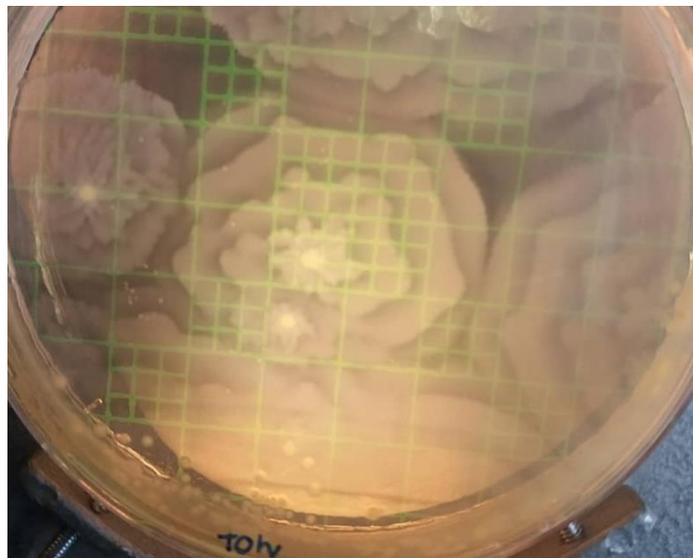
Na literatura, tem havido vários relatos de surtos de *S. marcescens* relacionados à assistência médica, muito deles associados a procedimentos intervencionistas especializados, como cirurgia, broncoscopia e colocação de corpos estranhos, além de práticas de rotina de hospitalização, através de frascos contaminados, desinfetantes, sabonetes e outros materiais. Na maioria dos casos, a falta de condições estéreis e a higiene das mãos, em particular, é a causa mais comum (TAKAHASHI *et al.*, 2004; ARSLAN *et al.*, 2010; VOELZ *et al.*, 2010; VILLA *et al.*, 2012; KARKEY *et al.*, 2018; NIKOLAKOPOULOS *et al.*, 2019). Estima-se que 15% das infecções hospitalares na UTIN esteja relacionada a *S. marcescens*. A maioria dos estudos publicados concluiu que bebês colonizados e infectados são o reservatório mais importante dessa espécie. Além disso, foi observado que uma vez afetada, a maioria das crianças permaneceram colonizadas por longos períodos (VOELZ *et al.*, 2010; MONTAGNANI *et al.*, 2015; JOHNSON; QUACH, 2017; ÁTTMAN *et al.*, 2018).

Na Europa, os dados epidemiológicos de 2016, indicaram que *Serratia* spp. foi o sexto microrganismo isolado mais frequentemente em pacientes com pneumonia hospitalizados em UTIs europeias e ocupava o 10º e 9º lugar, respectivamente, naqueles com infecções da corrente sanguínea e infecções do trato urinário (ECDC, 2016). Já as taxas de morbimortalidade podem variar acentuadamente, sendo relatadas entre 0 a 45% (CRISTINA; SARTINI; SPAGNOLO, 2019).

2.1.3 *Proteus mirabilis*

São bacilos gram-negativos, móveis, anaeróbios facultativo, capazes de produzir urease e sulfeto de hidrogênio, lactose e indol negativa. São facilmente isolados em meios não seletivos utilizados para enterobactérias. Em ágar sangue, produz colônias mucosas ou secas, relativamente grandes, de coloração opaca. Apresenta uma característica particular que é o crescimento em “ondas” na superfície do ágar, ou seja, a partir do ponto de inoculação há formação de círculos concêntricos e uniformes, conhecido como *swarming* (Figura 3) (GIBBS; GREENBERG, 2011).

Figura 3 - *Proteus mirabilis* semeada em ágar MH.



Fonte: a autora.

O gênero *Proteus* consiste em cinco espécies nomeadas, *P.mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens* e *P. hauseri* (O’HARA; BRENNER; MILLER, 2000). Assim como outros membros da família *Morganellaceae*, a espécie de *Proteus mirabilis* é comumente encontrada dispersa no ambiente e como parte da microbiota gastrointestinal humana. No solo e na água, e talvez em animais saudáveis, estão provavelmente envolvidas na degradação do material orgânico por serem capazes de utilizar uréia como fonte de nitrogênio e energia (JACOBSEN *et al.*, 2008). Em ambientes hospitalares, é facilmente encontrada colonizando tanto a pele quanto a mucosa oral de pacientes e de profissionais da saúde. A infecção ocorre principalmente a partir desses reservatórios. A espécie *P. mirabilis* é um agente patogênico oportunista identificado em 90% das infecções causadas por *Proteus* (O’HARA; BRENNER; MILLER, 2000).

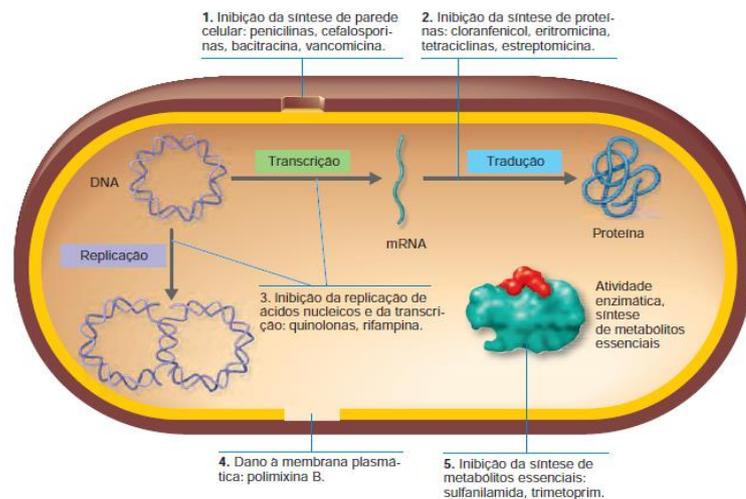
Essa espécie está associada com infecções no recém-nascido, que podem evoluir para meningoencefalite e meningite, com grave prognóstico e alta letalidade (GRAHNQUIST, LUNDBERG, TULLUS, 1992; PHAN; LEHMAN, 2012). Outros estudos correlacionam infecções prévias por *Proteus* com a etiologia da artrite reumatóide (EBRINGER; RASCHID, 2013). Além disso, *P. mirabilis* também tem sido implicada como agentes causais de bacteremias (WATANAKUNAKORN; PERNI, 1994), empiema (ISENSTEIN; HONIG, 1990), osteomielite (MARX *et al.*, 1988), infecções de feridas cirúrgicas e queimaduras, pneumonias, conjuntivites, otites, úlceras de decúbito e infecções em diabéticos (CÓRDOBA *et al.*, 2005; DONNENBERG *et al.*, 2010, RAAKHEE *et al.*, 2014).

Embora a *Escherichia coli* represente a maior porcentagem de casos de cistite não complicada, pielonefrite e prostatite, *Proteus* ocupa o segundo lugar como a causa dessas infecções adquiridas no hospital, principalmente em indivíduos com infecções recorrentes, vários tratamentos com antimicrobianos, portadores de anormalidades estruturais do trato urinário e portadores de cateter uretral (STAMM, 1999; JACOBSEN *et al.*, 2008). Pacientes cateterizados a longo prazo são os mais propensos a desenvolverem infecções do trato urinário associada ao cateter (CAUTI). Geralmente, essas infecções são polimicrobianas e a espécie *P. mirabilis* é um dos microrganismos mais comumente encontrado durante a colonização e infecção da urina polimicrobiana. Além disso, ITUs e CAUTIs decorrentes de *P. mirabilis* são tipicamente complicadas pela formação de pedras na bexiga e nos rins (urolitíase) e lesões renais irreversíveis, com risco de progressão para bacteremia e sepse ou até mesmo morte (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

2.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que agem sobre microrganismos inibindo seu crescimento, também chamadas de bacteriostáticas, ou causando a sua destruição, conhecidas como bactericidas. Os principais modos de ação dos antimicrobianos são inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição, dano a membrana plasmática e inibição da síntese de metabolitos essenciais (Figura 4). Dependendo das suas propriedades químicas, espectro e mecanismos de ação, são classificados como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, polimixinas, entre outros (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 4 - Modos de ação dos antimicrobianos.



Fonte: Tortora; Funke; Case, 2012.

2.2.1 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são uma classe de antibióticos β -lactâmicos, a qual pertencem também as penicilinas, as cefalosporinas e os monobactâmicos. Diferem das penicilinas pela substituição de um átomo de carbono por um átomo de enxofre e pela adição de uma ligação dupla ao núcleo da penicilina. São derivados da tienamicina, um produto natural do microrganismo encontrado no solo, *Streptomyces cattleya* (HELLINGER; BREWER, 1999). Esses antimicrobianos inibem a síntese da parede celular, através da sua ligação às proteínas de ligação da penicilina (PBPs), o que desencadeia a morte da bactéria, portanto são bactericidas. Possuem um espectro de ação extremamente amplo, abrangendo gram-positivos e negativos, sendo, porém, mais eficazes contra gram-negativos, principalmente contra as enterobactérias. São relativamente seguros e utilizados com muita frequência para o tratamento de pacientes em terapia intensiva. Dentre os principais representantes desse grupo estão o imipenem, o ertapenem e o meropenem (TORTORA, 2012).

O meropenem é um carbapenêmico derivado da tienamicina que foi lançado em 1995. Seu espectro de ação estende-se aos gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.), gram-negativos (*Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., dentre outros) e as bactérias anaeróbicas. É comumente prescrito para o tratamento empírico de infecções graves nos pacientes de UTIs. De modo geral, esse antimicrobiano é eficaz no tratamento de infecções intra-abdominais, infecções respiratórias, infecções urinárias, meningite, febre neutropênica e septicemia (WISEMAN *et al.*, 1995).

2.2.2 Aminoglicosídeos

A maior parte dos aminoglicosídeos é de origem natural, produzida por microorganismos pertencentes à família das Actinobacterias. São antimicrobianos que apresentam ampla atividade *in vitro* contra diferentes bacilos gram-negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., assim como atividade contra alguns cocos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* e alguns *Streptococcus* spp., micobactérias e protozoários (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009; VAKULENKO e MOBASHERY, 2003). São ineficazes para bactérias anaeróbias estritas, porque não são transportados através da membrana citoplasmática para o interior da bactéria (TRABULSI, 2008).

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas concentração dependentes, ou seja, quanto maior a concentração do antibiótico, maior é o efeito bactericida e a persistência de sua ação depende do efeito pós-antibiótico, que se caracteriza como a supressão do crescimento bacteriano que persiste depois de curtas exposições ao antimicrobiano. Estes dois aspectos fundamentam a terapia de dose diária única, utilizada para os aminoglicosídeos, sem perda da eficácia (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009). Quanto à segurança, esses antimicrobianos são considerados potencialmente tóxicos e com estreita janela terapêutica. A disfunção renal é a toxicidade mais frequente, porém a deficiência auditiva é a mais preocupante devido a irreversibilidade, que pode ocorrer mesmo após o término do tratamento (DRUSANO *et al.*, 2007).

Na prática clínica, as moléculas mais frequentemente prescritas são gentamicina e ampicacina (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009). A ampicacina é indicada para o tratamento de bacilos gram-negativos não fermentadores (principalmente *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.), enquanto que a gentamicina é largamente utilizada em associação com outra droga, em infecções causadas por *Enterococcus* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O uso dos aminoglicosídeos foi preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como alternativa para a terapia empírica no tratamento de infecções por enterobactérias multirresistentes, especialmente as produtoras de KPC (ANVISA, 2013). No tratamento de infecções graves, como infecções urinárias associadas à sepse ou ainda, infecções de corrente sanguínea e pneumonia associada à ventilação mecânica, estes antibióticos são utilizados preferencialmente em terapia combinada com a polimixina (B ou E), com ou sem

carbapenêmico (imipenem ou meropenem), ou tigeciclina (HIRSCH *et al.*, 2010; ANVISA, 2013).

2.2.3 Polimixinas

As polimixinas surgiram na década de 40 e seu uso foi abandonado devido a sua neurotoxicidade e nefrotoxicidade, ocasionadas pelo uso prolongado. Elas são antimicrobianos polipeptídicos, isolados do *Bacillus polymyxa*, que agem nas membranas celulares promovendo a diminuição da integridade da parede celular e consequente morte celular bacteriana (GIRARDELLO; GALES, 2012, POIREL; JAYOL; NORDMNN, 2017).

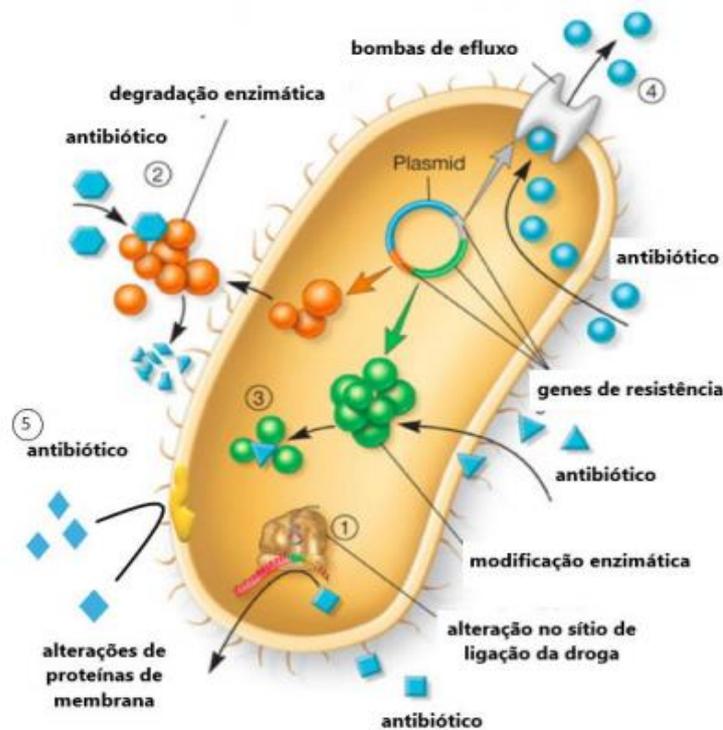
Constituem um grupo de cinco substâncias intimamente relacionadas que receberam os nomes de polimixina A, B, C, D e E, apresentando a polimixina E, o nome de colistina por ser naturalmente produzida pelo *Bacillus colistinus* (FALAGAS; KASIAKOU, 2006), porém, somente as polimixinas B e E foram disponibilizadas para uso devido à alta toxicidade das demais. Ambas, apresentam a mesma atividade *in vitro*, com diferença apenas em sua composição química, onde observa-se a presença de um aminoácido D-Leucina na molécula de colistina na mesma posição onde existe um D-fenilalanina da molécula da polimixina B (GIRARDELLO; GALES, 2012). Além disso, a polimixina B é utilizada na forma ativa de sulfato de polimixina B, enquanto a colistina é administrada como pró-droga inativa, o metanossulfonato de colistina, também conhecido como colistimetato (NATION; VELKOV; LI, 2014).

O espectro de ação da polimixina B abrange somente bactérias gram-negativas, com algumas exceções, como *Proteus* spp. *Burkholderia* spp., *Serratia* spp. e *Providência* spp., que apresentam resistência intrínseca a esse agente antimicrobiano. Além disso, são inativas contra cocos gram-negativos, bactérias gram-positivas e bactérias anaeróbias (SADER *et al.*, 2015). Esses antimicrobianos são anfipáticos e atuam nas membranas externa e citoplasmática do microrganismo. Apresentam ação semelhante à de detergentes catiônicos, por interação com componentes da membrana celular como os lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos. Essa ligação resultará num deslocamento dos íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} que agem estabilizando a membrana celular. A desestabilização da membrana implicará a ruptura da mesma, ocasionando perda do conteúdo citoplasmático, resultando na morte da bactéria (VELKOV *et al.*, 2013).

2.3 Resistência aos antimicrobianos em enterobactérias

A resistência bacteriana em enterobactérias pode ocorrer pela presença de mecanismos intrínsecos ou adquiridos (DAVIES; DAVIES, 2010). A resistência intrínseca ocorre de forma natural e sem uma exposição prévia ao antimicrobiano, enquanto que a resistência adquirida ocorre por meio da pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, o que geralmente leva a mutações genéticas e pode dar origem a genes de resistência que são transferidos entre as espécies bacterianas (ANVISA, 2007). Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antimicrobianos que são: a alteração da permeabilidade, a alteração do local de ação, a bomba de efluxo e o mecanismo enzimático, mediado por genes de resistência adquiridos através de elementos genéticos moveis, que altera a estrutura química do antibiótico. Estes mecanismos estão representados na figura 5. A associação de vários mecanismos leva a multirresistência, limitando drasticamente as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas no ambiente hospitalar (DAVIES; DAVIES, 2010).

Figura 5 - Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.



Legenda: 1- Alteração do sítio de ligação. 2- Hidrólise do antimicrobiano por degradação enzimática. 3- Modificação do antimicrobiano por enzimas. 4- Hiperexpressão de bombas e sistema de efluxo. 5- Perda ou alterações de proteínas de membrna externa. Fonte: (<http://downofilebp.ga/peja/ampicillin-resistance-mechanism-in-bacteria-2257.php>). Acessado em: 15 de dezembro de 2019.

2.3.1 Resistência aos Carbapenêmicos

O surgimento de cepas produtoras de ESBLs dificultou o uso das cefaloporinas de amplo espectro no tratamento rotineiro para estas bactérias. Desde então, os carbapenêmicos têm sido utilizados como escolha terapêutica (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009), porém o uso cada vez mais constante destes antimicrobianos, tanto no Brasil como no mundo, resultou em um número crescente de isolados resistentes (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; JEON *et al.*, 2015; IOVLEVA; DOI, 2017; SHEU *et al.*, 2019). A resistência aos carbapenêmicos tem representado um grave problema de saúde pública, particularmente pela elevada mortalidade e pela limitação das opções terapêuticas, visto que, estas cepas frequentemente carregam genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas (CDC, 2013; PITOUT *et al.*, 2015, LEE *et al.*, 2016; NORDMANN; POIREL, 2019).

Vários mecanismos são responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos entre *Enterobacterales*. Ela pode ocorrer por diminuição da permeabilidade da membrana externa (perda ou alterações na estrutura de porinas), alteração do sítio de ligação, atividade de bombas de efluxo que promovem a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da bactéria e por ação enzimática, através das β -lactamases. Dentre esses, o mais importante em enterobactérias é a produção de carbapenemases (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ E GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; NORDMANN; POIREL, 2019).

Essas enzimas representam a mais versátil família das β -lactamases, apresentando um espectro de ação muito mais abrangente em relação às outras já descritas. Elas são capazes de degradar ou inativar eficazmente os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. (NORDMANN; POIREL, 2002; QUEENAN; BUSH, 2007; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). As β -lactamases, incluindo as carbapenemases, são classificadas empregando-se distintos critérios, sendo a classificação de Ambler (1980) e a de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) as mais difundidas (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). O sistema de classificação Ambler categoriza as enzimas β -lactamase em 4 grupos, A, B, C e D, com base em seu domínio catalítico central e preferência de substrato. Destas, as classes A, B e D incluem carbapenemases, enquanto as enzimas da classe C hidrolizam principalmente as cefalosporinas. As enzimas das classes A, C e D possuem serina no local catalítico ativo, enquanto as enzimas da classe B são metalo- β -lactamases (MBLs) com zinco no local ativo (BUSH; JACOBY; 2010; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). Por outro lado, Bush, Jacoby e Medeiros (1995) agruparam as enzimas correlacionando seus substratos e perfis de inibição em grupos de 1 a 4, com subdivisões nos

mesmos. A correlação entre estas duas classificações, molecular e fenotípica, foi atualizada por Bush e Jacoby em 2010 e pode ser visualizada na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das β -lactamases de acordo com Ambler (1989) e Bush-Jacoby (2010).

Classificação Ambler (1980)	Classificação Bush, Jacoby, Medeiros (2010)	Substrato	Representantes
A (serina penicilinases)	2a	Penicilina	PC1
	2b	Penicilinas e cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a geração	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	ESBL (TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB, etc)
	2br	Penicilina	TEM-30, SHV-10
	2c	Carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2e	Cefalosporina espectro estendido	FEC-1, CepA
	2f	Carbapenêmicos	KPC, IMI-1, SME, GES-3, GES-4 GES-5
B (MβLs)	3	Carbapenêmicos	IMP, VIM, SPM, GIM, NDM
C (cefalosporinases)	1	Cefalosporinas	AmpC (ACT-1, FOX, MIR-1, CMY-2, etc)
D (oxacilinases)	2	Oxacilina	OXA-1, OXA-10
	2de	Oxacilina e cefalosporinas de amplo espectro	OXA-11, OXA-15
	2df	Oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48

A primeira enterobactéria produtora de carbapenamase (NmcA) foi um isolado de *Enterobacter cloacae*, relatado em 1993, na França (NAAS; NORDMANN, 1994). A partir daí, diversas carbapenemases têm sido identificadas. Atualmente, as enzimas mais importantes da classe A são *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase (KPC), as da classe B são Verona

imipenemase (VIM), imipenemase (IMP), e em especial New Delhi Metalo β -lactamase (NDM), e as da classe D, oxacilinas (OXA-48) e similares. Embora algumas enzimas sejam codificadas por genes cromossômicos, a maioria está mediada por plasmídeos, o qual favorece a disseminação destas em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; SAMPAIO; GALES, 2016).

2.3.1.1 *Carbapenemases classe A*

As carbapenemases da classe A possuem a capacidade de hidrolisar um amplo espectro de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e o grupo carbapenêmico (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) (PATEL *et al.*, 2009). A maioria dessas enzimas é inibida pelos inibidores de β -lactamase disponíveis clinicamente, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (DRAWZ; BONOMO, 2010).

As carbapenemases de classe A podem ser codificadas por cromossomos (SME, NmcA, SFC-1, BIC-1, PenA, FPH-1, SHV-38), codificadas por plasmídeo (KPC, GES, FRI-1) ou ambas (IMI). As enzimas codificadas por cromossomos foram identificadas em espécies gram-negativas que apareceram esporadicamente em amostras clínicas ou ambientais desde sua primeira descoberta (NAAS; DORTET; IORGA, 2016). Como por exemplo, a SME que foi encontrada apenas em uma pequena subpopulação de *Serratia marcescens* e as enzimas IMI/NMC-A foram identificadas esporadicamente apenas em isolados do complexo *Enterobacter cloacae* (NAAS; DORTET; IORGA, 2016; EICHENBERGER; THADEN, 2019). Por outro lado, as enzimas codificadas por plasmídeo, melhor exemplificadas pela KPC, se espalharam por todo o mundo e hoje ainda é a principal enzima associada à resistência aos carbapenêmicos nas enterobactérias (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; CUI; ZHANG; DU, 2019).

Em 2015, foi descrita no Brasil uma nova carbapenemase classe A, designada por Brazilian *Klebsiella* Carbapenemase-1 (BKC-1). Nicoletti e colaboradores demonstraram que a BKC-1 hidrolisa não apenas carbapenêmicos, mas também penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Até o momento, o gene *bla*_{BKC-1} só foi encontrado em plasmídeo não conjugativo de cepas *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e à polimixina B. Ainda são poucos os relatos de detecção desse gene no país (NICOLETTI *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2016).

a) *GES (Guiana Extended Spectrum)*

A família GES (Guiana Extended Spectrum) foi descrita pela primeira vez na França em 1998 em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente de swab retal de uma paciente previamente internada na Guiana Francesa, daí a origem do nome GES (POIREL *et al.*, 2000). Em 2000, na África do Sul, uma nova variante foi descrita em um isolado clínico de *P. aeruginosa*, a GES-2 (POIREL *et al.*, 2001). Essas enzimas foram inicialmente consideradas ESBLs, contudo, foi verificado que GES-2, possuía uma glicina ao invés de um aspartato na posição 170, o que levou a essa enzima hidrolisar o imipenem. Com isso a família foi reclassificada (POIREL *et al.*, 2001; BUSH; JACOBY, 2010) e atualmente dentre as 31 enzimas reconhecidas, (GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14, GES-18) são classificadas como carbapenemases e estão sendo cada vez mais identificadas em uma variedade de bactérias gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *Kluyvera intermedia* e *Acinetobacter baumannii* (BEBRONE *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; AIRES-de-SOUSA *et al.*, 2019).

Os genes (*bla*_{GES}), que codificam essas enzimas, são frequentemente encontrados em integrons, transposons ou associados à sequências de inserção albergados em plasmídeos (QUEENAN, BUSH, 2007; ANDRADE, 2011; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). Como por exemplo, um estudo na África do Sul que relatou a disseminação de isolados de *K. pneumoniae* produtores GES-5 que carregavam *bla*_{GES-5} em um plasmídeo IncQ (PEDERSEN *et al.*, 2018).

Embora raro, as enzimas GES têm sido identificadas em todo o mundo com relatos na Grécia, França, Portugal, Turquia, África do Sul, Guiana Francesa, Argentina, Coreia, China e Japão (QUEENAN; BUSH, 2007; DJAHMI *et al.*, 2014; ZEKA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016; BONNIN *et al.*, 2017; YOON *et al.*, 2018; AIRES-de-SOUSA *et al.*, 2019). No Brasil, variantes das ESBL do tipo GES são relatadas, principalmente, em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados em hospitais (CASTANHEIRA *et al.*, 2004b; PELLEGRINO *et al.*, 2006). Entretanto, as variantes GES-5 e GES-7 já foram identificadas em cepas de *K. pneumoniae* no estado de São Paulo (DROPA *et al.*, 2010; PICÃO *et al.*, 2010) e em Porto Alegre, em 2011 (RIBEIRO *et al.*, 2014b). O GES-5 também foi detectado em três isolados *K. intermedia* que foram provenientes de pias e torneiras de uma UTI de um hospital terciário de Porto Alegre, em maio de 2013 (RIBEIRO *et al.*, 2014a) e em um isolado de *S. marcescens* obtido a partir de um líquido ascítico, em 2014 (NODARI *et al.*, 2017). Contudo, relatos desta enzima ainda são esporádicos também no Brasil.

b) *KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase)*

A carbapenemase do tipo KPC são enzimas do grupo funcional 2f e da classe A de Bush e Jacob, 2010, capazes de hidrolisar beta-lactâmicos de todas as classes, apresentando maior potencial de hidrólise para cefalotina, nitrocefina, benzipenicilina, ampicilina e piperacilina (BUSH; FISHER, 2011). Esta carbapenemase foi descrita pela primeira vez, através de um projeto de vigilância (ICARE- “Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology”), em uma amostra clínica de *K. pneumoniae*, origem do nome, proveniente da Carolina do Norte em 1996 (YIGIT *et al.*, 2001).

Dois anos depois, Yigit e colaboradores reportaram, a partir do mesmo projeto de vigilância (ICARE), uma amostra de *K. oxytoca* KPC- positiva, mas foi constatado que havia a diferença de um aminoácido com relação à KPC-1. Assim, esta enzima foi chamada KPC-2 (YIGIT *et al.*, 2003). Porém, uma correção da sequência nucleotídica de KPC-1 indicou que os genes *bla*_{KPC-1} e *bla*_{KPC-2} são idênticos, por isso desde então, a designação KPC-1 deixou de ser utilizada (YIGIT *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2009). Uma variação de um único aminoácido da KPC-2, designada KPC-3, foi reportada em um surto de *K. pneumoniae* em um centro médico de Nova Iorque (WOODFORD *et al.*, 2004). A KPC-4 também vem de uma mutação da KPC-2, assim como a KPC-5, descrita em uma amostra de *P. aeruginosa* (WOLTER *et al.*, 2009). Foram detectadas 23 variantes do gene *bla*_{KPC}, sendo as enzimas KPC-2 e KPC-3 as mais prevalentes no mundo (ANDRADE *et al.*, 2011; NAAS; DORTET; IORGA, 2016).

As enzimas do tipo KPC têm sido apontadas atualmente como as mais significativas clinicamente entre as carbapenemase de classe A devido a sua grande disseminação (LEE *et al.*, 2016; EICHENBERGER; THADEN, 2019). A propagação endêmica de bactérias produtoras dessa enzima tem sido relatada nos EUA, China, Itália, Polônia, Grécia, Israel, Brasil, Argentina, Colômbia e Taiwan (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; van DUIN; DOI, 2017). A difusão esporádica de *K. pneumoniae* produtoras de KPC também tem sido observada em muitos países europeus, incluindo Espanha, França, Alemanha, Holanda, Reino Unido, Irlanda, Bélgica, Suécia e Finlândia e em vários países da região Ásia-Pacífico, incluindo a Índia, Coreia do Sul e Austrália (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013, NORDMANN; POIREL, 2014, LEE *et al.*, 2016;).

Na América Latina, um estudo de 255 pacientes com bacteremia por *Enterobacteriaceae* em 11 hospitais de 7 países (Argentina, Colômbia, Equador,

Guatemala, México, Peru, Venezuela) revelou que 21% dos casos eram de bactérias produtoras de carbapenemase. A maioria destes (83%) eram *Enterobacteriaceae* produtores de KPC (van DUIN; DOI, 2017) . No Brasil, o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foi em 2006, sendo isoladas de urina e sangue de quatro pacientes hospitalizados em uma unidade de cuidados intensivos de um hospital em Recife (MONTEIRO *et al.*, 2009). No mesmo ano houve relatos no Rio de Janeiro (PEIRANO *et al.*, 2009) e em São Paulo (PAVEZ *et al.*, 2009).

Desde então já foi descrito nas cinco regiões brasileiras, sendo detectado, até o momento, apenas o alelo *bla*_{KPC-2} (BUSH; JACOBY; 2010; ROSSI, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012a; ALMEIDA *et al.*, 2012b), inclusive em Recife-PE (CABRAL *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2014; CABRAL *et al.*, 2014). Em 2010, foram relatados com grande repercussão na mídia, surtos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em vários estados brasileiros, causando grande apreensão na comunidade médica e científica. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou, através de uma nota técnica, medidas para o controle da disseminação de bactérias multidroga-resistentes incluindo enterobactérias produtoras de KPC (ANVISA, 2010).

Apesar de ser frequentemente encontrada em *K. pneumoniae* este gene tem sido identificado em outros membros da família Enterobacteriaceae, como as espécies de *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *K. oxytoca*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri* e *Serratia* spp. (MIRIAGOU *et al.*, 2003b; YIGIT *et al.*, 2003; BRATU *et al.*, 2005a; ANDERSON *et al.*, 2007; QUEENAN; BUSH, 2007; ZHANG *et al.*, 2007, PETRELLA *et al.*, 2008; MARGATE *et al.*, 2015; CABRAL *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2018; FIRMO *et al.*, 2019b) e também em não fermentadoras como a *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (VILLEGAS *et al.*, 2007; ROBLEDO *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; JÁCOME *et al.*, 2012).

O que torna a KPC mais importante do que as outras enzimas da classe A é o fato do gene *bla*_{KPC} ser encontrado em elementos móveis, o que garante a sua dispersão não só entre as espécies de *Klebsiella*, mas entre outros gêneros. Muitos trabalhos têm relatado que o gene *bla*_{KPC} é carregado pelo transposon Tn4401 (DRAWZ *et al.*, 2010; CUZÓN *et al.*, 2010; NASS *et al.*, 2012), inserido em uma variedade de plasmídios transferíveis (CHEN; ANDERSON; PATERSON, 2012), isso facilita a transferência do gene inter-espécies e, conseqüentemente, acentua o seu potencial de disseminação (QUEENAN; BUSH, 2007; NAAS *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2009; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012).

c) SME (*Serratia marcescens* enzyme)

Essa enzima foi inicialmente detectada em dois isolados de *S. marcescens* coletados na Inglaterra em 1982 (YANG; WU; LIVERMORE, 1990). Até o momento, cinco variantes foram descritas (SME-1, SEM-2 e SME-3, SME-4, SME-5), elas diferem entre si apenas por uma ou duas substituições de aminoácidos. Foram encontradas exclusivamente em uma pequena subpopulação de *S. marcescens* (QUEENAN *et al.*, 2006).

Após a descoberta do SME na Inglaterra, as variantes dessa enzima já foram identificadas nos EUA, Argentina, Suíça e Canadá (QUEENAN *et al.*, 2000; DESHPANDE *et al.*, 2006; QUEENAN *et al.*, 2006; POIREL *et al.*, 2007; PASTERAN *et al.*, 2009; BUSH *et al.*, 2013; MATASEJE *et al.*, 2014; HOPKINS *et al.*, 2017; DABOS *et al.*, 2019). No Brasil, a SME-4 foi identificada em isolados de *S. marcescens*, resistentes ao meropenem, provenientes do Rio de Janeiro (CAYÔ *et al.*, 2017).

2.3.1.2. Carbapenemases classe B

As carbapenemases da classe B ou metalo β -lactamases (MBLs), correspondem ao grupo funcional 3 (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010). Elas possuem a capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos disponíveis comercialmente, exceto o aztreonam (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). As MBLs não são hidrolisadas por inibidores de β -lactamase que são comumente encontrados no cenário clínico, como clavulanato, tazobactam ou avibactam (MEINI; LLARRULL; VILA, 2015). Devido a sua exigência de um íon zinco no sítio ativo, essas enzimas são inibidas por metais quelantes de íons, tais como ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dipicolínico, 1,10-o-fenantrolina e ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (MARCHIARO *et al.*, 2008).

Como todas as β -lactamases, as MBLs podem ser codificadas cromossomicamente ou transmitidas através de elementos genéticos móveis (plasmídeos) (WALSH *et al.*, 2005a). As MBLs móveis ou adquiridas, devido a sua facilidade de disseminação e a limitação das opções de tratamento para infecções causadas por patógenos produtores dessas enzimas, são atualmente as mais estudadas. Dentre essas, NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase) (YONG *et al.*, 2009), IMP (imipenemase) (WATANABE *et al.*, 1991) e VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI *et al.*, 1999) têm maior destaque mundial e são frequentemente detectados em enterobactérias, como *Serratia marcescens* (OSANO *et al.*, 1994; ITO *et al.*,

1995; SILVA *et al.*, 2015), *E. coli* (MIRIAGOU *et al.*, 2003a), *Proteus mirabilis* (VOURLI *et al.*, 2006), *Klebsiella pneumoniae* (YAN *et al.*, 2001b; IKONOMIDIS *et al.*, 2005; LINCOPAN *et al.*, 2005; PENTEADO *et al.*, 2009), *Klebsiella oxytoca* (SHIBATA *et al.*, 2003), etc. Outras enzimas dessa classe também já foram identificadas como a SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (TOLEMAN *et al.*, 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA *et al.*, 2004) e SIM (Seul imipenemase) (LEE *et al.*, 2005a), KHM (Kyorin Health Science MBL), AIM (Australian Imipenemase), DIM (Dutch Imipenemase), SMB (*S. marcescens* MBL), TMB (Tripoli MBL), FIM (Florence Imipenemase), porém não há relato de disseminação além de seus países de origem (JABALAMELI *et al.*, 2018).

a) *NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase)*

O primeiro relato de NDM ocorreu em *K. pneumoniae* isolada de uma infecção do trato urinário de um paciente que vivia na Suécia, mas havia sido internado em Nova Delhi (YONG *et al.*, 2009). Desde então, essa enzima tem sido foco de atenção mundial devido à rápida disseminação do gene *bla*_{NDM} (ANDRADE, 2011; DJAHMI *et al.*, 2014; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

Embora reportada progressivamente em todos os continentes, a disseminação internacional de bactérias produtoras NDM tem sido fortemente associada a viagens e ao recebimento de cuidados médicos no Subcontinente Indiano (Índia, Paquistão, Sri Lanka e Bangladesh) (KUMARASAMY *et al.*, 2010; JAIN *et al.*, 2014). Essa região é considerada o maior reservatório do gene *bla*_{NDM-1}, sendo o mesmo detectado não apenas em amostras de pacientes, mas também em amostras ambientais. Além disso, essas amostras ambientais revelaram a disseminação do *bla*_{NDM-1} para novas espécies bacterianas, incluindo *Shigella boydii* e *Vibrio cholerae* (WALSH *et al.*, 2011).

Apesar disso, relatos da ocorrência desse gene têm sido documentados em indivíduos que não viajaram para áreas consideradas de alto risco (JAIN *et al.*, 2014). E outros locais despontam como de grande circulação dessa enzima como os estados Balcânicos, a Península Arábica e o Norte da África (NORDMANN; POIREL, 2014; van DUIN; DOI, 2017). Nos Estados Unidos, recentemente, dados do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) revelaram que dos 168 isolados de *Enterobacteriaceae* que produziram MBL (VIM e NDM), 151 deles produziram NDM (CDC, 2016).

Atualmente, são conhecidas 17 variantes alélicas do gene *bla*_{NDM} (KHAN *et al.*, 2017). Existem relatos na literatura que mostram que essa carbapenemase já está mundialmente disseminada. Amostras de *K. pneumoniae* produtoras de NDM-1 foram identificadas na Itália,

Reino Unido, Turquia, Quênia, China, Colômbia, Guatemala, Canadá, Estados Unidos (NORDMANN; POIREL, 2014). A variante NDM-2 foi descrita em vários isolados clínicos de *A. baumannii* (ESPINAL *et al.*, 2013; GHAZAWI *et al.*, 2012). E as variantes NDM-4, NDM-5, NDM-6 e NDM-7 foram observadas em isolados de enterobactérias de pacientes com história de hospitalização na Índia (NORDMANN *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Entre as amostras de *Enterobacteriales*, *K. pneumoniae* e *E. coli* são as mais frequentemente relatadas como produtoras de NDM-1 (POIREL *et al.*, 2011b; POIREL *et al.*, 2011c). No entanto, este gene também tem sido descrito em outros representantes dessa ordem como *Klebsiella oxytoca* (HUANG *et al.*, 2013), *Proteus mirabilis* (QIN *et al.*, 2015), *Serratia marcescens* (GRUBER *et al.*, 2015), e *Providencia* spp. (MANAGEIRO *et al.*, 2015), entre outros.

No Brasil foi detectada pela primeira vez em 2013 no Rio Grande do Sul, em um isolado de *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013), atualmente encontra-se disseminada em diversos estados (Figura 6). O gene *bla*_{NDM-1} foi encontrado, pelo mesmo grupo de pesquisa de Porto Alegre-RS, em *E. hormaechei*, *E. cloacae* e *Morganella morganii* (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014; ROZALES *et al.*, 2014). Também há relatos da presença dessa carbapenemase em espécies de *Acinetobacter* no Rio Grande do Sul (PAGANO *et al.*, 2015), Paraná e em Santa Catarina (PILLONETTO *et al.*, 2015). Além de ter sido encontrada em *P. rettgeri* provenientes de São Paulo (Do CARMO JUNIOR *et al.*, 2015), em *K. pneumoniae* de Brasília (FARIA-JUNIOR *et al.*, 2016), do Rio de Janeiro (AIRES *et al.*, 2017) e de Salvador-BA (BARBERINO *et al.*, 2018). Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a presença desse gene em *K. pneumoniae*; *P. mirabilis* e *S. marcescens* provenientes de Recife-PE (FIRMO *et al.*, 2019b; SCAVUZZI *et al.*, 2019a).

É importante lembrar que a maioria das amostras produtoras de NDM apresentam fenótipo de multirresistência sendo resistentes aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas, devido a associação do gene *bla*_{NDM-1} com outros determinantes de resistência a antimicrobianos tais como: ESBL, AmpC, outras carbapenemases (OXA-48, VIM, KPC), genes de resistência a aminoglicosídeos (16S rRNA metiltransferases, EMAs), macrolídeos (esterases), rifampicina (enzimas modificadoras da rifampicina), quinolonas (Qnr), cloranfenicol e sulfametoxazole (CASTANHEIRA *et al.*, 2011; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; BARGUIGUA *et al.*, 2013; DOLEJSKA *et al.*, 2013; SAMUELSEN *et al.*, 2013; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014; MARTÍNEZ-

MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014, QUILES *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015a; FIRMO *et al.*, 2019b).

Figura 6 - Distribuição de isolados portadores do gene *bla*_{NDM} nos estados brasileiros. *Em Pernambuco foram relatados 5 isolados de *K. pneumoniae*, 2 *P. mirabilis* e 3 *S. marcescens*.



Adaptado de Silva *et al.*, 2019.

b) *VIM* (*Verona metallo-beta-lactamases*)

Antigamente conhecida como MBL européia, devido à prevalência desta enzima nos países do continente europeu (WALSH *et al.*, 2005), a carbapenemase VIM foi detectada pela primeira vez em um isolado de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos em Verona na Itália (LAURETTI *et al.*, 1999). Até o momento, 46 variantes desta enzima foram relatadas em todos continentes, tornando-se uma das mais prevalentes MBLs mediadas por plasmídeos. Embora originalmente identificado em *P. aeruginosa*, as enzimas VIM vem se tornando endêmicas dentro de *Enterobacteriaceae*, principalmente em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Enterobacter* spp. (PERILLI *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; MOHAMMED *et al.*, 2016; BOCANEGRA-IBARIAS *et al.*, 2017; MATSUMURA *et al.*, 2017; PROTONOTARIOU *et al.*, 2018) Essa enzima também foi detectada em *P. mirabilis* e

S. marcescens, porém em raros casos (NASTRO *et al.*, 2013; MATSUMURA *et al.*, 2017; GHAITH *et al.*, 2018; IOVENE *et al.*, 2019).

Estudos mostram que o VIM-1 tem uma distribuição global, já o VIM-2 está presente no México e na Espanha, o VIM-4 na Europa, o VIM-5 e -31 na Turquia, o VIM-19, -26, -27 e -33 foram limitados à Grécia, VIM-23 no México e VIM-29 está presente na Arábia Saudita e no Reino Unido (MATSUMURA *et al.*, 2017; IOVENE *et al.*, 2019). Recentemente, no Brasil o gene *bla*_{VIM-2} foi relatado em isolados de *P. aeruginosa* (SCAVUZZI *et al.*, 2019b).

c) *IMP (Imipenemase)*

A primeira MBL plasmidial reportada foi a IMP-1, identificada em isolados de *P. aeruginosa* em 1988 no Japão (WATANABE *et al.*, 1991). Em 1993 foi identificada em isolados de *S. marcescens* no mesmo país (ITO *et al.*, 1995). Desde então, o gene *bla*_{IMP} propagou-se mundialmente e até a data 50 variantes foram identificadas (MOJICA *et al.*, 2017). Esse gene tem sido detectado principalmente em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e em várias enterobactérias que já foram identificadas em diversos países do mundo causando surtos ou casos esporádicos, a maior prevalência foi encontrada no sudeste da Ásia, Japão e Taiwan (WALSH *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). No Brasil a presença de IMP-1 foi detectada em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes hospitais em São Paulo (LINCOPAN *et al.*, 2005; PENTEADO *et al.*, 2009). Esse gene foi ainda detectado em isolados de *P. rettgeri*, produtores de CTX e SHV (LINCOPAN *et al.*, 2006), em *S. marcescens* produtoras de KPC-2 (SILVA *et al.*, 2015) e em *Acinetobacter* spp. produtora de NDM-1 (BRASILIANSE *et al.*, 2019). Além disso, em Recife foi relatada pela primeira vez a circulação do gene *bla*_{IMP-7} em *P. aeruginosa* (SCAVUZZI *et al.*, 2019b).

2.3.1.2 Carbapenemases classe D

Devido à elevada capacidade de hidrolisar cloxacilina, oxacilina e meticilina, as β -lactamases de classe D também são conhecidas como oxacilinases (OXAs). Essas enzimas caracterizam-se por serem relativamente menos eficazes contra as cefalosporinas de primeira geração e serem pouco inibidas pelos principais inibidores da β -lactamase da classe A, como o ácido clavulânico e tazobactam. Além disso, apresentam baixa atividade hidrolítica contra os

carbapenêmicos e sua atividade in vitro pode ser inibida por concentrações elevadas de NaCl (PATEL; BONOMO, 2013; EVANS; AMYES, 2014).

Mais de 750 tipos de oxacilinases já foram relatados. Essas enzimas são as principais causas de resistência aos carbapenêmicos entre isolados de *A. baumannii* e *Enterobacterales* (PITOUT *et al.*, 2019). Elas são divididas filogeneticamente em dois grupos, o grupo I está presente principalmente em *A. baumannii* e inclui 4 subgrupos (Ia-Id) e o grupo II, que consiste nas variantes relacionadas ao OXA-48 (carbapenemases tipo OXA-48). Dados recentes mostram que 27% das *Enterobacterales* produtoras de carbapenemase foram positivos para carbapenemases do tipo OXA-48 (em comparação com 55% de KPCs e 26% NDMs). Essas carbapenemases são encontradas com mais frequência em certas áreas como no Oriente Médio, norte da África, Bélgica e Espanha (de JONGE *et al.*, 2016; KARLOWSKY *et al.*, 2017; PITOUT *et al.*, 2019).

a) OXA-48

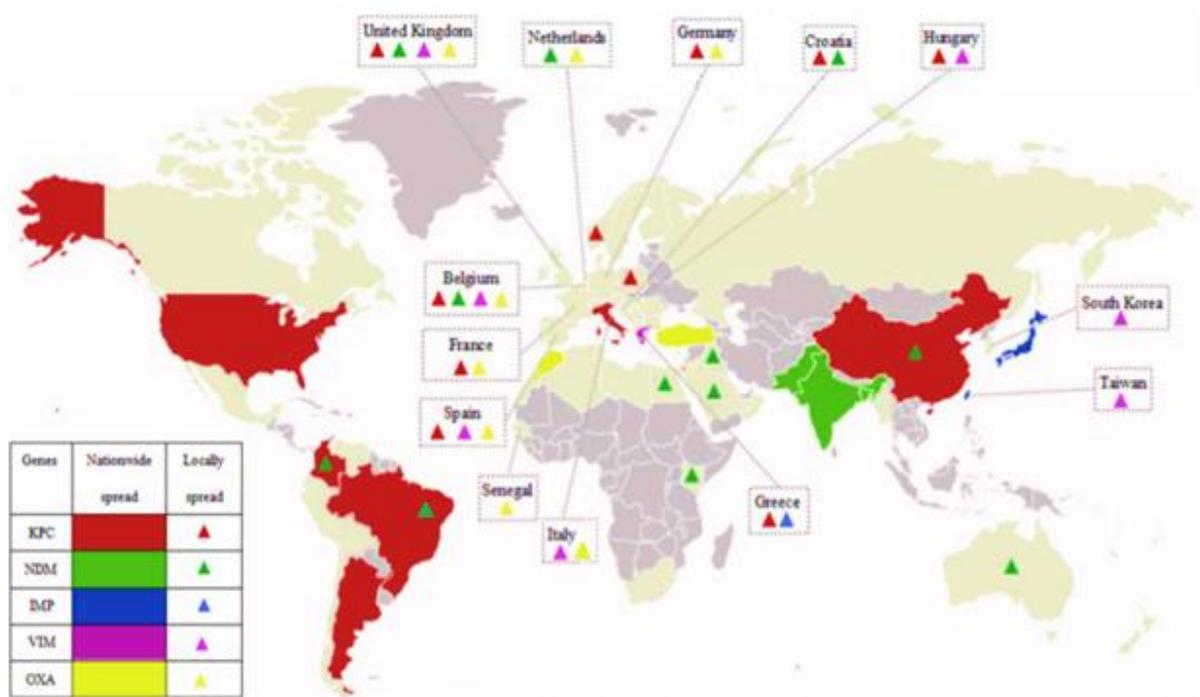
É a enzima mais comum do grupo II, foi relatada pela primeira vez em 2004 a partir de um isolado clínico obtido em Istambul, na Turquia (POIREL *et al.*, 2004a). Atua na hidrólise das penicilinas e apresenta baixo nível de atividade contra os carbapenêmicos, porém é considerada a enzima da classe D com maior atividade catalítica para o imipenem (POIREL *et al.*, 2004a; EVANS; AMYES, 2014).

Até o momento, 20 variantes de OXA-48 foram descritas, as quais diferem pela variação de um pequeno número de aminoácidos. A maioria dessas enzimas são codificadas por genes localizados em plasmídeos (POIREL *et al.*, 2004b). A disseminação mediada por esses plasmídeos gerou um problema crescente no Oriente Médio, Norte da África e Europa, sendo o Marrocos, Tunísia, Egito e Líbia considerados os principais reservatórios (STEWART *et al.*, 2018). Além disso, surtos hospitalares envolvendo enterobactérias produtoras de OXA-48 foram relatados na França, Alemanha, Suíça, Países Baixos e Reino Unido (NORDMANN; POIREL, 2014). Embora quase ausente nas Américas, relatórios revelaram o lento surgimento dessa enzima (LYMAN *et al.*, 2015). No Brasil, há apenas um relato de uma variante da OXA-48 encontrada em isolados de *Enterobacter hormaechei* (SAMPAIO *et al.*, 2014).

Nos últimos anos a enzima OXA-48 foi relatada em diversas espécies da ordem *Enterobacterales*, com alta prevalência entre a *K. pneumoniae* (PFEIFER *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2013; KHAJURIA *et al.*, 2014; KRAIEM *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2016; ALOTAIBI *et al.*, 2017; TADA *et al.*, 2017; ARGENTE *et al.*, 2018; MESSAOUDI *et al.*, 2019). Mas também

foi relatada, com menor frequência, em isolados ambientais de *S. marcescens* provenientes do Marrocos (POTRON *et al.*, 2011) e isolados clínicos de *P. mirabilis* provenientes de Israel e Rússia (CHEN *et al.*, 2015; FURSOVA *et al.*, 2015).

Figura 7 - Disseminação global das principais carbapenemases em enterobactérias.



Adaptado: CUI; ZHANG; DU, 2019.

2.3.2 Resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos atuam no RNA ribossomal bacteriano, induzindo alterações conformacionais que resultam na tradução errônea das proteínas. A resistência a esses antimicrobianos ocorre por meio de vários mecanismos que podem coexistir ao mesmo tempo na célula, por exemplo, diminuição da entrada e permanência do antimicrobiano na célula bacteriana (alterações ou perda de porinas e bombas de efluxo); diminuição da afinidade do antimicrobiano pelo ribossomo bacteriano e inativação do fármaco por enzimas microbianas, através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

O mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos comumente encontrado em enterobactérias é a inativação enzimática, que é mediada por três classes de enzimas, as acetiltransferases (AACs), as nucleotidiltransferases (ANTs) e as fosfotransferases (APHs) (DOI; ARAKAWA, 2007). Outro mecanismo descrito inclui a modificação do sítio alvo do

antimicrobiano, através da metilação da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) (GALIMAND *et al.*, 2005; DOI; ARAKAWA, 2007).

2.3.2.1 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs)

Diferentemente das β -lactamases, as enzimas que conferem resistência aos aminoglicosídeos agem modificando a estrutura do antimicrobiano, antes que este se ligue ao seu alvo, essas enzimas são conhecidas como Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs). Elas catalisam a modificação dos radicais hidroxila ou amina do núcleo 2-deoxistreptamino ou nas moléculas de açúcar desses antimicrobianos, gerando um fármaco quimicamente modificado que se liga fracamente aos ribossomos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; MUNITA; ARIAS, 2016; GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). As EMAs são altamente móveis, seus genes são transferidos em plasmídeos, integrons, transposon. Muitas vezes junto com outros genes de resistência, tais como RMTases ou β -lactamases (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

A presença dessas enzimas em bactérias gram-positivas e gram-negativas elevam os valores das CIMs em mais de 10 vezes, principalmente para a gentamicina (DURANTE-MAGONI *et al.*, 2009). As três classes de EMAs são: acetiltransferases (AAC) que promovem acetilação, usando Acetil Coenzima A como doador, nucleotidiltransferases (ANT) que promovem a transferência de um AMP proveniente do ATP para a molécula do aminoglicosídeo e as fosfotransferases (APH) que catalisam a transferência de um grupo fosfato para a molécula de aminoglicosídeo (DOI *et al.*, 2007). Os antimicrobianos ao serem modificados por essas enzimas passam a apresentar baixa afinidade ao ribossomo bacteriano, ocasionando dessa forma a resistência a estes fármacos (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

Estas enzimas modificadoras são ainda subdivididas em subclasses, baseado na posição onde provocam as alterações na molécula do aminoglicosídeo e no fenótipo conferido pela mesma (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). Por este motivo, são usados diferentes sistemas de nomenclatura para essas enzimas. O primeiro deles refere-se à ação enzimática e consiste em três letras (AAC, ANT, APH), em seguida um número entre parênteses identifica o local onde houve a modificação e, logo após, um numeral romano designa a subclasse, por exemplo, APH(3'')-Ib (DOI *et al.*, 2007; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Mais de 100 EMAs já foram relatadas e as da família AAC(6') são mais frequentes em bactérias gram-negativas e podem ser subdivididas em dois grupos, AAC(6')-I e AAC(6')-II, que são diferenciados pelo perfil dos aminoglicosídeos inativados. Os genes que as codificam já foram descritos em plasmídeos, transposons e integrons, e estão disseminados entre diversas espécies (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; RAMIREZ; NIKOLAIDIS; TOLMASKY, 2013).

A enzima AAC(6')-Ib é provavelmente a acetiltransferase clinicamente mais relevante, visto que tem sido descrita em aproximadamente 70% dos gram-negativos de origem clínica (MIRÓ *et al.*, 2013; MARTINEZ *et al.*, 2015, RIZI *et al.*, 2015). Ela é responsável pela resistência à amicacina e a outros aminoglicosídeos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). O gene *aac(6')-Ib* já foi descrito em várias espécies da ordem *Enterobacterales*, como *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *S. marcescens*. principalmente associado a outros genes de resistência, como *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, por exemplo (ZHU *et al.*, 2016, ALABI *et al.*, 2017, FERNÁNDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2018, AL-AGAMY *et al.*, 2019, CIRIT *et al.*, 2019, FIRMO *et al.*, 2019b, SCAVUZZI *et al.*, 2019a).

As enzimas AAC(3) constituem o segundo grupo mais comum de acetiltransferases e nove subclasses são reconhecidas. A subclasse AAC(3)-I inclui cinco enzimas que conferem resistência a gentamicina, sisomicina e fortimicina, e estão presentes em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* e outros gram-negativos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). A subclasse AAC(3)-II, é caracterizada por conferir resistência a gentamicina, netilmicina, tobramicina, sisomicina e dibekacina (SHAW *et al.*, 1993), e inclui três enzimas: AAC(3)-IIa, AAC(3)-IIb, e AAC(3)-IIc., encontradas em uma grande variedade de espécies (BECKER; COOPER, 2013, MIRÓ *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2015, MARTINEZ, *et al.*, 2015, MIR *et al.*, 2016, FERNÁNDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2018, CIRIT *et al.*, 2019), inclusive já foi descrita no Brasil na espécie de *K. pneumoniae* portadoras de genes *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}* (PEREIRA *et al.*, 2015a; PEREIRA *et al.*, 2015b; FIRMO *et al.*, 2019b).

A maior classe, em número de enzimas entre as APHs, é a das fosfotransferases 3' [APH(3')], que modificam os grupos hidroxila dos aminoglicosídeos na posição 3. Nesta família, a subclasse mais prevalente em gram-negativos é a das enzimas APH(3')-I, que conferem resistência a canamicina, neomicina, paramomicina, ribostamicina e lividomicina. Outra importante subclasse destas enzimas é APH(3')-VI, codificadas pelo gene *aph(3')-VI* que confere resistência à amicacina, isepamicina, canamicina, neomicina, entre outros (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003; BECKER; COOPER, 2013). Essa enzima foi relatada pela primeira vez em *A. baumannii* (LAMBERT *et al.*, 1988), porém, atualmente encontra-se

disseminada em vários membros da ordem *Enterobacterales* e em *P. aeruginosa* (VAZIRI *et al.*, 2011; COSTELO *et al.*, 2019; FIRMO *et al.*, 2019b).

As nucleotidiltransferases (ANT) compreendem cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6), ANT(9) (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). Apesar de ser a menor família de EMAs em número, possuem significativa importância clínica, pois ANT(2'') confere resistência à amicacina, tobramicina e gentamicina, que são os aminoglicosídeos mais frequentemente prescritos (AVENT *et al.*, 2011). O gene *ant(2'')-Ia* é amplamente distribuído, sendo localizado em plasmídeos e transposons encontrados tanto em *Enterobacterales* quanto em bacilos gram-negativos não-fermentadores (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010, MIRÓ *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2015, COSTELO *et al.*, 2019). Em 2015, Martinez *et al.* encontraram em isolados de *E. coli* o gene *ant(2'')-Ia* associado ao gene *bla_{OXA-1}* e recentemente foi encontrado, no Recife, em isolados de *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *P. mirabilis* portadores do gene *bla_{KPC-2}* e *bla_{NDM-1}* (FIRMO *et al.*, 2019b).

Tabela 2 - Fenótipo de resistência esperado de acordo com a produção das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs).

Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos		AMI	GEN	TOB	SIS	DBK	NTL	NEO	STM
Fosfotransferases (APHs)	APH(3')-Ia	S	R	S	S	S	S	R	S
	APH(3')-VIa	R	S	S	S	S	S	R	S
Acetiltransferases (AACs)	AAC(3)-Ia	S	R	S	R	S	S	S	S
	AAC(3)-IIa	S	R	R	R	R	R	S	S
	AAC(6')-Ib	R	S	R	R	R	R	S	S
Nucleotidiltransferases (ANTs)	ANT(2'')-Ia	S	R	R	R	R	S	S	S
	ANT(3'')-Ia	S	S	S	S	S	S	S	R

AMI: amicacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, SIS: sisomicina, DBK: dibecacina, NTL: netilmicina, NEO: neomicina, STM: streptomicina. R- Resistente; S- Sensível. Adaptado de Shaw *et al.*, 1993.

Apesar da maior prevalência das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em bactérias gram-negativas, nos últimos anos a emergência de outra classe de enzimas, que conferem resistência mediada pela metilação sítio específica do RNA ribossômico 16S, vem chamando atenção nesses microrganismos, as metilases 16S rRNA (YOKOYAMA *et al.*, 2003).

2.3.2.2 Metilases 16S rRNA

A metilação do RNA tem sido apontada como um mecanismo que fornece altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos. Esses antimicrobianos são naturalmente produzidos por Actinomicetos que são intrinsicamente resistentes a essa classe devido à proteção ribossomal obtida através de metilação específica em sítios da subunidade 16S do RNA (DOI; ARAKAWA, 2007). Acreditava-se que este mecanismo de resistência estava restrito a esses microrganismos produtores, porém em 2002, o primeiro gene responsável por codificar uma metilase foi descrito em uma *Citrobacter freundii* na Polônia e designado de *armA* (Aminoglycosides Resistance Methylase). Foi observado que as metilases encontradas inicialmente em Actinomicetos são estruturalmente diferentes das encontradas atualmente nas amostras clínicas (DOI; ARAKAWA, 2007).

Em 2003, na França (GALIMAND *et al.*, 2003) e no Japão (YOKOYAMA *et al.*, 2003), foram relatados outros casos de isolados de espécies clínicas relevantes (*K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) produtoras de 16S rRNA metilases. Foi visto que, essas metilases adicionavam grupamentos químicos (grupos metil) ao ribossomo bacteriano, mostrando-se capazes de conferir um nível elevado de resistência aos aminoglicosídeos utilizados clinicamente, como amicacina, tobramicina e gentamicina (DOI; ARAKAWA, 2007; WACHINO; ARAKAWA, 2012).

Dez classes de 16S rRNA metilases já foram descritas, ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH e NpmA, como observado na figura 8 (DOI *et al.*, 2016). Os tipos ArmA, Rmt (ribosomal methyltransferase) conferem alto nível de resistência aos aminoglicosídeos 4,6-desoxiestreptamina dissubstituído (DOS), incluindo gentamicina, tobramicina e amicacina, e tem disseminação global (DOI *et al.*, 2007; DOI e ARAKAWA, 2007; WACHINO e ARAKAWA, 2012; BUENO *et al.*, 2013; O'HARA *et al.*, 2013). Enquanto que a classe NpmA confere alto nível de resistência tanto aos aminoglicosídeos 4,6-desoxiestreptamina dissubstituído (DOS) quanto aos aminoglicosídeos 4,5-DOS, tais como, neomicina e estreptomicina e foi encontrado somente no Japão (WACHINO *et al.*, 2007).

Os genes *armA* e *rmtB* parecem ser os genes codificadores de metilases mais comumente encontrados em *Enterobacterales* e em *A. baumannii* (LIANG *et al.*, 2015; AYAD *et al.*, 2016; DOI *et al.*, 2016). Em *Enterobacterales*, o gene *armA* tem sido encontrado principalmente em espécies, como *K pneumoniae*, envolvidas em IRAs, mas também há relatos de espécies envolvidas em doenças alimentares e diarréicas, incluindo *Salmonella enterica* e *Shigella flexneri* (GALIMAND *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2012).

Recentemente foi observado que enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo NDM também apresentavam resistência aos aminoglicosídeos gentamicina e tobramicina, isso foi explicado pela alta prevalência do gene *armA* nesses isolados (DOI *et al.*, 2016). Investigações nos plasmídeos dos portadores do gene *bla_{NDM}* revelaram a presença do gene *armA*, e de outros da família da 16S-RMTases, como os genes *rmtB*, *rmtC* e *rmtF*, sendo carreados no mesmo plasmídeo (RAHMAN *et al.*, 2014). O gene *armA* também foi encontrado em enterobactérias, portadoras do gene *bla_{KPC-2}* e de outros determinantes de resistência, na Algeria, Polônia, Itália, China e no Brasil (ZACHARCZUK *et al.*, 2011; MEZZATESTA *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014, QUILES *et al.*, 2015, LEULMI *et al.*, 2018)

A enzima RmtA foi primeiramente identificada no Japão, em um isolado clínico de *P.aeruginosa* resistente a aminoglicosídeos. Esta nova enzima mostrava uma semelhança de 35% com metilases 16S RNAr de vários actinomicetos, sugerindo que esses genes são adquiridos horizontalmente de microrganismos não patogênicos (DOI, 2016). Quando comparada com ArmA, a ocorrência de RmtA tem sido esporádica, com poucos relatos vindos principalmente do Japão, da Coreia e da Índia (YAMANE *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2009, POIREL *et al.*, 2011c, WANGKHEIMAYUM *et al.*, 2017).

A enzima RmtB foi relatada pela primeira vez a partir de uma estirpe clínica de *Serratia marcescens* que foi isolada no Japão em 2002 (DOI *et al.*, 2004). Essa enzima encontra-se distribuída mundialmente, com relatos na Ásia, Américas, Europa, Oriente Médio, África e Oceania, principalmente em bactérias da ordem *Enterobacterales* (BOGAERTS *et al.*, 2007; FRITSCHÉ *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2011; WACHINO, ARAKAWA, 2012; AL-GALLAS *et al.*, 2013; AL SHEIKH *et al.*, 2014; SIDJABAT *et al.*, 2015, ZHU *et al.*, 2016, LEE *et al.*, 2018). No Brasil foi encontrada nas espécies *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* (CASSU-CORSI *et al.*, 2018). Assim como o gene *armA*, *rmtB* é frequentemente associado ao gene *bla_{NDM-1}* no mesmo plasmídeos (CARATOLLI *et al.*, 2012) e também já foi descrito em isolados portadores do gene *bla_{KPC-2}* (GALANI *et al.*, 2012; SHENG *et al.*, 2012, YAO *et al.*, 2017).

A RmtC foi inicialmente relatada em uma estirpe clínica de *P. mirabilis* que foi isolada no Japão em 2003 (WACHINO *et al.*, 2006). Depois foi reportado da Austrália um segundo isolado de *P. mirabilis* produtor de RmtC, que havia sido isolado da urina de um paciente que tinha retornado recentemente da Índia (ZONG *et al.*, 2008) e em seguida foi relatado em *S. enterica* no Reino Unido, de pacientes com relatos de viagens também a Índia (HOPKINS *et al.*, 2010). Assim como outras RMTases, o gene codificante da RmtC já foi encontrado coexistindo no mesmo ambiente genético do *bla_{NDM-1}*, tendo sido relatados em *E. coli* provenientes do Reino Unido, Índia e Paquistão (MUSHTAQ *et al.*, 2011), em isolados de enterobactérias na Nova Zelândia (WILLIAMSON *et al.*, 2012), e Índia (HIDALGO *et al.*, 2013) e em *K. pneumoniae* no Nepal (TADA *et al.*, 2013), na Turquia (GOKMEN *et al.*, 2016) e no Irã (KIAEI *et al.*, 2018, YEGANEH SEFIDAN *et al.*, 2019).

O primeiro relato da enzima RmtD foi no Brasil, onde o gene *rmtD* (agora também denominada *rmtD1* por causa da identificação de sua variante *rmtD2*) foi associado a um clone produtor de uma metalo beta-lactamase (SPM-1) em *P. aeruginosa* (DOI *et al.*, 2007). Desde então as RmtD1 e RmtD2 foram encontradas distribuídas em várias espécies de enterobactérias no Brasil, Argentina, Chile (TIJET *et al.*, 2011; FRITSCHÉ *et al.*, 2008; YAMANE *et al.*, 2008a, BUENO *et al.*, 2016; GRAZZIOTIN *et al.*, 2016) e recentemente foi relatada em *E. coli* proveniente da Índia (WANGKHEIMAYUM *et al.*, 2017). Em 2013, foi relatado no Brasil um isolado de *K. pneumoniae* portador dos genes *bla_{KPC}* e *rmtD* (BUENO *et al.*, 2013). Ao contrário de *Enterobacteriaceae* produtoras de NDM-1, *rmtD1* ou *rmtD2* e *bla_{KPC}* estão localizados em plasmídeos separados (DOI *et al.*, 2016).

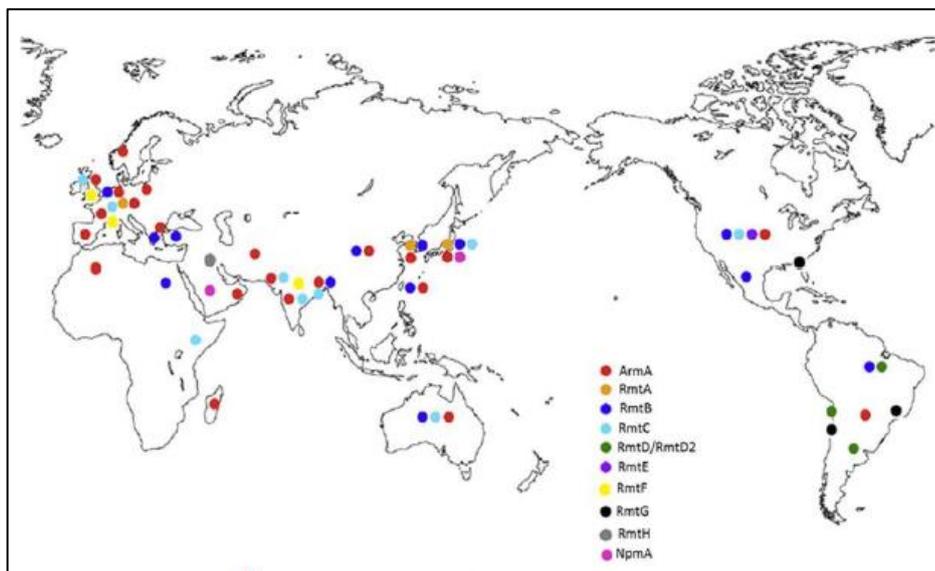
A enzima RmtE foi notificada até o momento em apenas dois isolados de *E. coli* provenientes de bovinos nos Estados Unidos (DAVIS *et al.*, 2010), enquanto a RmtF tem sido descrita em enterobactérias no Nepal, Austrália, Minnesota e Suíça (SIDJABAT *et al.*, 2015; TADA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014, MANCINI *et al.*, 2017) e em isolados produtores de NDM (GALIMAND *et al.*, 2012; HIDALGO *et al.*, 2013; MATASEJE *et al.*, 2014). A metilase RmtH foi identificada em um isolado de *K. pneumoniae* produtor de ESBL proveniente de um soldado dos Estados Unidos que sofreu infecção devido a um ferimento de guerra (O'HARA *et al.*, 2013). Já a metilase NpmA foi descrita a partir de uma *E. coli* isolada de um paciente no Japão (WACHINO *et al.*, 2007).

Por fim, a metilase RmtG foi inicialmente identificada no Brasil em um isolado de *K. pneumoniae* produtor de KPC (BUENO *et al.*, 2013). Também foi encontrada em outro isolado de *K. pneumoniae* produtor de KPC-2 e CTX-M-15, proveniente de uma cultura de ponta de cateter (CERDEIRA *et al.*, 2016) e em um isolado de *Klebsiella aerogenes* proveniente de um

lavado broncoalveolar (PASSARELLI-ARAUJO *et al.*, 2019). Além disso, já foi descrita no Chile e em Miami em *K. pneumoniae* (POIREL *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2014) e recentemente foi relatada pela primeira vez na Europa (MANCINI *et al.*, 2018).

Grande parte destes genes está associada com elementos genéticos móveis, como integrons e transposons inseridos em plasmídeos, denotando a sua capacidade de disseminação horizontal intra e inter espécies (DOI; ARAKAWA, 2007; DOI *et al.*, 2007; WACHINO; ARAKAWA, 2012).

Figura 8 - Distribuição mundial das metiltransferases 16S rRNA.



Adaptada de Wachino; Arakawa, 2012.

2.3.3 Resistência às Polimixinas

A ação das polimixinas depende de sua interação com as moléculas do LPS da membrana externa das gram-negativas. Sua carga positiva promove o deslocamento de cátions divalentes na porção negativa do LPS o que gera uma desestabilização da membrana e consequentemente a formação de poros que aumentam a permeabilidade, provocando a lise celular. Apesar dessa ação rápida, os microrganismos são capazes de se adaptar facilmente à presença das polimixinas, desenvolvendo resistência (NODARI; BARTH, 2016). O principal mecanismo envolvido nesse processo é a alteração da carga dos lipídeos de membrana, através da modificação dos substituintes do LPS, seja por via intrínseca, adaptativa ou mutacional (TRIMBLE *et al.*, 2016).

A resistência intrínseca ou natural pode ser observada em várias gram-negativas como: *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella*, *Serratia* spp., *Edwardsiella* spp., *Legionella* spp., *Burkholderia cepacia* complex, *Campylobacter* spp. e *Vibrio cholerae*. (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; TRIMBLE *et al*, 2016; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Em *P. mirabilis* e *S. marcescens* a resistência às polimixinas está ligada à expressão constitutiva do operon *arnBCADTEF* e/ou do gene *eptB*, causando a adição de fosfoetanolamina (pEtN) e/ou 4-amino-4-desoxil- L-arabinose (L-Ara4N) ao LPS. Essa modificação aumenta a carga do LPS, que é o alvo inicial das polimixinas e, portanto, diminui a ligação à polimixina, dando origem a resistência intrínseca nessas espécies (AQUILINI *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

A resistência adquirida às polimixinas foi identificada em vários gêneros da ordem *Enterobacterales*, como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Salmonella*. Assim como nas bactérias com resistência intrínseca às polimixinas, a modificação do LPS por substituição catiônica é o mecanismo mais comum entre essas bactérias. Na espécie *K. pneumoniae*, a literatura relata, que a regulação gênica do desenvolvimento de resistência às polimixinas, envolve mutações no gene *mgrB*, o qual regula os sistemas (*PhoP/Q* e *PmrA/B*) (BARON *et al.*, 2016). Esses componentes são diretamente influenciados por fatores ambientais como presença de ferro, concentrações elevadas de cálcio, ferro e alumínio ou baixas de magnésio, e alterações do pH. O somatório dessas modificações reduzem a carga negativa da membrana externa, que resulta na diminuição da afinidade da polimixina com a superfície das células bacterianas (GIRARDELO; GALES, 2012; TRIMBLE *et al*, 2016; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019).

No mecanismo adaptativo, a bactéria que antes era sensível, se torna resistente durante o uso da polimixina em concentrações subinibitórias, devido aos fenômenos de heterorresistência e resistência adaptativa. Entretanto, a resistência nesse caso pode ser reversível na ausência da pressão seletiva estabelecida pelo antimicrobiano (GIRARDELO; GALES, 2012). Além disso, outros mecanismos podem ser encontrados, como sistemas de bombas de efluxo, espessamento da cápsula polissacarídica, modificações nas concentrações de proteínas específicas da membrana externa e a presença do gene *mcr*. (MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019).

2.3.3.1 Gene *mcr* (*mobile colistin resistance*)

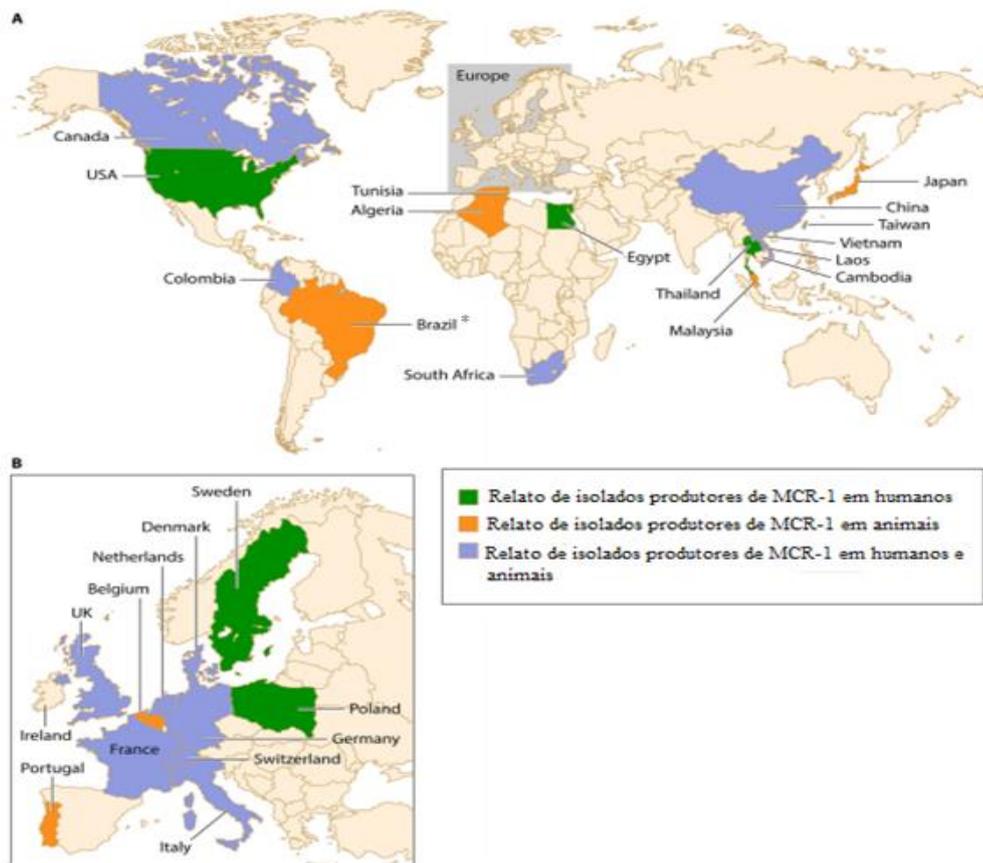
Até pouco tempo, acreditava-se que a resistência às polimixinas eram estritamente ligadas a mutações cromossômicas, porém, em 2015 foi descrita pela primeira vez a resistência a esses antimicrobianos mediada por um gene de localização plasmidial. O gene denominado *mcr-1* (*mobile colistin resistance*) foi inicialmente relatado em *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de animais e pacientes de UTI na China. Esse gene codifica uma fosfoetanolamina transferase que transfere pEtN e modifica os grupos fosfato do lipídeo A no LPS, o que leva a aumentos de 4 a 8 vezes as CIM das polimixinas (LIU *et al.*, 2016).

Após as descobertas iniciais, o gene *mcr-1* foi relatado em mais de 30 países (Figura 9), com maior incidência na China, Vietnã e Alemanha (WANG *et al.*, 2018). Até o momento (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> – 14 de dezembro de 2019) são conhecidas 10 variantes do *mcr*: *mcr-1*, *mcr-2* (XAVIER *et al.*, 2016), *mcr-3* (YIN *et al.*, 2017), *mcr-4* (CARATTOLI *et al.*, 2017), *mcr-5* (BOROWIAK *et al.*, 2017), *mcr-6* (ABUOUN *et al.*, 2017), *mcr-7* (YANG *et al.*, 2018), *mcr-8* (WANG, X. *et al.*, 2018), *mcr-9* e *mcr-10*. Além dessas, pelo menos 13 variações do gene *mcr-1* foram encontradas em diversos países, como por exemplo: *mcr-1.2* descrita em *K. pneumoniae* na Itália (DI PILATO *et al.*, 2016), *mcr-1.3* e *1.4* encontrados em *E. coli* na China (YANG, Y *et al.*, 2017), *mcr-1.13* relatado em *E. coli* na Itália (ALBA *et al.*, 2018), entre outros.

Como descrito acima, a grande maioria dos isolados *mcr-1* positivos pertence a *E. coli*, mas também inclui isolados de outras espécies bacterianas, como: *Raoultella ornithinolytica*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia fergusonii*, *Kluyvera ascorbata*, *Citrobacter braakii*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella aerogenes*, isolados de alimentos, animais, humanos e meio ambiente (ARCILLA *et al.*, 2016, HU *et al.*, 2016; OLAITAN *et al.*, 2016; TSE; YUEN *et al.*, 2016; WEBB *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018; WANG X *et al.*, 2019).

A alta incidência do gene *mcr-1* na pecuária e na avicultura está ligada ao uso indiscriminado das polimixinas na medicina veterinária, não apenas no tratamento, mas também na profilaxia de infecções causadas por enterobactérias, além disso esse antimicrobiano é disponibilizado na água e alimento desses animais (CATRY *et al.*, 2015). Outros dados revelam que esse gene também é altamente prevalente no meio ambiente, principalmente em rios e mares (ZURFUH *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017; DRALI *et al.*, 2018).

Figura 9 - Relatórios de isolados produtores de MCR-1 no mundo. *No Brasil já foram relatados casos de portadores do gene *mcr-1* em isolados clínicos.



Adaptado de Poirel; Jayol; Nordmann, 2017.

O primeiro relato do gene *mcr-1*, no Brasil, foi em isolados de *E. coli* provenientes de animais (frangos e suínos) dos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 2016a). Em isolados clínicos, o primeiro caso de *E. coli* apresentando esse gene ocorreu no Rio Grande do Norte (FERNANDES *et al.*, 2016b). Desde então, diversos relatos foram publicados, principalmente em seres humanos, nos estados de Pernambuco (ROCHA *et al.*, 2017), Espírito Santo (AIRES *et al.*, 2017b; TONINI *et al.*, 2018), Rio de Janeiro (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2017), São Paulo (OLIVEIRA *et al.*, 2018), Paraná (PILONETTO *et al.*, 2019) e Rio Grande do Sul (DALMOLIN *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2018; LORENZONI *et al.*, 2018).

A coexistência de diferentes genes de resistência a diferentes classes de antibióticos, tem sido relatada em diversas espécies bacterianas. A presença do gene *mcr-1* tem sido associado, principalmente, às carbapenemases (DI PILATO *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2016; AIRES *et al.*, 2017; BULMAN *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; WANG,

R. *et al.*, 2018). O que é bastante preocupante, visto que as polimixinas são as últimas opções de escolha para o tratamento de infecções causadas por produtores de carbapenemases.

2.4 Opções de tratamento para infecções causadas por Enterobacterales multidroga-resistentes

A crescente prevalência de resistência bacteriana aos antibióticos é um problema crítico de saúde pública, principalmente devido a significativa morbimortalidade causada pelas IRAs. Estima-se que 700 mil mortes sejam causadas por ano, devido à resistência aos antimicrobianos e que até 2050 ela poderá causar mais mortes que o câncer (WHO, 2014).

Até o momento, as opções de tratamento para infecções causadas por enterobactérias multidroga-resistentes permanecem muito limitadas. As polimixinas e a tigeciclina tem sido consideradas como drogas de escolha para essas infecções, entretanto, a resistência a esses antimicrobianos vem aumentando (SHEU *et al.*, 2019). Além desses antimicrobianos, aminoglicosídeos e fosfomicina também são utilizados, de acordo com o quadro do paciente (RODRIGUEZ-BANO *et al.*, 2018). E também os próprios carbapenêmicos que ainda desempenham um papel no tratamento dessas infecções, principalmente quando utilizados em isolados com CIMs mais baixas ou em combinação com outros antimicrobianos (EL-GAMAL *et al.*, 2017).

Recentemente, novas combinações de inibidores de β -lactamase forneceram novas opções terapêuticas para infecções causadas por produtores de carbapenemases. Entretanto, esses novos inibidores da β -lactamase não são ativos contra todas as carbapenemases, principalmente as MBLs. O avibactam inibe tanto a Classe A, KPC, quanto a Classe D, OXA-48 (van DUIN; BONOMO, 2016), enquanto o vaborbactam e o relebactam inibem apenas a Classe A, KPC (PETTY *et al.*, 2018; ZHANEL *et al.*, 2018). Apesar de existirem outros medicamentos em diferentes estágios de desenvolvimento, como a plazomicina, cefiderocol e eravaciclina, sua eficácia clínica ainda não está totalmente elucidada (RODRIGUEZ-BANO *et al.*, 2018; NORDMANN; POIREL, 2019). Por isso, é de extrema importância a busca por combinações de antimicrobianos eficientes capazes de atuar contra essas bactérias, principalmente as produtoras de NDM, visto que, essa enzima tem se tornado cada vez mais comum entre os hospitais brasileiros.

2.4.1 Terapia combinada

Diante das opções de tratamento cada vez menores, ressurgem as polimixinas, que mantêm uma atividade significativa contra patógenos produtores de carbapenemases, como a KPC e a NDM. Em contrapartida, estudos recentes demonstram o crescimento da resistência a polimixina B e a crescente incidência de espécies intrinsecamente resistente a esse antimicrobiano (DIEP *et al*, 2018; FIRMO, 2019). Além disso, o uso da polimixina B em monoterapia tem sido associado a maiores taxas de falha no tratamento em comparação a terapias combinadas (PEREZ *et al.*, 2019). Nesse cenário, a terapia combinada tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana e reduzir o surgimento de resistência (RAHIM *et al* 2015; BULMAN *et al* 2017; HAGIYA *et al*, 2018; KULENGOWSKI *et al*, 2018).

A justificativa para o uso da terapia combinada contra bactérias gram-negativas MDR baseia-se na hipótese de que polimixinas e um segundo antibiótico interajam sinergicamente para aumentar a morte bacteriana e produzir um efeito combinado maior que a soma de seus efeitos separados ou, inversamente, que o mesmo efeito de morte possa ser alcançado usando doses mais baixas de antibióticos (FRITZENWANKER *et al.*, 2018; PEREZ *et al.*, 2019). Além disso, foi sugerido que combinações com polimixina podem dar origem à chamada sinergia de subpopulações, onde um antimicrobiano mata as subpopulações resistentes do outro e vice-versa (BERGEN *et al.*, 2019). Outra justificativa seria que as combinações de antibióticos afetam diversos alvos moleculares e processos nas bactérias, o que pode atrasar ou impedir o desenvolvimento de resistência, o que é especialmente relevante, pois a monoterapia com polimixinas quase sempre resulta no crescimento das bactérias e no desenvolvimento da resistência durante a terapia (PEREZ *et al.*, 2019). Diante disso, pode-se afirmar que a redução da terapia empírica inadequada, os potenciais efeitos sinérgicos e a redução da emergência da resistência bacteriana estão entre os principais benefícios da terapia combinada (BERGEN *et al.*, 2019).

Alguns estudos vêm comprovando os benefícios da terapia combinada quando comparada a monoterapia. Tzouvelekis *et al.* avaliaram 889 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, a terapia de combinação com dois ou mais agentes ativos *in vitro* foi associada com menor mortalidade quando comparado ao tratamento com um único agente antimicrobiano ativo *in vitro*, 27% e 38%, respectivamente (TZOUVELEKIS *et al.*, 2014). Outros estudos observacionais com foco no tratamento de

infecções da corrente sanguínea causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos também apontam para uma vantagem de sobrevivência de pacientes que fizeram o uso da combinação em relação àqueles que utilizaram apenas a monoterapia (ZARKOTOU *et al.*, 2011; QURESHI *et al.*, 2012; TUMBARELLO *et al.*, 2012; DAIKOS *et al.*, 2014; PEREZ *et al.*, 2016). Em contrapartida, Zusman *et al.* (2017) após realizarem uma revisão sistemática e metanálise para examinar a eficácia da combinação baseada em polimixina versus monoterapia, alertaram que a associação, em estudos observacionais, entre polimixina em monoterapia e mortalidade não podem ser tomadas como prova da superioridade da terapia combinada, devido à baixa qualidade geral das evidências.

Os carbapenêmicos, paradoxalmente, apesar de serem hidrolisados pelas carbapenemases, aumentam a sobrevida dos pacientes quando usados em terapia combinada. Estudos na Grécia mostraram que combinações incluindo meropenem no tratamento de pacientes, com infecção por patógenos produtores de carbapenemases, tiveram a menor taxa de mortalidade quando a CIM do meropenem foi ≤ 8 mg/L (DAIKOS, 2014), o que também foi observado por Tumbarello *et al.* (2012) na Itália. Esses achados foram corroborados por estudos de coorte, porém foi observado o sucesso clínico das combinações com meropenem também em isolados que apresentaram uma CIM de até 16 mg/L para esse antimicrobiano (TUMBARELLO *et al.*, 2015; GIANNELLA *et al.*, 2018).

Toledo *et al.* (2015) conduziram um estudo com o objetivo de determinar eficácia de meropenem, tigeciclina e polimixina B num modelo de infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC. O ensaio *in vivo* e *in vitro* demonstrou que regimes combinados, exceto meropenem com tigeciclina, foram mais eficazes que a monoterapia para as cepas testadas. Em outros estudos, as combinações com colistina, polimixina B ou tigeciclina com carbapenêmico ou carbapenêmico com aminoglicosídeo foram analisadas. Os esquemas contendo carbapenêmico foram associados com melhor desfecho, sugerindo um efeito residual mesmo quando resistente (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; QURESHI *et al.*, 2012).

Uma revisão de casos publicados sobre o tratamento de infecções causadas por enterobactérias produtoras de KPC, também demonstrou que as polimixinas em terapia combinada obtêm menores taxas de falha no tratamento quando comparadas com a monoterapia. Neste estudo foi observado que 71% dos casos tratados com combinação à base de polimixina (tigeciclina+ colistina, carbapenêmicos + polimixina B e aminoglicosídeos + polimixina B) obtiveram sucesso. Em concordância a esses resultados, os casos tratados com carbapenêmicos em monoterapia obtiveram menor taxa de sucesso terapêutico quando comparados à terapia combinada (26% versus 60%), dos casos tratados com combinação à base

de carbapenêmicos, 74% obtiveram sucesso e os regimes mais utilizados foram: polimixina B + carbapenêmicos, aminoglicosídeos + carbapenêmicos e beta-lactâmicos com inibidor de beta-lactamase + carbapenêmicos (LEE; BURGESS, 2013).

Os aminoglicosídeos têm sido tradicionalmente usados como parte de esquemas de combinação e somente em infecções do trato urinário eles têm sido usados como monoterapia (KARAIKOS *et al.*, 2019). Em combinação, esses antimicrobianos parecem permeabilizar a membrana externa da bactéria (que pode ser explicado pela inibição da síntese proteica, onde proteínas anômalas são produzidas e a permeabilidade celular bacteriana é alterada), favorecendo a penetração no local de destino do antimicrobiano usado em associação, levando a morte bacteriana sinérgica. Além disso, estudos sugerem que o aminoglicosídeo contribui para a diminuição da expressão das β -lactamases (DRUSANO *et al.*, 2012).

Estudos clínicos e observacionais, incluindo grandes coortes de pacientes com infecções por *K. pneumoniae* produtoras de KPC, mostraram que a combinação de um carbapenêmico com um aminoglicosídeo estava associada à menor taxa de mortalidade (DAIKOS *et al.*, 2014; TZOUVELEKIS *et al.*, 2014; TUMBARELLO *et al.*, 2015).

Apesar desses achados importantes, na literatura ainda é escasso estudos *in vitro* envolvendo espécies intrinsecamente resistentes as polimixinas, como *P. mirabilis* e *S. marcescens*. Barth *et al.* (2015) encontraram sinergia e atividade bactericida quando a polimixina B foi combinada com meropenem e a tigeciclina contra dois isolados de *S. marcescens* resistentes aos carbapenêmicos. Entretanto, Betts *et al.* (2014) não encontraram nenhum efeito sinérgico da combinação de tigeciclina mais colistina contra *S. marcescens*. Por serem extremamente difíceis de tratar e por estarem em constante ascensão no meio hospitalar, se faz necessário a busca por combinações de antimicrobianos capazes de debelar infecções causadas por essas bactérias.

2.5 Alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas por antimicrobianos

Antes se acreditava que não existiam diferenças morfológicas entre cepas bacterianas resistentes e sensíveis aos antimicrobianos. No entanto, estudos com estafilococos demonstraram que cepas resistentes são morfológicamente distintas quando comparadas a cepas sensíveis (HYO *et al.*, 2008; FUKUTSUJI *et al.*, 2013). Atualmente, a microscopia eletrônica de transmissão e de varredura representam ferramentas importantes para avaliar a ultraestrutura e a morfologia, respectivamente, das bactérias e podem ser usadas para elucidar alvos celulares envolvidos nas interações bactéria e antimicrobianos (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

As alterações morfológicas e ultraestruturais que ocorrem quando as células bacterianas são tratadas com um agente antimicrobiano dependem não só da classe do agente antibacteriano, mas também da concentração utilizada e da duração da exposição. Além disso, condições de incubação e fatores relacionados ao organismo, como espécie, parede celular, suscetibilidade aos antimicrobianos e a densidade do inóculo, também podem influenciar os resultados (CUSHNIE *et al.*, 2016). Dentre as principais alterações morfológicas e ultraestruturais estão formação de esferoplastos e vacúolos, alongamento e enrugamento celular, perda de ribossomos, entre outros (CUSHNIE *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Rajeshwari *et al.* (2009), a formação de filamentos bacterianos em isolados de *K. pneumoniae* resistentes, devido a submissão a cefotaxima, foi considerada estressante por promover alongamento e deformação das células bacterianas. Este evento foi atribuído à provável inibição da síntese de mucopeptídeo, devido fixação e inibição de PBPs pelo antimicrobiano, o que poderia diminuir a estabilidade da parede celular bacteriana, predispondo as células à lise (RAJESHWARI *et al.*, 2009).

Veras *et al.* (2015) descreveram alterações ultraestruturais e morfológicas de isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota e IRAS, portadores dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX} ou *bla*_{KPC}, quando submetidos *in vitro* à concentração de antimicrobianos β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, imipenem, ampicilina e amoxicilina). Os isolados demonstraram diferentes alterações morfológicas e ultraestruturais, tais como filamentação celular, perda de material citoplasmático e deformação dos septos de divisão. Os resultados revelaram também que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes genes codificantes para β -lactamases, apresentam alterações celulares quando submetidos a diferentes antimicrobianos β -lactâmicos sugerindo que estes possuem uma ação residual *in vitro* nos isolados analisados, suportando a ideia de que isolados de *K. pneumoniae* MDR não são capazes de evitar completamente a interação entre os antimicrobianos β -lactâmicos com seu alvo (VERAS *et al.*, 2015).

Adicionalmente, Scavuzzi *et al.* (2016) analisou o uso da polimixina B e do meropenem separadamente e em associação em isolados MDR de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2}. Neste estudo foi observado que quando submetidos à concentração sub-inibitórias de polimixina B ou meropenem a análise pela microscopia eletrônica mostrou alterações significativas, os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram alterações morfológicas como, rompimento da membrana plasmática e parede celular, retração do material citoplasmático, extravasamento do conteúdo citoplasmático, presença de compartimento membranares, espessamento da parede celular, condensação dos ribossomos, coagulação do DNA e

irregularidades na parede celular. Também foi visto que os isolados de *K. pneumoniae*, quando submetidos a concentração de polimixina B associado com meropenem apresentaram uma maior intensidade das alterações ultraestruturais visualizadas quando comparada com os antimicrobianos testados sem associação (SCAVUZZI *et al.*, 2016).

Ainda no Brasil, Siqueira *et al.*, (2014) observaram em isolados multidroga-resistentes de *P. aeruginosa* alterações morfológicas mais evidentes quando as células foram tratadas com meropenem comparando com ciprofloxacina, entretanto quando tratadas com a combinação desses antimicrobianos houve um somatório das mudanças observadas isoladamente, ou seja, arredondamento e enrugamento celular. Achados semelhantes foram encontrados em isolados de *K. pneumoniae* (portadores do gene *bla_{KPC-2}*), Sharma *et al.*, (2016) observaram que a combinação de polimixina B e meropenem provocaram um somatório das alterações morfológicas (ruptura da membrana e arredondamento celular) ocorridas com o uso dos antimicrobianos usados isoladamente. Além disso, foi observado que as alterações morfológicas diminuíram com o aumento da concentração inibitória do meropenem (SIQUEIRA *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016).

Abdul Rahim *et al.*, (2015) também observaram danos mais severos na superfície celular de *K. pneumoniae* produtoras de NDM após tratamento com polimixina B e cloranfenicol, quando comparadas as alterações encontradas quando tratados com os antimicrobianos isoladamente. O uso do cloranfenicol isolado foi ineficaz causando apenas algumas “bolhas” irregulares na superfície da célula bacteriana, porém quando adicionada a polimixina B além de irregularidades foram observados numerosas fossas e saliências na membrana celular (RAHIM *et al.*, 2015). Recentemente, Hagiya *et al.*, (2019) observaram alterações morfológicas induzidas pelo meropenem (0,5 x CIM) e pelo cefmetazol (0,5 x CIM) em células de *K. pneumoniae* portadoras do gene *bla_{KPC-2}*. Quando tratadas com meropenem foi observado apenas à formação de protuberâncias, enquanto células alongadas foram observadas quando tratadas apenas com cefmetazol. Com o tratamento combinado, as células exibiram arredondamento e formação de protuberância (HAGIYA *et al.*, 2019).

Apesar de poucos relatos na literatura abordarem as alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pelo uso da terapia combinada, em quase todos os estudos foi observado um somatório das alterações obtidas quando as células foram expostas aos antimicrobianos isoladamente, porém, ainda não está claro o mecanismo de ação das combinações utilizadas, fazendo-se necessários mais estudos para investigar não só as alterações causadas por essas combinações, mas também as combinações mais eficientes para o tratamento das infecções causadas por bactérias MDR.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a ocorrência de genes de resistência à carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixinas em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*) provenientes de hospitais de Recife- PE entre 2016 e 2018, determinar *in vitro* a sinergia e a atividade bactericida das combinações de polimixina B, meropenem, amicacina e gentamicina contra isolados clínicos selecionados e investigar as alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por essas associações.

3.2 Específicos

- Determinar a ocorrência e sequência de genes codificadores de carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{SME}*) em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes;
- Determinar a ocorrência e sequência de genes codificadores de EMAs (*ant(2'')-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aac(3)-Ia*, e *aph(3')-VI*) em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes;
- Determinar a ocorrência e sequência dos genes codificadores de 16S rRNA metilases (*armA*, *rmtB*, *rmtD* e *rmtG*) em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes;
- Determinar a ocorrência e sequência do gene *mcr-I*;
- Determinar a relação clonal entre os isolados clínicos de cada espécie de enterobactérias;
- Investigar *in vitro* a ação sinérgica e bactericida de combinações de polimixina B, meropenem, amicacina e gentamicina contra isolados selecionados de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes;
- Investigar *in vitro* a ação sinérgica e bactericida da combinação de meropenem com amicacina e gentamicina contra isolados selecionados de *P. mirabilis* e *S. marcescens*;
- Descrever as alterações morfológicas e ultraestruturais em isolados selecionados de *P. mirabilis* e *S. marcescens* quando submetidos *in vitro* à concentrações subinibitórias de meropenem, amicacina e gentamicina isoladamente e em combinação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Foram analisados 35 isolados clínicos de enterobactérias, incluindo *K. pneumoniae* (n=16), *P. mirabilis* (n=10), *S. marcescens* (n=09), por serem resistentes ao meropenem e a pelo menos um aminoglicosídeo, provenientes de pacientes internados em unidades hospitalares de três hospitais (sendo dois público e um particular) do Recife-PE entre 2016 e 2018. A identificação bacteriana foi realizada nos hospitais pelo sistema automatizado Bactec 9120 (Phoenix, BD) e Vitek®, adicionalmente no Laboratório de Genética Bacteriana e Biologia Molecular da Área de Medicina Tropical-CCM-UFPE foi confirmada à pureza das culturas bacterianas através de testes bioquímicos convencionais: fermentação de glicose, lactose e sacarose, produção de H₂S, degradação da uréia, citrato e descarboxilação da lisina, produção de indol e motilidade (KONEMAN *et al.*, 2008). Os isolados foram mantidos em estoque congelado com glicerol 15% a -20°C. Para as análises foram cultivados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) ou Caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C por 18 horas e plaqueados em Ágar BHI.

Para determinação da atividade sinérgica e bactericida foi utilizado como critério de seleção: a presença do gene *bla_{NDM}* no respectivo isolado. Portanto, foram selecionados isolados de *K. pneumoniae* para determinação da atividade sinérgica e bactericida entre polimixina B, meropenem, amicacina e gentamicina. Devido à resistência intrínseca às polimixinas, os isolados de *P. mirabilis* e *S. marcescens* foram submetidos apenas as combinações de meropenem com amicacina e gentamicina, em seguida, esses isolados foram selecionados para estudos de alterações morfológicas e ultraestruturais.

4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade foi determinado, através de sistema automatizado, utilizando os seguintes antimicrobianos: amicacina (AMI), amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AMP), ampicilina/sulbactam (ASB), aztreonam (ATM), cefazolina (CFZ), cefepime (CFM), cefotaxima (CFT), cefoxitina (CFO), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefuroxima (CRX), cefotaxime (CTX), ciprofloxacina (CIP), ertapenem (ERT), gentamicina (GEN), imipenem (IMI), levofloxacina (LEV), meropenem (MER), piperacilina/tazobactam (PIT), tobramicina (TOB), trimetoprim-sulfametaxazol (TRIS) e tigeciclina (TIG). A

interpretação se deu conforme as recomendações padronizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-USA, 2018).

4.3 Extração do DNA total

A extração de DNA total foi realizada pelo kit Wizard® Genomic DNA, Purification Kit (Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA foi quantificado através do equipamento Nano Drop e estocado a -20°C.

4.4 ERIC2-PCR

Para o método da ERIC2-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minutos à 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100v. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC2-PCR foi realizada através do software GelAnalyser. O dendrograma e o coeficiente de similaridade foi obtido de acordo com UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), usando DendroUPGMA (<http://genomes.urv.es/UPGMA>) (GARCIA-VALLVÉ; PALAU; ROMEU, 1999).

4.5 Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{SME} e *bla*_{GES}

Os genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} foram investigados com os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, isolado K8P para o gene *bla*_{KPC-2} (CABRAL *et al.*, 2012), PS13A para o gene *bla*_{GES-1} (SCAVUZZI *et al.*, 2019b). As amplificações do gene *bla*_{KPC} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 94°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão.

Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72 °C. Para amplificação dos genes *bla_{GES}* e *bla_{SME}* foram utilizadas as seguintes condições: 3 min a 94°C para desnaturação inicial; seguido de 40 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 55°C e 1 minuto à 72°C, e 7 minutos à 72°C para extensão final.

4.6 Condições da PCR para identificação dos genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{NDM}*

Os genes de resistência *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* foram investigados com os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, PS6A e PS7A (SCAVUZZI *et al.*, 2019b). As amplificações dos genes de MBL foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, para anelamento dos primers: 1 minuto à 60°C para *bla_{IMP}* e 1 minuto à 62°C para *bla_{VIM}* e para extensão, 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68°C.

A presença do gene *bla_{NDM-1}* foi investigada utilizando os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Um controle negativo e um positivo, K2R2 (SCAVUZZI *et al.*, 2019a), foram inclusos em cada partida de amplificação, que foi realizada sob as seguintes condições térmicas de ciclagem: 10 min à 94°C para desnaturação inicial, 36 ciclos de amplificação consistindo em 1 min à 94 °C, 1 min à 52° C, 1 min à 72° C e para a extensão final 5 min à 72° C.

4.7 Condições da PCR para identificação do gene *bla_{OXA-48}*

O gene de resistência *bla_{OXA-48}* foi investigado com os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 94°C para desnaturação, para anelamento dos

primers: 1 minuto à 53°C e 1 minuto à 72°C para extensão, 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 10 minutos à 72°C.

4.8 Condições da PCR para identificação dos genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Os genes de resistência *ant(2'')*-Ia, *aac(6')*-Ib, *aac(3)*-Ia, *aph(3')*-VI foram investigados com os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA e um controle positivo, Ea26A (FIRMO *et al.*, 2019a). As amplificações dos genes foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 94°C para desnaturação, 1 minuto à 55°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C.

4.9 Condições da PCR para identificação dos genes 16S rRNA metilases

Os genes de resistência *armA*, *rmtB*, *rmtD* e *rmtG*, foram investigados com os primers descritos na tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo. As amplificações dos genes foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 94°C para desnaturação, 1 minuto à 60°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foram realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C.

4.10 Condições da PCR para identificação do gene *mcr-1*

O gene de resistência *mcr-1* foi investigado com os primers descritos na tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, *E. coli*

ST410 (ROCHA *et al.*, 2017). As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 94°C para desnaturação, para anelamento dos primers: 1 minuto à 55°C e 1 minuto à 72°C para extensão, 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 10 minutos à 72°C.

4.11 Eletroforese em gel de agarose

Cinco microlitros dos produtos de amplificação da PCR acrescidos de 1 µl de Blue-green Loading Dye I (LGC biotecnologia) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) e voltagem constante de 100 v. Foi utilizado um marcador de 100pb (Ludwig Biotec) como padrão de peso molecular. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de Photocap da Vilber Lourmat.

4.12 Sequenciamento de genes de resistência

Os produtos de PCR positivos para os genes de resistência foram purificados através de Kit comercializável SV Total DNA Isolation System (Promega) e sequenciados, no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE, pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977) utilizando-se os primers descritos na tabela 1. As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Bioedit e Clustal W do European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>), e serão depositadas no GenBank.

4.13 Determinação das Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da amicacina, gentamicina, meropenem e polimixina B nos isolados selecionados foi empregado o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas do CLSI 2018. A colônia foi inoculada em caldo Müeller-Hinton e incubada a 37°C até alcançar a turbidez padrão de 0,5 McFarland, para posterior diluição. As diluições dos antimicrobianos foram feitas em caldo Müeller-Hinton cation ajustado (CAMHB). A placa foi levada para estufa à 37°C, após 20h de incubação a concentração sem crescimento visível foi considerada como CIM. O critério de sensibilidade e resistência utilizado foi o proposto pelo CLSI, 2018. E para avaliação da sensibilidade a polimixina B foi utilizado o que preconiza o Brazilian Committee for Sensitivity Test (BrCAST). Os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos em dias diferentes.

4.14 Teste de sinergismo pelo método de microdiluição em caldo (“*Checkerboard*”)

Polimixina B, meropenem, ampicilina e gentamicina foram testados sozinhos e em combinação em concentrações até 2 x acima da CIM dos antimicrobianos testados sozinhos, utilizando diluição do tipo *checkerboard*. A concentração final dos isolados selecionados foi de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. As microplacas com as diferentes combinações de antimicrobianos, nas diferentes concentrações foram incubadas por 18-20 horas a 37 °C e a leitura foi feita observando turvação. O teste foi realizado em triplicata (MOODY, 2004).

A interpretação da sinergia entre os antimicrobianos foi medida pelo índice de concentração inibitória fracional (FICI), calculado pela fórmula: $FICI = FIC A + FIC B = (A)/(CIM A) + (B)/(CIM B)$, sendo que “A” representa a menor concentração inibitória do antimicrobiano A em combinação, e “CIM A” é a menor concentração inibitória do antimicrobiano A sozinho (o mesmo se aplica para o antimicrobiano B). Sinergia foi definido como um $FICI \leq 0,5$, nenhuma alteração quando o $FICI > 0,5$ e ≤ 4 e antagonismo com $FICI > 4$ (ODDS, 2003).

4.15 Estudo *time-kill*

O estudo de *time-kill* (curva de morte) nos isolados selecionados (K7R2, K11R2, P3R3 e S9U) foi realizado com os mesmos antimicrobianos utilizados na microdiluição em caldo e nas combinações realizadas no *checkerboard*. As concentrações de antimicrobianos foram estipuladas de acordo com os resultados obtidos no *checkerboard*. O CAMHB foi inoculado com a suspensão bacteriana para atingir a turbidez de 10^5 CFU/mL. O controle sem antimicrobiano (isto é, uma curva de crescimento bacteriano) foi realizado simultaneamente aos estudos de *time-kill*. Foram retiradas amostras de cada uma das concentrações de bactérias/antimicrobiano às 0, 3, 6, 12 e 24h a partir do momento da adição do antibiótico. Alíquotas foram diluídas e semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton. A contagem das colônias bacterianas foram realizadas após a incubação entre 18 e 24 h a 37 °C em cultivo estático e a média dos resultados foram plotados como \log_{10} UFC/mL x tempo (h), utilizando o software GraphPad Prism 8 (versão demo). O experimento foi realizado em triplicata (WENTAO *et al.*, 2018).

A atividade bacteriostática foi definida como uma diminuição $< 3 \log_{10}$ UFC / mL na contagem de colônias. A atividade bactericida foi definida como uma diminuição $> 3 \log_{10}$ UFC / mL na contagem de colônias, às 24 horas, em relação ao inóculo inicial. A rebrota foi definido como um aumento na contagem de colônias em relação a um ponto anterior. A sinergia foi

definida como uma contagem de colônias $\geq 2 \log_{10}$ UFC / mL em 24 horas em comparação com o agente mais ativo isoladamente. A indiferença foi definida como uma alteração na contagem de colônias às 24 horas em $2 \log_{10}$ UFC/mL em comparação com o agente mais ativo isoladamente. Antagonismo foi definido como $\geq 2 \log_{10}$ UFC / mL maior contagem de colônias às 24 horas em comparação com o agente mais ativo isolado (CLSI, 1999).

4.16 Análise da morfologia bacteriana pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Estudos do nosso grupo de pesquisa já determinaram diversos efeitos de antimicrobianos na morfologia de *K. pneumoniae* (Veras *et al.*, 2015; Scavuzzi *et al.*, 2016), portanto, nesse estudo foi considerado mais relevante o estudo de alterações morfológicas de *P. mirabilis* e *S. marcescens* ainda pouco estudadas. Por isso, para determinação do efeito de antimicrobianos na morfologia bacteriana foram selecionados um isolado de *P. mirabilis* e um de *S. marcescens* (P3R3 e S9U, respectivamente). Estes foram submetidos por 8 horas às concentrações subinibitórias dos antimicrobianos testados de acordo com os resultados obtidos no *checkerboard* e no *time-kill*. Em todos os processamentos foram inclusos um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antimicrobiano.

As culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas, para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5% (Sigma Aldrich). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma Aldrich). Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol de 30% a 100% (Sigma50 Aldrich). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em suportes metálicos. Em seguida, foi realizada a metalização com cobertura do material por uma fina camada de ouro, para visualização da superfície dos isolados bacterianos no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOLJSM-5600 LV do NPT do IAM/FIOCRUZ.

4.17 Determinação das alterações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para determinação do efeito do antimicrobiano na ultraestrutura bacteriana dos isolados selecionados (P3R3 e S9U), estes foram submetidos por 8 horas às concentrações subinibitórias dos antimicrobianos de acordo com o que foi descrito acima. Em todos os processamentos

foram inclusos um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antimicrobiano.

As células bacterianas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas para fixação em tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich). Após as lavagens em tampão fosfato 0,1M, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% para posterior contrastação em bloco utilizando acetato de uranila a 5% (Electron Microscopy Science). Três lavagens foram realizadas para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de acetona de 30 a 100% (Sigma Aldrich). Após a desidratação, foi realizada a infiltração do material e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Science) para realização de cortes ultrafinos. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Electron Microscopy Science). As amostras foram observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (FEI Tecnai™ Spirit G2 BioTWIN) no Setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

4.18 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE- 88576518.0.0000.5208). O parecer de aprovação encontra-se no **Anexo C**.

Tabela 3 - Primers utilizados na PCR e sequenciamento dos genes.

<i>Primers</i>	<i>Genes</i>	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Temp.*	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
KPC-1a KPC-1b	<i>bla_{KPC}</i>	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGTCTACAGAAAACC	63 °C	798	Yigit <i>et al.</i> (2001)
NDM-F NDM-R	<i>bla_{NDM}</i>	GGTTTGGCGATCTGGTTTT CGGAATGGCTCATCACGATC	52 °C	621	Nordmann <i>et al.</i> (2011)
GES-1A GES-1B	<i>bla_{GES}</i>	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	55 °C	860	Wang <i>et al.</i> (2006)
SME- F SME- R	<i>bla_{SME}</i>	TGTAGGTGACAARACTGGGAGCTGTG GCAATACGTGATGCTTCCGCAATAG	53 °C	830	Queenan <i>et al.</i> (2000)
VIM- F VIM- R	<i>bla_{VIM}</i>	CAGATTGCCGATGGTGTGG AGG TGGCCATTCAGCCAGA	62 °C	840	Dong <i>et al.</i> (2008)
IMP-F IMP-R	<i>bla_{IMP}</i>	GGAATAGAG TGG CTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC	60 °C	232	Dong <i>et al.</i> (2008)
OXA-48-F OXA-48-R	<i>bla_{OXA-48}</i>	TTGTTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTGTGATGGC	53 °C	743	Poirel <i>et al.</i> (2004)
armA- F armA- R	<i>armA</i>	AGGTTGTTTCCATTCTGAG TCTCTCCATTCCTCTCTCC	60 °C	591	Chong <i>et al.</i> (2006)
rmtB-F rmtB-R	<i>rmtB</i>	CCCAAACAGACCGTAGAGGC CTCAAACCTCGCGGCAAGC	60 °C	585	Chong <i>et al.</i> (2006)
rmtD-F rmtD-R	<i>rmtD</i>	CGGCACGCGATTGGGAAGC CGGAAACGATGCGACGAT	60 °C	401	Doi e Arakawa (2007)
rmtG-F rmtG-R	<i>rmtG</i>	AAATACAGCGATGTGTGTC ACACGGCATCTGTTTCTTCC	60 °C	250	Bueno <i>et al.</i> (2013)
ant(2'')-Ia-F ant(2'')-Ia-R	<i>ant(2'')-Ia</i>	GCTTACGTTGTCCGCATTT CCTTGGTGATCTCGCCTTTC	55 °C	215	Huang <i>et al.</i> (2012)
aac(6')-Ib-F aac(6')-Ib-R	<i>aac(6')-Ib</i>	TATGAGTGGCTAAATCGAT CCCGCTTCTCGTAGCA	55 °C	395	Noppe-Leclercq <i>et al.</i> (1999)
aac(3)-Ia-F aac(3)-Ia-R	<i>aac(3)-Ia</i>	GACATAAGCCTGTTCGGTT CTCCGAACTCACGCCGA	55 °C	372	Noppe-Leclercq <i>et al.</i> (1999)
aph(3')-VI-F aph(3')-VI-R	<i>aph(3')-VI</i>	CGGAAACAGCGTTTTAGA TTCCTTTGTGACGGTC	55 °C	716	Noppe-Leclercq <i>et al.</i> (1999)
mcr - F mcr - R	<i>mcr-1</i>	CGG TCA GTC CGT TTG TTC CTT GGT CGG TCT GTA GGG			Liu <i>et al.</i> (2016)
ERIC-1 ERIC-2	NA	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	36 °C	NA	Duan <i>et al.</i> (2009)

*Temperatura de anelamento; NA: não aplicável

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1 – ASSOCIAÇÃO DE $BL_{\text{NDM-1}}$ COM $BL_{\text{KPC-2}}$ E GENES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, *PROTEUS MIRABILIS* E *SERRATIA MARCESCENS* NO BRASIL.

Introdução

A prevalência de bactérias produtoras de carbapenemases causando Infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAs) representa uma grande ameaça à saúde pública mundial (1). Dentre as espécies de enterobactérias envolvidas em IRAs, a *Klebsiella pneumoniae* é a mais investigada. Porém, atualmente a resistência aos carbapenêmicos vem ganhando destaque em espécies menos estudadas, como *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens*. A crescente tendência de resistência adquirida por essas duas últimas espécies é preocupante, visto que, elas são intrinsecamente resistentes às polimixinas e conseqüentemente apenas um número limitado de antimicrobianos permanece disponível para uso clínico (2).

Os carbapenêmicos já foram considerados os antimicrobianos mais eficazes para o tratamento das IRAs, porém, sua utilidade vem sendo limitada devido a crescente resistência impulsionada principalmente pela produção das carbapenemases, como KPC, GES, VIM, IMP e mais recentemente NDM (3). O primeiro relato mundial dessa enzima ocorreu em um isolado de *K. pneumoniae* proveniente da Índia em 2009 (4). No Brasil, o primeiro relato de $bl_{\text{NDM-1}}$ foi descrito em 2013, em um isolado de *Providencia rettgeri* proveniente da cidade de Porto Alegre (5). Atualmente, esse gene já foi identificado em várias outras espécies de enterobactérias (6,7,8,9).

Devido ao surgimento e a rápida disseminação das carbapenemases, as polimixinas foram reintroduzidas como um último recurso para o tratamento clínico de pacientes infectados por CPE. Entretanto, o uso inadequado das polimixinas na medicina e na produção de animais permitiram que as bactérias desenvolvessem uma resistência adquirida mediada pelo gene *mcr* (mobilized colistin resistance) (10). Geralmente os genes que codificam as carbapenemases e o gene *mcr* estão localizados em plasmídeos, que também podem abrigar outros determinantes de resistência, incluindo os genes EMAs (Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) e os 16S rRNA metilases (11). A inativação enzimática através da produção de EMAs é o mecanismo mais comum contra os aminoglicosídeos, seguido da metilação do 16S rRNA que

confere um alto nível de resistência principalmente a tobramicina, amicacina e gentamicina (12,13).

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a relação clonal, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a frequência dos principais genes para carbapenemases, metilases e EMAs, como também o gene *mcr*, em isolados de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos provenientes de colonização e infecção em pacientes de três hospitais da cidade do Recife-PE, no nordeste brasileiro.

Materiais e métodos

Isolados bacterianos

Isolados clínicos de enterobactérias de diferentes pacientes foram obtidos de três hospitais de Recife-PE, Brasil, entre 2016 e 2018. Os critérios de inclusão foram: resistência a pelo menos um carbapenêmico, e um aminoglicosídeo. Todos os isolados foram identificados bioquimicamente pelo sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e foram mantidos como estoque congelado a -20 ° C com glicerol a 15%.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A suscetibilidade antimicrobiana foi determinada pelo sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Os antimicrobianos testados incluíram penicilina (ampicilina), complexos β -lactâmicos/ inibidores de β -lactamases (ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam), β -lactâmicos monocíclicos (aztreonam), cefalosporinas (cefepime, ceftazidime, cefuroxima, cefazolina, cefoxitina, ceftriaxone e cefotaxime), aminoglicosídeos (tobramicina, amicacina e gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina), carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem) e tigeciclina.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB) e meropenem (MER) foram confirmadas por microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações e critérios interpretativos do Clinical and Laboratory Standards Institute (14) A CIM da polimixina B (PMB) pelo método de microdiluição foi realizada de acordo com o Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade (15). Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* com $CIM \leq 2 \mu g / ml$ foram categorizados como suscetíveis à polimixina B, e aqueles com $CIM > 2 \mu g / ml$ foram considerados resistentes. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como cepa padrão no teste de suscetibilidade

antibacteriana. A susceptibilidade a polimixina B foi testada apenas para *K. pneumoniae*, pois *P. mirabilis* e *S. marcescens* apresentam resistência intrínseca a esse antimicrobiano.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento dos genes de resistência

A extração de DNA total foi realizada pelo Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada para detectar os genes de resistência utilizando os iniciadores e as condições de acordo com a literatura, genes de resistência aos carbapenêmicos *bla*_{OXA-48}, *bla*_{BKC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SME} (16,17,18), genes de resistência a aminoglicosídeos, genes 16S rRNA metilase (*armA*, *rmtD* e *rmtG*), genes EMAs *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* e *aph(3')-VI* (19,13,20,21,22) e o gene *mcr* (10). Os amplicons representativos, positivos para os genes de resistência, foram purificados pelo SV Total DNA Isolation System (Promega) e submetidos ao sequenciamento de DNA (23). Os resultados foram analisados usando o BioEdit, Clustal e BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

ERIC-PCR

A variabilidade genética dos isolados, agrupada por espécie, foi determinada por *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) usando os primers: ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (24), e as condições de PCR descritas na literature. Os perfis ERIC-PCR foram pontuados pelo tamanho do fragmento com o software GelAnalyser. A análise dos fragmentos amplificados foi classificada como ausente (0) ou presente (1) para construção de dendrogramas. Os dendrogramas e o coeficiente de similaridade foram obtidos com base na similaridade média da matriz, segundo o método UPGMA (Método dos Grupos de Pares Não Ponderados com Média Aritmética), utilizando DendroUPGMA (<http://genomes.urv.es/UPGMA>) (25).

Resultados

Espécies de enterobactérias detectadas e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Entre os 35 isolados de *Enterobacterales* selecionados, por serem resistentes aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos, *K. pneumoniae* (n=16) foi a espécie mais frequentemente detectada, seguida por *P. mirabilis* (n=10) e *S. marcescens* (n=9). Os isolados foram coletados

de diferentes espécimes, incluindo urina (n=12), secreção traqueal (n=7), sangue (n=4), líquido (n=3), ferida operatória (n=2), swab retal (n=2); osso (n=1), swab de lesão (n=1), abscesso (n=1), úlcera sacral (n=1) e fibrose (n=1) (**Tabela 1**). Os resultados do perfil de susceptibilidade antimicrobiana indicaram resistência a mais de três classes de antimicrobianos, sendo as três espécies classificadas como multidroga-resistentes (MDR) (**Figura 1**). Todos os isolados foram resistentes ao meropenem, com CIM variando de 8 a 512 µg/mL (**Tabela 2**). Considerando apenas a resistência aos três aminoglicosídeos testados foram observados 6 diferentes fenótipos, sendo os mais frequentes à resistência AMI e GEN/TOB, ambos com 28,5% (n=10). Cinco isolados foram resistentes à AMI, GEN e TOB. As faixas de CIM para estes antimicrobianos variaram de 2 a 512µg/mL, 1 a 256 µg/mL, 0,5 a 64 µg/mL, respectivamente (**Tabela 2**). Quanto à polimixina B, 50% (8/16) dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram uma CIM >2, sendo classificados como resistentes. A CIM para esse antimicrobiano variou de 0,5 a 32µg/mL. A amicacina e a tigeciclina foram os antimicrobianos com melhor atividade para a espécie *K. pneumoniae*, enquanto a gentamicina e a piperacilina/tazobactam foram os melhores contra *P. mirabilis* e *S. marcescens*.

Genes de resistência

Os resultados da PCR seguido de sequenciamento dos amplicons mostraram os seguintes genes para carbapenemases: *bla*_{NDM-1} (n=9; 26%) e *bla*_{KPC-2} (n=31; 89%). Cinco isolados apresentaram concomitantemente esses dois genes. Os genes para carbapenemases *bla*_{OXA-48}, *bla*_{BKC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SME} não foram detectados nesse estudo.

Trinta e quatro isolados (97%) abrigaram genes EMAs (**Tabela 3**). Dentre eles, o mais comum foi *aph(3)-VI*, com 63% (n=22/35) de ocorrência, seguido do *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa* e *ant(2'')-Ia*, com 43% (n=15/35), 40% (n=14/35) e 20% (n=07/35), respectivamente. O gene *aac(3)-Ia* não foi encontrado. A combinação de *aac(3)-IIa* e *aac(6')-Ib* foi observada em sete (20,5%) isolados e de *aac(6')-Ib*, *aph(3)-VI* em três (9%). Embora neste estudo algumas amostras tenham apresentado alto nível de resistência à amicacina e gentamicina (CIM ≥128µg/mL), todas elas foram negativas para os genes metilases 16S rRNA pesquisados (*armA*, *rmtD* e *rmtG*).

O gene *mcr-1* foi investigado nos isolados de *K. pneumoniae*, porém todos foram negativos. Esse gene não foi investigado em *P. mirabilis* e *S. marcescens* devido à resistência intrínseca às polimixinas dessas espécies. Sequências dos genes de resistência a antibióticos

incluindo *bla_{N_{DM}-1}*, *bla_{K_{PC}-2}* foram submetidas ao GenBank sob os números de acesso: **MK442916, MK860790, MH891076, MK543945, MK543946, MK543948.**

ERIC-PCR

A análise da ERIC-PCR dos 16 isolados de *K. pneumoniae* mostrou que apenas 3 isolados (19%) (K4R3, K6R3 e K7R3) apresentaram um padrão de bandas único, apresentando 100% de similaridade genética, ou seja, relação clonal. Os outros 13 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram perfis heterogêneos, com um máximo de 40% de similaridade (**Figura 2**). Com relação aos isolados de *S. marcescens*, as amostras S1U e S3U apresentaram um perfil único, indicando relação clonal. Foi observado também que os isolados S4U e S9U apresentaram 80% de similaridade. Os outros isolados apresentaram perfis genéticos distintos. Por fim, a análise dos 10 isolados de *P. mirabilis* revelou que 20% deles (P5R3 e P7R3) compartilharam o mesmo perfil pela ERIC-PCR, e outros 8 isolados apresentaram um máximo de 20% de similaridade, sendo considerados geneticamente não relacionados (**Figura 2**).

Análise comparativa de acordo com as espécies

Realizando uma análise comparativa em relação aos genes de resistência nas três espécies estudadas, observamos que a *K. pneumoniae* foi a espécie que apresentou uma maior ocorrência dos genes *bla_{N_{DM}-1}* e *bla_{K_{PC}-2}* em um mesmo isolado, e estes, associados aos genes *aac(6')-Ib* e *aac(3)-IIa*, o que também foi compartilhado por um isolado de *S. marcescens*, S9U. Apenas no isolado de *P. mirabilis* P6R3 os genes *bla_{N_{DM}-1}* e *bla_{K_{PC}-2}* estão associados ao gene *aph(3)-VI*. Além disso, foi observado a presença de um isolado de *K. pneumoniae* (K7R3) proveniente de swab retal (cultura de vigilância) sendo portador dos genes *bla_{N_{DM}-1}* e *bla_{K_{PC}-2}* e apresentando relação clonal com outros dois isolados de infecção (K4R3 e K6R3) provenientes do mesmo hospital, porém de setores distintos. Outro ponto observado entre as três espécies é alta prevalência do gene *bla_{K_{PC}-2}*, além da emergência do *bla_{N_{DM}-1}*. Dentre os genes EMAs, o *aph(3)-VI* foi observado em todos isolados de *P. mirabilis*, em 67% das *S. marcescens* e apenas 37% das *K. pneumoniae*, entretanto, a maior ocorrência das acetiltransferases, representadas pelos genes *aac(6')-Ib* e *aac(3)-IIa*, foi observado na espécie *K. pneumoniae*. Essa espécie também apresentou uma maior ocorrência do gene *ant(2'')-Ia*.

Discussão

A incidência mundial de enterobactérias produtoras de carbapenemases (CPE) tem aumentado consideravelmente, porém as espécies *P. mirabilis* e *S. marcescens* ainda são negligenciadas e poucos estudadas. Esse fato é bastante preocupante, visto que a produção de carbapenemases, por espécies intrinsecamente resistentes às polimixinas, representa um risco ao sucesso terapêutico e contribuem para altos índices de mortalidade decorrente de IRAs causadas por essas bactérias (26,27).

No Brasil, a KPC é endêmica desde 2006, sendo o primeiro relato na cidade de Recife-PE (28), porém recentemente, a NDM tem sido detectada em isolados de bactérias gram-negativas em várias regiões desse país, principalmente em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (11,6). No presente trabalho foi observado que a maioria dos isolados que apresentaram o gene *bla*_{NDM-1} possuíam também o gene *bla*_{KPC-2} e diferentes genes codificadores de EMAs (*aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib* e *aph(3)-VI*). Esse dado mostra a persistência da KPC ao longo dos anos no nordeste brasileiro e evidencia a emergência de uma nova carbapenemase, a NDM. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve a associação de *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2} em isolados de *P. mirabilis* e *S. marcescens*, bem como a associação com os genes EMAs. Essa associação de resistência demonstra a rápida evolução dessas bactérias e a capacidade de adquirir e manter diferentes genes, indicando a necessidade de investigações acerca do ambiente genético onde estes genes estão inseridos.

Com relação à resistência aos aminoglicosídeos, foram observadas discordâncias entre perfil fenotípico e o perfil genotípico. Fernandez-Martinez *et al* (29) também encontraram discordâncias desse tipo. Essa relação exata é complexa de ser estabelecida, pois uma determinada enzima pode modificar diferentes aminoglicosídeos e um isolado pode expressar ou não o gene da enzima modificadora que ele apresente. Além disso, uma acetilação ineficiente também prejudica a inativação do aminoglicosídeo (12). Por outro lado, quando se observa isoladamente a prevalência dos genes encontrados por espécie, estes estão de acordo com a predominância do perfil fenotípico, como por exemplo é observado em isolados de *P. mirabilis* e *S. marcescens* resistentes a amicacina e que apresentaram predominantemente o gene *aph(3')-VI*, principal responsável pela resistência a esse antimicrobiano. Do mesmo modo foi observado uma alta prevalência do gene *aac(3)-IIa* em isolados de *K. pneumoniae*, os quais apresentaram altos níveis de resistência a gentamicina (12). Vale mencionar também, que talvez as altas CIMs, para amicacina e gentamicina, encontradas neste estudo sejam devido a presença de outras metilases 16S rRNA não pesquisadas, como foi observado por Kumarasamy *et al* (30) e Wu *et al* (7) em outras espécies.

Os altos percentuais de resistência bacteriana aos carbapenêmicos e a resistência cruzada a vários antimicrobianos observadas nesse trabalho são preocupantes. Em nosso estudo foi observado que a maioria dos isolados exibiu um alto nível de resistência a quase todos agentes antimicrobianos testados, incluindo cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e polimixina B. Estudos recentes alertam para o crescimento de forma significativa da resistência à polimixina em enterobactérias produtoras de carbapenemases, sugerindo uma forte associação entre a presença de carbapenemases e a diminuição da atividade da polimixina contra esses isolados (31,32). Este trabalho mostra a presença do alto nível de resistência a polimixina B entre metade dos isolados de *K. pneumoniae*, todos carbapenemase positivo. Com destaque para o isolado K7R2 que também é portador do gene *bla_{NDM-1}* e que apresentam uma CIM considerado elevado para polimixina B. Apesar da alta taxa de resistência a polimixina B detectada nesse estudo, o gene *mcr-1* não foi encontrado. Deve-se ressaltar que a resistência as polimixina em *K. pneumoniae* está principalmente relacionada a mutações cromossômicas em sistemas reguladores de dois componentes envolvidos na via de síntese de lipopolissacarídeos (33), apesar de que o gene *mcr-1* já tenha sido descrito nesta espécie bacteriana (34,35).

A ERIC-PCR demonstrou que tanto *K. pneumoniae*, quanto *P. mirabilis* e *S. marcescens* apresentaram um perfil multiclonal. Essa variabilidade genética, que também foi observada em estudos anteriores (36,37,38), é essencial para a persistência dessas espécies no ambiente hospitalar. Isolados de colonização carregando diversos genes de resistência e apresentando relação clonal com outros isolados indicam uma alta probabilidade de pacientes estarem servindo de reservatórios para bactérias portadoras dos genes *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}* e outros determinantes de resistência. Esses achados são preocupantes, pois a associação desses mecanismos de resistência limita ainda mais as opções antimicrobianas disponíveis para o tratamento das IRAs por essas bactérias.

Portanto, os dados do presente trabalho alertam para a emergência do gene *bla_{NDM-1}*, associado com *bla_{KPC-2}* e genes EMAs, em isolados de enterobactérias com perfil multiclonal, destacando os achados desses genes em *P. mirabilis* e *S. marcescens*, que são espécies pouco investigadas. Destacamos que se a emergência do gene *bla_{NDM}* não for contida, existe um grande risco desse gene se tornar endêmico no Brasil e em outros países, como ocorreu com o gene *bla_{KPC}*.

Figura 10 - Perfil de resistência antimicrobiana da *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*. Todos isolados foram pré-selecionados baseado na resistência ao carbapenêmicos e aminoglicosídeos.

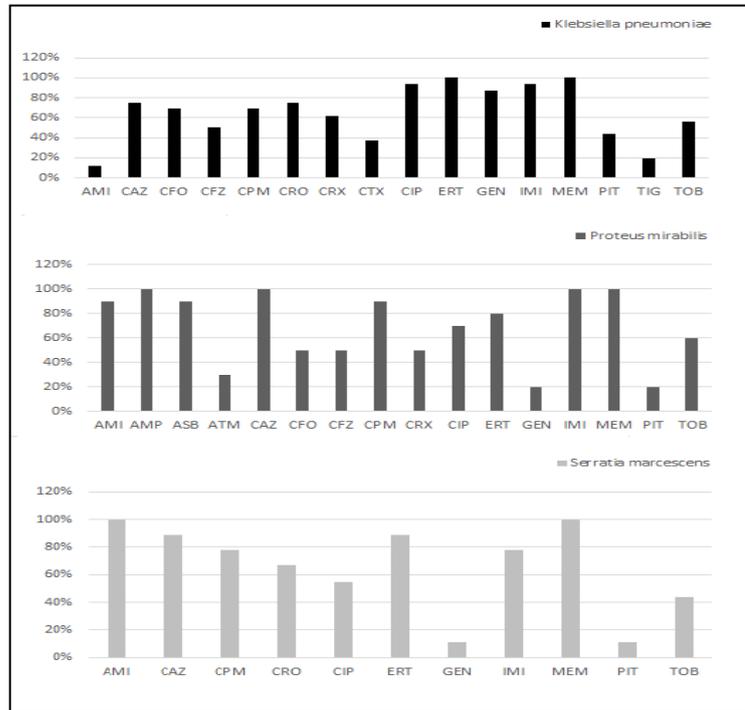


Figura 11 - Dendrograma mostrando o perfil genético de **A-P. mirabilis**; **B-S. marcescens**; **C-K. pneumoniae**. Análise de agrupamentos por ERIC-PCR usando o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA. A escala indica a porcentagem de similaridade genética.

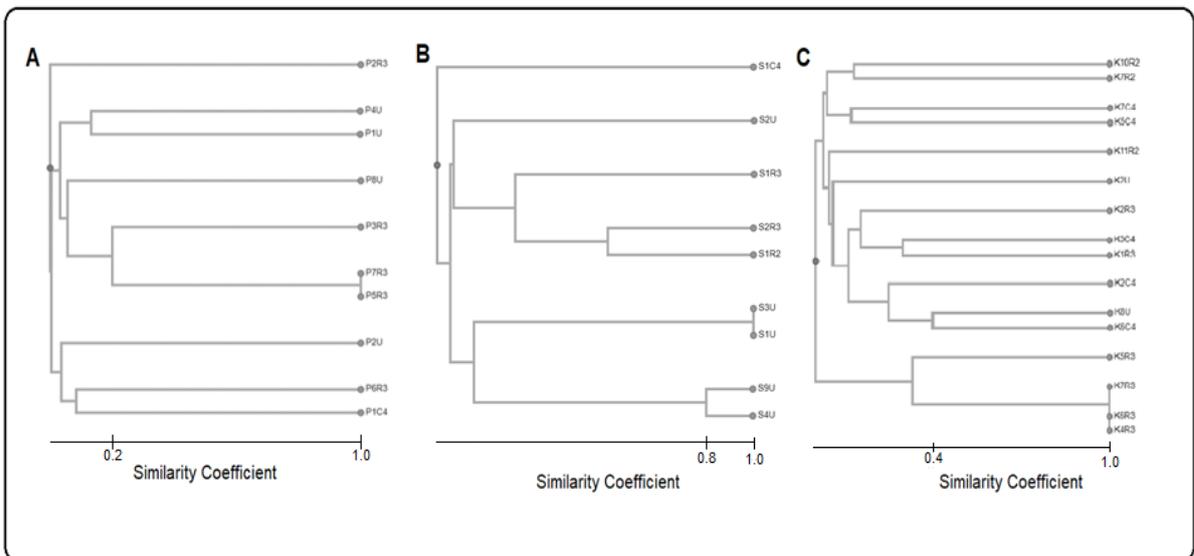


Tabela 1 - Origem e perfil de resistência antimicrobiana da *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* provenientes de três hospitais de Recife-PE, Brasil entre os anos de 2016 e 2018.

Isolado	Data de isolamento	Local de isolamento	Setor	Perfil de resistência antimicrobiana
1. K7-R2	04/25/2016	Urina	UTI Adulto	CPM, CAZ, CRX, ERT, GEN, IMI, MEM, PMB
2. K10-R2	05/22/2016	Urina	Clínica Médica	CFZ, CPM, CAZ, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM
3. K11-R2	05/25/2016	Urina	Ortopedia	CFZ, CPM, CAZ, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, PMB
4. K1-R3	10/31/2017	Urina	UTI Adulto	CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, AMK, GEN, ERT, IMI, MEM, PMB
5. K2-R3	10/06/2017	Urina	Traumatologia	CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, GEN, ERT, IMI, MEM
6. K4-R3	09/14/2018	Urina	UTI Adulto	ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, MEM, TIG, TOB
7. K5-R3	09/13/2018	Ferida operatória	UTI Geral	CFZ, CPM, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TOB
8. K6-R3	09/14/2018	Osso	Ortopedia	ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TIG, TOB
9. K7-R3	09/17/2018	Swab Retal	UTI Adulto	CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TIG, TOB
10. K2-U	09/22/2016	Asp. traqueal	UTI Geral	CPM, CAZ, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, PIT, PMB
11. K8-U	03/10/2017	Fluido Cerebral	Neurologia	AMK, CPM, CAZ, CRO, CRX, CFO, CTX, CIP, IMI, MEM, ERT, PIT, PMB
12. K2-C4	12/15/2016	Urina	UTI	CAZ, CRO, CFO, CTX, CIP, IMI, MEM, ERT, GEN, PIT, TOB
13. K3-C4	01/04/2016	Swab Retal	UTI	AMP, CRO, CFO, CTX, CIP, PIT, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PMB
14. K5-C4	02/12/2016	Aspirado traqueal	UTI	CRO, CFO, CTX, CIP, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PIT, PMB
15. K6-C4	03/02/2016	Aspirado traqueal	UTI	CRO, CFO, CTX, CIP, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PIT
16. K7-C4	01/15/2017	Sangue	UTI	CRO, CFO, CTX, CIP, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PIT, PMB
17. P1-U	07/29/2016	Urina	UTI Geral	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, CIP, ERT, MEM, IMI
18. P2-U	07/30/2016	Urina	UTI Geral	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, CIP, GEN, MEM, IMI, ERT, TOB,
19. P4-U	05/19/2016	Sangue	UTI Geral	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, MEM, IMI, ERT, PIT
20. P8-U	09/22/2016	Aspirado traqueal	Isolamento	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, MEM, IMI, PIT
21. P1-C4	03/02/2016	Swab de lesão	UTI	AMP, AMK, CAZ, CRO, CIP, MEM, IMI, GEN, TOB
	10/23/2017	Abscesso	UTI Geral	

22. P2-R3				AMP, ASB, AMK, ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT
23. P3-R3	10/25/2017	Urina	UTI Geral	AMP, ASB, AMK, ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, GEN, MEM, IMI, ERT, TOB
24. P5-R3	11/01/2017	Fluido Cerebral	Neurologia	AMP, ASB, AMK, ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
25.P6-R3	04/09/2018	Úlcera Sacral	UTI adulto	AMP, ASB, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, GEN, MEM, IMI, ERT, TOB
26.P7-R3	04/29/2018	Urina	UTI adulto	AMP, ASB, AMK, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
27. S1-R3	03/21/2018	Fibrose	Ortopedia	AMK, CPM, CAZ, CRO, CIP, MEM, ERT, IMI
28. S2-R3	09/08/2018	Ferida operatória	UTI Geral	AMK, CPM, CAZ, CRO, CIP, ERT, MEM, TOB
29. S1-R2	04/07/2016	Fluido Cerebral	Neurologia	AMK, CAZ, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TOB
30. S1-U	05/01/2016	Aspirado traqueal	UTI Geral	AMK, CPM, CAZ, CRO, MEM
31. S2-U	05/03/2016	Urina	UTI Geral	AMK, CPM, CAZ, CRO, MEM, IMI, ERT
32. S3-U	06/01/2016	Aspirado traqueal	UTI Geral	AMK, CPM, CAZ, CRO, MEM, IMI, ERT
33. S4-U	05/30/2016	Aspirado traqueal	UTI Geral	AMK, CPM, CAZ, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
34. S9-U	09/02/2016	Sangue	UTI Geral	AMK, CPM, CAZ, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
35. S1-C4	09/29/2016	Sangue	UTI	AMK, CRO, MEM, IMI, ERT, PIT

K: *Klebsiella pneumoniae*; **P:** *Proteus mirabilis*; **S:** *Serratia marcescens*. **R/C:** hospital público; **U:** hospital privado; **AMP:** ampicilina; **ASB:** ampicilina/sulbactam; **ATM:** aztreonam; **AMK:** amicacina; **CFZ:** cefazolina; **CPM:** cefepime; **CFO:** cefoxitina; **CAZ:** ceftazidima; **CRO:** ceftriaxona; **CRX:** cefuroxima; **CTX:** cefotaxime; **CIP:** ciprofloxacina; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **MEM:** meropenem; **IMI:** imipenem; **ERT:** ertapenem; **PIT:** piperacilina/tazobactam; **PMB:** polimixina B; **TIG:** tigeciclina. **UTI:** unidade de terapia intensiva.

Tabela 2 Perfil clonal, fenotípico e genotípico dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* provenientes de três hospitais de Recife, Brasil.

Isolado	ERIC	Genes de Resistência	CIM(µg/ mL)				
			PMB	AMI	GEN	TOB	MEM
1. K7-R2	E2 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	16	16	128	4	16
2. K10-R2	E1 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	2	2	16	1	16
3. K11-R2	E5 _K	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	4	8	64	4	16
4. K1-R3	E9 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	4	64	16	4	32
5. K2-R3	E7 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	2	2	64	2	64
6. K4-R3	E14 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	1	4	256	16	32
7. K5-R3	E13 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3)-VI</i>	1	8	64	16	32
8. K6-R3	E14 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	0,5	4	128	16	64
9. K7-R3	E14 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	1	4	64	16	64
10. K2-U	E6 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	4	16	16	1	16
11. K8-U	E11 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	32	64	1	1	16
12. K2-C4	E10 _K	<i>bla</i> _{KPC}	0,5	16	32	8	64
13. K3-C4	E8 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	4	4	128	16	32
14. K5-C4	E4 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	4	4	128	16	64
15. K6-C4	E12 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>ant(2)-Ia</i>	2	2	128	16	64
16. K7-C4	E3 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	4	16	32	32	64
17. P1-U	E3 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	128	4	4	16

18. P2-U	E7 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3)-VI</i> ,	IR	128	256	16	16
19. P4-U	E2 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	32	4	4	8
20. P8-U	E4 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	4	16
21. P1-C4	E9 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i>	IR	128	8	16	16
22. P2-R3	E1 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	4	16
23. P3-R3	E5 _P	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	IR	64	16	32	16
24. P5-R3	E6 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i>	IR	256	4	16	256
25. P6-R3	E8 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	256	128	16	16
26. P7-R3	E6 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i>	IR	512	16	64	128
27. S1-R3	E3 _S	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	0,25	512
28. S2-R3	E4 _S	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(6)-Ib</i>	IR	64	2	16	128
29. S1-R2	E5 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	IR	64	256	32	256
30. S1-U	E6 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	32	1	1	16
31. S2-U	E1 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	1	1	16
32. S3-U	E6 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	1	1	16
33. S4-U	E7 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	16	16
34. S9-U	E7 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	IR	64	2	16	128
35. S1-C4	E2 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	128	4	1	16

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-polymerase chain reaction.

PMB: polimixina B; **AMI:** ampicilina; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **MEM:** meropenem. **IR:** intrinsecamente resistente a polimixina B.

Tabela 3 - Prevalência dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) e correlação com antibiogramas esperados e observados em 35 isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemases.

Genes EMAs	Nº isolados	Fenótipo esperado	Fenótipo Observado (Nº isolados)
<i>aph(3)-VI</i>	14	AMI	Como esperado (10) AMK, GEN, TOB (1) AMK, TOB (1) GEN, TOB (1) GEN (1)
<i>ant(2'')-Ia</i>	1	GEN, TOB	Como esperado (1)
<i>aac(6')-Ib</i>	1	AMI, TOB	Como esperado (1)
<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib</i>	7	AMI, GEN, TOB	GEN, TOB (5) AMK, TOB(1) GEN (1)
<i>aac(3)-IIa, ant(2'')-Ia</i>	2	GEN, TOB	AMK, GEN, TOB (1) GEN (1)
<i>aac(3)-IIa, aph(3)-VI</i>	2	AMI, GEN, TOB	Como esperado (1) GEN, TOB (1)
<i>aac(6')-Ib, aph(3)-VI</i>	3	AMI, TOB	Como esperado (1) AMK, GEN, TOB (2)
<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, ant(2'')-Ia</i>	1	AMI, GEN, TOB	GEN(1)
<i>aac(6')-Ib, aph(3)-VI, ant(2'')-Ia</i>	1	AMI, GEN, TOB	Como esperado (1)
<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, ant(2'')-Ia, aph(3)-VI</i>	2	AMI, GEN, TOB	GEN(1) AMK, GEN (1)
Nenhum	1		GEN, TOB (1)
Nº Total de isolados	35		

AMI: amicacina; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina.

Referências

1. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2016; p. 460-469 DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
2. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert review of anti-infective therapy*. 2017; 15 DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1316193>
3. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Scj (Basel)*. 2017; 6: p. 1 DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/medsci6010001>
4. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12): p. 5046-5054 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
5. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beirão GC, Chagas TP, Timm LN, *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: p. 2956-2957 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt298>
6. da Silva IR, Aires CA, Conceição-Neto OC, Olivera Santos IC, Ferreira Pereira N, J MS, *et al.* Distribution of clinical NDM-1-producing Gram-Negative bacteria in Brazil. 2019 DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0240>
7. Wu W, Feng Y, Carattoli A, Zong Z. Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM carbapenemases by whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: p. 6625-6628 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01275-15>
8. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res*. 2015; 48(2): p. 174-177 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144154>
9. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, A ME, *et al.* Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist*. 2015; 21(2): p. 234-236 DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2014.0171>

10. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16: p. 161-168 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
11. Aires CA, Pereira PS, de Araujo CF, Chagas TP, Oliveira J, Buonora S, *et al.* Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;; p. 1-6 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01048-16>
12. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates.* 2010; 13(6): p. 151-171 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
13. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: p. 88-94 DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/518605>
14. CLSI CaLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement M100-S28. [Online]. Wayne, PA.; 2018.
15. BrCAST BCoAST.; 2017. Available from: <http://brcast.org.br/>.
16. Dong F, Xu X, Song W, Lu P, Yu S, Yang Y, *et al.* Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a pediatric clinic in China. *Chin Med J.* 2008; 121: p. 1611-1616. PMID: [19024085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19024085/)
17. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle J, Steward C, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2001; 45(4): p. 1151-1161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
18. Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore D, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class a beta-lactamase, SME-1, from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38: p. 1262-1270 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.38.6.1262>
19. Lee H, Yong D, Yum J, Roh K, Lee K, Yamane Y, *et al.* Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 56: p. 305-312 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.002>

20. Bueno MC, Francisco GR, O'Hara JA, Garcia DO, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): p. 2397-2400 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02108-12>
21. Huang J, Ye M, Jia X, Yu F, Wang M. Coexistence of armA and genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Acinetobacter baumannii*. *Afric J Microb Res*. 2012; 6(25): p. 5325-5330 DOI: 10.5897/AJMR11.1529
22. Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol*. 1999; 150: p. 317-322 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80057-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80057-6)
23. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 74: p. 5463-5467 DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
24. Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, *et al*. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res*. 2009; 109: p. 511-517 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>
25. Garcia-Vallvé S, Palau J, Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol*. 1999; 16: p. 1125-1134 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026203>
26. Phan H, Stoesser N, Maciuca I, Toma F, Szekely E, Flonta M, *et al*. Illumina short-read and MinION long-read WGS to characterize the molecular epidemiology of an NDM-1 *Serratia marcescens* outbreak in Romania. *The Journal of Antimicrob Chemother*. 2017; 73(3): p. 672-679 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx456>
27. Qin S, Qi H, Zhang Q, Zhao D, Liu Z, Tian H, *et al*. Emergence of extensively drug-resistant *Proteus mirabilis* harboring a conjugative NDM-1 plasmid and a novel *Salmonella* genomic island 1 variant, SGI1-Z. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: p. 6601-6604 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00292-15>
28. Monteiro J, Santos A, Asensi D, Peirano G, Gales A. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; p. 333-334 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00736-08>

29. Fernandez-Martinez M, Castillo BR, Lecea-Cuello MJ, Rodriguez-Baño J, Pascual A, Martínez LM. Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing extended spectrum beta-lactamases collected in two multicenter studies in Spain. *Microb Drug Res.* 2017 DOI: <http://doi.org/10.1089/mdr.2017.0102>
30. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: p. 243-244 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr431>
31. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins:antibacterial activity, susceptibility testing and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30: p. 557-96 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
32. Bradford PA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Wise MG, Hackel M, Sahm DF. Correlation of beta-lactamase production and colistin resistance among Enterobacteriaceae isolates from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 60(3): p. 1385-1392 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01870-15>
33. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci.* 2010; 17: p. 60 DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-17-60>
34. Li A, Yang Y, Miao M. Complete Sequences of mcr-1-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum-β-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(7): p. 4351-4354 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00550-16>
35. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, De Angelis L, Fortunato S, *et al.* mcr1.2, a New mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2016; 60(9): p. 5612-5615 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01075-16>
36. de Cássia Andrade Melo R, de Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Current microb.* 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-014-0662-0>

37. Souza Lopes AC, Rodrigues JF, Morais Junior MA. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. 2005; 160: p. 37-46
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.007>
38. Cabral AB, de Cássia Andrade Melo R, Maciel MAV, Souza Lopes AC. Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45: p. 572-578 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000500007>

5.2 ARTIGO 2- ATIVIDADE *IN VITRO* DA POLIMIXINA B EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM, AMICACINA E GENTAMICINA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PORTADORES DE EMAS, *BLA*_{NDM-1} E *BLA*_{KPC-2}.

1. Introdução

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos representa uma ameaça à saúde humana mundial. Entre as enzimas responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos, a metalo- β -lactamase Nova Délhi (NDM) merecem atenção devido à sua localização em elementos genéticos móveis e à coexistência com muitos outros determinantes de resistência, como a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) e as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (Kumarasamy e Kalyanasundaram, 2012; Quiles *et al*, 2015; Firmo *et al*, 2019). Por serem tipicamente resistentes a todos β -lactâmicos e a muitas outras classes de antimicrobianos, as infecções causadas por isolados bacterianos produtores de NDM e KPC são extremamente difíceis de tratar, principalmente quando se utiliza a monoterapia. O que acarreta no aumento da morbidade e dos custos econômicos (Thabit *et al*, 2015).

Diante das opções de tratamento cada vez menores, ressurgiram as polimixinas, que mantêm uma atividade significativa contra patógenos produtores de NDM e KPC, incluindo *K. pneumoniae*. Em contrapartida, estudos recentes demonstram o crescimento da resistência a polimixina B em bactérias gram-negativas, mundialmente, inclusive no Brasil (Diep *et al*, 2018; Firmo, 2019). Nesse cenário a terapia combinada tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana e reduzir o surgimento de resistência (Rahim *et al* 2015; Bulman *et al* 2017; Hagiya *et al*, 2018; Kulengowski *et al*, 2018).

Infelizmente, as combinações de antibióticos utilizadas na clínica para tratamento das infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAs) causadas por *K. pneumoniae* MDR permanecem incertas e são utilizadas de modo empírico. Embora existam pesquisas relatando as combinações efetivas *in vitro* contra algumas espécies bacterianas, é fundamental continuar a busca por combinações efetivas contra bactérias com novos perfis de resistência afim de manter a eficácia clínica dos antimicrobianos utilizados atualmente (Tängdén *et al*, 2014; Hagiya *et al*, 2018; Kulengowski *et al*, 2018). Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar *in vitro*, utilizando concentrações subinibitórias de cada antibiótico, a combinação de polimixina B (PMB), meropenem (MEM), amicacina (AMI) e gentamicina (GEN) contra dois isolados clínicos de *K. pneumoniae* portadores de genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} e EMAs e resistentes a polimixina B.

2. Materiais e métodos

2.1. Isolados bacterianos

Para este estudo, foram selecionados dois isolados clínicos de *K. pneumoniae* (K7R2 e K11R2) provenientes de pacientes com infecção urinária de um hospital público de Recife, PE, Brasil, por apresentarem resistência a polimixina B (PMB) (CIMs 16 e 4 mg/L) e possuírem o gene *bla_{NDM}* coexistindo com genes EMAs e o gene *bla_{KPC}* (Firmo *et al.*, 2019) (Tabela 1). Ambos isolados (K7R2 e K11R2) foram resistentes ao meropenem (MEM) (CIM 16 mg/L) e a gentamicina (GEN) (CIMs de 128 e 64 mg/L), respectivamente. A amicacina (AMI) foi o antimicrobiano testado mais ativo, com CIMs de 16 e 8 mg/L, segundo os critérios interpretativos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

2.2. Checkerboard

O *checkerboard* foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das combinações PMB+AMI, PMB+GEN, PMB+MEM, MEM+AMI e MEM+GEN. As CIMs de cada antimicrobiano foram determinadas por testes de microdiluição em caldo, e os dados obtidos foram utilizados para os cálculos da sinergia. Para o *checkerboard* foram utilizados 2xCIM do antimicrobiano sozinho e as diluições foram feitas em triplicata. O inóculo de cada isolado bacteriano foi preparado em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB), com padrão 0,5 McFarland e adicionado aos poços a uma concentração final de 10^5 UFC/mL e as placas foram incubadas por 18 a 20h a 37 °C (MOODY, 2004). As concentrações inibitórias fracionárias totais (FICs) para cada poço foram calculadas de acordo com a fórmula: $FICI = FIC \text{ do agente A} + FIC \text{ do agente B}$, em que a $FIC \text{ do agente A ou B} = CIM \text{ do agente A ou B em combinação} / CIM \text{ do agente A ou B sozinho}$. Na interpretação dos resultados dos cálculos, foram utilizados os seguintes princípios: valores de FICI de $\leq 0,5$ indicam “sinergia”, valores de $FICI > 0,5 - 4$ indicam “indiferença” e $FICI > 4$ “antagonismo” (ODDS, 2003).

2.3. Ensaio Time-kill

Os ensaios *time-kill* foram realizados com os isolados K7R2 e K11R2 para avaliar a sinergia e a atividade bactericida da combinação. O CAMHB (Sigma-Aldrich) foi inoculado com a suspensão bacteriana para atingir um inóculo final de 10^5 UFC/mL. As concentrações testadas foram $0,125 \times CIM$ (concentração subinibitória) para todos os antimicrobianos. As experiências de controle sem os fármacos (isto é, uma curva de crescimento bacteriano) foram realizadas simultaneamente com os estudos de *time-kill*.

Foram retiradas amostras de cada uma das concentrações de bactérias/antimicrobiano às 0, 3, 6, 12 e 24 h a partir do momento da adição do fármaco. Alíquotas foram semeadas em placas com ágar Mueller-Hinton (Kasvi). As contagens de colônias bacterianas (expressas em \log_{10} UFC/mL) foram realizadas após a incubação a 37 ° C em cada intervalo de tempo. Todas as experiências foram realizadas em triplicata (Wentao et al., 2018).

A atividade bactericida foi definida como uma diminuição $>3 \log_{10}$ CFU/mL na contagem de colônias, às 24 horas, em relação ao inóculo inicial. O recrescimento foi definido como um aumento na contagem de colônias em relação a um ponto anterior. A sinergia foi definida como uma diminuição na contagem de colônias de $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL em 24 horas em comparação com o agente mais ativo isoladamente. A indiferença foi definida como uma alteração na contagem de colônias às 24 horas em $2 \log_{10}$ UFC/mL em comparação com o agente mais ativo isoladamente. Antagonismo foi definido como $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL maior contagem de colônias às 24 horas em comparação com o agente mais ativo isolado (CLSI, 1999).

3. Resultados

O teste *checkerboard* revelou sinergia nas cinco combinações testadas em ambos isolados, mesmo estes sendo susceptíveis apenas a amicacina e portadores de genes EMAs, *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}* (**Tabela 1**). Considerando o menor Σ FIC encontrado, as combinações de PMB com AMI e PMB com MEM tiveram melhor desempenho no isolado K7R2 com redução da CIM de PMB em 16 vezes quando combinados, em comparação com o seu uso isolado. De maneira análoga, para o K11R2, PMB e AMI foi a melhor combinação com diminuição da CIM da PMB em torno de 32 vezes. Antagonismo não foi observado em nenhum isolado.

As curvas de morte dos antimicrobianos AMI, GEN, MEM e PMB e das respectivas combinações avaliadas em relação aos isolados K7R2 e K11R2 são mostradas nas **Figura 1 e 2**. Contra K7R2, MEM e PMB, utilizados isoladamente, foi observado uma redução na contagem de colônias quando comparado com a curva de crescimento. Porém, contra K11R1, produtor apenas de NDM, foi observado um novo crescimento após 6h para ambos antimicrobianos. A GEN foi ineficaz contra os dois isolados e apresentou desempenho semelhante ao controle de crescimento. A AMI demonstrou atividade contra ambos os isolados até 6h após o início da exposição, porém foi observado um recrescimento após esse período. Segundo resultados do *time-kill*, em ambos isolados foi observada sinergia nas combinações testadas no presente trabalho, exceto para a combinação PBM+GEN. MEM em combinação

com AMI ou GEN contra o isolado K7R2 resultou em atividade bactericida, sem que nenhuma UFC/mL fosse detectada a partir de 12h, porém, as combinações de PBM com AMI e MEM apresentaram melhor atividade bactericida, sem crescimento bacteriano após 6h. Para o isolado K11R2 apesar das combinações testadas (0,125X CIM) apresentarem sinergia, não foi observada redução $>3 \log_{10}$ CFU/mL no número de colônias, portanto nenhuma atividade bactericida.

5. Discussão

Neste estudo, avaliamos os efeitos antibacterianos de combinações incluindo PMB, MEM, AMI e GEN contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de EMAs, NDM-1 e KPC-2 e resistentes a polimixina B. O uso desses antimicrobianos isoladamente foi ineficaz e com novo crescimento após 6h na maioria dos casos, o que é sugestivo de seleção de populações resistentes, devido a heterorresistência, e potencial fracasso clínico, assim como encontrado por Lim *et al.*, (2015) e Cai *et al.*, (2016), possivelmente devido à produção e ação das enzimas codificadas pelos genes encontrados nestes isolados. Em contrapartida, foi demonstrado a eficácia *in vitro* das combinações de PMB+MEM e PMB+AMI. Nesse estudo, encontramos sinergia entre os antimicrobianos, mesmo ambos isolados apresentando resistência a PMB, MEM e GEN. Entretanto, nos testes de *time-kill* observamos um efeito bactericida apenas no isolado K7R2.

Em ensaios de combinações é importante considerar as concentrações dos antimicrobianos utilizados, alguns estudos demonstram que essa concentração pode influenciar diretamente na sinergia (Kulengowski *et al* 2017; Alves *et al.*, 2018). Assim como Alves *et al.*, (2018) este estudo encontrou sinergia utilizando concentrações antimicrobianas subinibitórias e dentro dos breakpoints estipulados pelo CLSI (2018). O que para a prática clínica pode ser mais útil do que aqueles resultados obtidos de estudos que utilizaram concentrações bem maiores do que as fisiologicamente alcançáveis. Além disso, ao contrário de Kulengowski *et al.* (2017) não foi possível afirmar que a sinergia foi diretamente dependente da CIM do meropenem, já que foi utilizado apenas uma concentração.

Apesar do desenvolvimento de novos antimicrobianos para o enfrentamento das infecções causadas por microrganismos multirresistentes, vale ressaltar que esses novos fármacos são ineficazes contra produtores de metalo- β -lactamases, como NDM (Karaiskos *et al.*, 2019). Por isso, é importante a pesquisa de combinações que sejam capazes de tratar infecções causadas por bactérias produtoras de NDM. Mesmo com a alta resistência ao

meropenem, alguns estudos *in vitro* mostraram que o meropenem tem sido eficaz quando em combinação com outros antimicrobianos contra portadores do gene *bla_{NDM}* (Tängdén *et al.*, 2014; Lagerback *et al.*, 2016).

Outros estudos demonstraram a eficácia de combinações envolvendo a polimixina B contra isolados portadores do gene *bla_{NDM}* (Bulman *et al.* 2017; Cai *et al.*, 2016; Rahim, 2015; Alves *et al.*, 2018). Cai *et al.* investigaram combinações de PMB com outros antimicrobianos, incluindo AMI e MEM, em quatro isolados de *E.cloacae* multidroga-resistente e produtor das enzimas NDM-1 ou IMP-1. Assim como esse estudo, encontramos sinergia e efeito bactericida nas combinações de PMB+MEM e PMB+AMI, porém em uma concentração de meropenem 32 vezes menor.

Avaliando a combinação de meropenem com amicacina, Kulengowski *et al.* (2017) demonstraram sinergia e atividade bactericida dessa combinação contra isolados produtores de KPC e sensíveis a amicacina com um tempo de morte em torno de 8 horas. Entretanto, no presente estudo observamos uma morte bacteriana mais lenta, só após 12 horas de exposição aos antimicrobianos. O que sugere que a concentração utilizada além da presença de outros genes de resistência interfere na taxa de morte. Este estudo não investigou os níveis de expressão gênica para os genes de resistência pesquisados, o que poderia ter indicado silenciamento ou regulação positiva dos mecanismos de resistência e conseqüentemente o seu comportamento ao longo da exposição aos antimicrobianos.

Em conclusão, as combinações utilizadas neste estudo foram sinérgicas contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de NDM e KPC, porém considerando a atividade bactericida as combinações de PMB+MEM e PMB+AMI, utilizadas em concentrações subinibitórias, foram as mais ativas contra esses isolados. Também pode-se concluir que antimicrobianos aos quais as bactérias são resistentes podem fazer parte dessas combinações, entretanto estudos adicionais *in vitro* e ensaios clínicos são necessários para elucidar o efeito dos genes de resistência na morte sinérgica e para otimizar a terapia combinada contra as bactérias multidroga resistentes. À medida que essas informações se tornam disponíveis, sua tradução para a clínica deve prolongar a eficácia desses antimicrobianos de última linha.

Figura 1 - *Time kill* do isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (K7R2) sob ação de polimixina B (PMB), meropenem (MEM), amicacina (AMK) e gentamicina (GEN) isoladamente e em combinação.

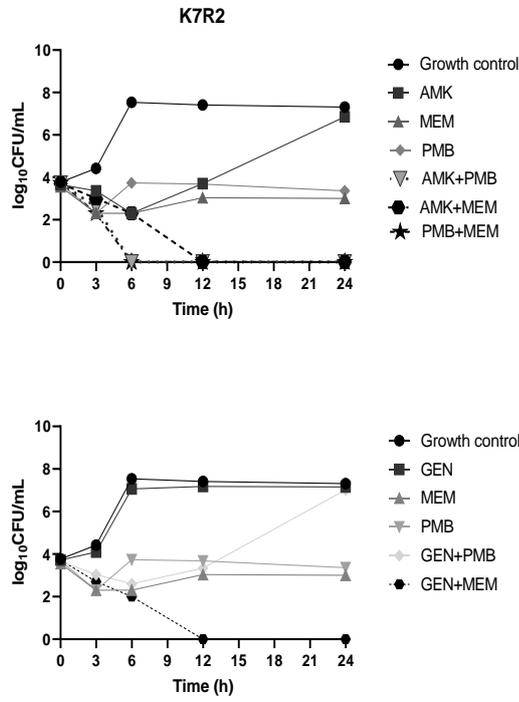


Figura 2 *Time kill* do isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (K11R2) sob ação de polimixina B (PMB), meropenem (MEM), amicacina (AMK) e gentamicina (GEN) isoladamente e em combinação.

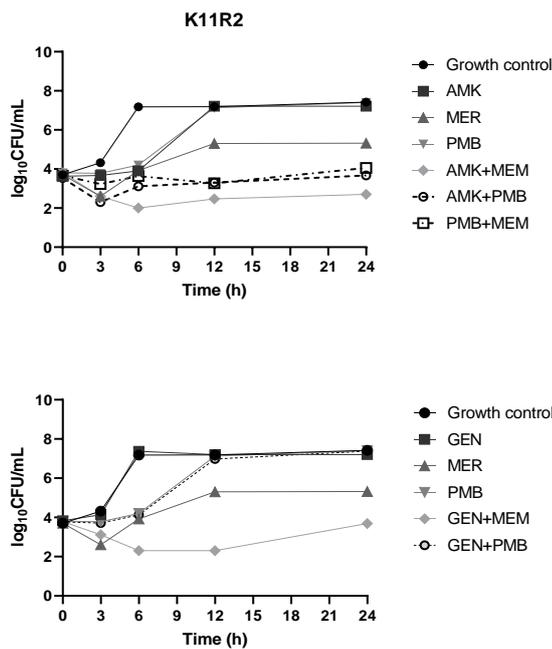


Tabela 1 - Concentrações inibitórias mínimas de amicacina, gentamicina, meropenem e polimixina B isoladamente e resultados de ensaios de *checkerboard* para isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* positivos para bla_{NDM-1} e bla_{KPC-2} .

Ensaio <i>Checkerboard</i>														
Isolado	CIM (mg/L)				AMI+MEM		AMI+PMB		GEN+MEM		GEN+PMB		PMB+MEM	
	A	GE	PM	ME	FICI	Interpret ação								
K7	1	128	16	16	0.26	sinérgico	0.07	sinérgico	0.14	sinérgico	0.26	sinérgico	0.07	sinérgico
R2	6													
K11	8	64	4	16	0.09	sinérgico	0.06	sinérgico	0.14	sinérgico	0.26	sinérgico	0.14	sinérgico
R2														

CIM: concentração inibitória mínima; FICI = (FIC do agente A + FIC do agente B). AMI: amicacina, GEN: gentamicina, MEM: meropenem e PMB: polimixina B.

References

1. Firmo EF, Beltrão EM, Silva FR, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, *et al.* Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Global Antimicrob Resis.* 2019; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>
2. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res.* 2015; 48(2): p. 174-177 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144154>
3. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: p. 243-244 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr431>
4. Thabit AK, Crandon JL, Nicolau DP. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(2):159-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2015.993381>
5. Diep JK., Sharma R., Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao GG. Evaluation of Activity and Emergence of Resistance of Polymyxin B and ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2018; 62(2), e01815-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01815-17>
6. Hagiya, Hideharu & Aoki, Kotaro & Akeda, Yukihiro & Yamamoto, Norihisa & Shanmugakani, Rathina Kumar & Yoshikazu, Ishii & Tomono, Kazunori. In Vitro Effectiveness of Meropenem and Cefmetazole Combination Treatment Against KPC-2-Producing Enterobacteriaceae. *Microbial Drug Resistance.* 2019; 25. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0397>.
7. Kulengowski B, Clark JA, Burgess DS. Killing activity of meropenem in combination with amikacin against VIM- or KPC-producing Enterobacteriaceae that are susceptible, intermediate, or resistant to amikacin. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease.* 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.020>
8. Karaiskos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2019; 15:133–49. DOI: <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1563071>
9. Lagerbäck, P., Khine, W. W. T., Giske, C. G., & Tängdén, T. Evaluation of antibacterial activities of colistin, rifampicin and meropenem combinations against NDM-1-producing

- Klebsiella pneumoniae* in 24h in vitro time–kill experiments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016; 71(8), 2321–2325. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw213>
10. Bulman ZP, Chen L, Walsh J, Satlin MJ, Qian Y, Bulitta JB, *et al.* Polymyxin combinations combat *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaNDM-5: Preparation for a Postantibiotic Era. *mBio*. 2017 Jul-Aug; 8(4): e00540-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00540-17>
 11. Rahim NA, Cheah SE, Johnson MD, Yu H, Sidjabat HE, Boyce J, *et al.* Synergistic killing of NDM-producing MDR *Klebsiella pneumoniae* by two ‘old’ antibiotics-polymyxin B and chloramphenicol. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(9): 2589–2597. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv135>
 12. Tangden T, Hickman RA, Forsberg P, *et al.* Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time–kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 1757–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00741-13>
 13. CLSI CaLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement M100-S28. [Online]. Wayne, PA.; 2018.
 14. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution method in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM; 2004; p. 1–28. DOI: [10.1128/9781555818814.ch5.16](https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch5.16)
 15. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1.
 16. Wentao, N., Guobao, L., Jin, Z., Junchang, C., Rui, W., Zhancheng, G., & Youning, L. (2018). *In vitro* activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *The Journal of Antibiotics*, 71(5), 506–513. DOI: [10.1038/s41429-017-0024-9](https://doi.org/10.1038/s41429-017-0024-9)
 17. CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
 18. Lim TP, Cai Y, Hong Y, Chan EC, Suranthran S, *et al.* In vitro pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively 8 drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:2515- 24. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.03639-14>.
 19. Cai Y, Lim TP, Teo J, Sasikala S, Lee W, *et al.* In Vitro Activity of Polymyxin B in Combination with Various Antibiotics against Extensively Drug- Resistant *Enterobacter*

- cloacae* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:5238-46. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00270-16>
20. Kulengowski B, Campion JJ, Feola DJ, Burgess DS. Effect of the meropenem MIC on the killing activity of meropenem and polymyxin B in combination against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antibiot* (Tokyo). 2017;70:974-8. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2017.73>
21. Alves PH, Boff RT, Barth AL, Martins AF. Synergy of Polymyxin B, Tigecycline and Meropenem against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolates. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.011>

5.3 ARTIGO 3 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS CAUSADAS POR COMBINAÇÕES SINÉRGICAS DE MEROPENEM-GENTAMICINA E MEROPENEM-AMICACINA CONTRA UM ISOLADO CLÍNICO MULTIDROGA-RESISTENTE DE *PROTEUS MIRABILIS* PORTADOR DOS GENES *BL_{NDM-1}*, *AAC(6)-IB*, *ANT(2)-IA* E *APH(3)-VI*

1. Introdução

Proteus mirabilis é uma bactéria Gram-negativa e um importante patógeno humano comumente isolado de infecções do trato urinário (ITU), principalmente em pacientes cateterizados. Além da ITU, o patógeno tem sido descrito como um agente etiológico de diversas infecções oportunistas, como também de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAs), como pielonefrite e seps (ARMBRUSTER *et al.*, 2018).

Como esse patógeno é intrinsecamente resistente as polimixinas, a tetraciclina e a tigeciclina, a aquisição de genes resistência, aos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, como os codificadores de metalo- β -lactamases (M β Ls) e de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) são extremamente preocupantes, visto que as opções terapêuticas são drasticamente limitadas (QIN *et al.*, 2015). As metalo- β -lactamases (M β Ls) são carbapenemases de classe B que hidrolisam quase todos os β -lactâmicos e são relatadas principalmente entre os patógenos Gram-negativos. A principal enzima dessa classe, que ocorrem em enterobactérias, é a NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1), codificada pelo gene *bla_{NDM-1}* que foi inicialmente identificado em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* na Índia (YONG *et al.*, 2009). Já as EMAs são enzimas que agem modificando a estrutura do aminoglicosídeo, antes que este se ligue ao seu alvo. São divididas em três classes, de acordo com suas atividades modificadoras: acetiltransferases (AAC), nucleotidiltransferases (ANT) e fosfotransferases (APH) e encontram-se amplamente disseminadas em diferentes espécies de enterobactérias (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Diante das limitações terapêuticas, o uso de combinações de antimicrobianos tem sido uma estratégia para controlar clinicamente as infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases e tentar suprimir o surgimento de subpopulações resistentes, dentro de uma população heterorresistente (SIQUEIRA *et al.* 2014; SCHMID *et al.*, 2019). Entretanto, a ação sinérgica e o mecanismo de ação dos antimicrobianos em combinação contra isolados MDR de *P. mirabilis* têm sido pouco investigados.

Portanto o objetivo desse estudo foi investigar a sinergia e atividade bactericida das combinações de meropenem, amicacina e gentamicina contra um isolado multidroga-resistente

(MDR) de *P. mirabilis* portador dos genes *bla*_{NDM-1}, *aac(6)-Ib*, *ant(2)-Ia* e *aph(3)-VI* e identificar as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por essas combinações.

2. Material e Métodos

2.1. Isolado bacteriano

Para este estudo foi selecionado um isolado clínico de *P. mirabilis* (P3R3) proveniente de um paciente de um hospital público de Recife, PE, Brasil. Esse isolado foi selecionado pois era de infecção urinária e apresentava os genes *bla*_{NDM}, *aac(6)-Ib*, *aph(3)-VI*, *ant(2)-Ia*, determinados em estudo anterior (Firmo *et al.*, 2019). O isolado apresentou resistência ao meropenem (MEM), a amicacina (AMI) e a gentamicina (GEN), com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 16, 64 e 16 mg/L, respectivamente, de acordo com os critérios interpretativos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

2.2. Ensaio *Checkerboard*

As combinações foram avaliadas em ensaios *checkerboard* em microplacas com caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB). Os antimicrobianos foram testados sozinhos e combinados em concentrações duas vezes maiores do que as CIM dos isolados testados sozinhos. A concentração final do inóculo do isolado P3R3 foi de aproximadamente 10⁵ UFC/ml, e as placas foram incubadas a 37 ° C por 18-20 h. Os testes foram realizados em triplicata. Foram calculados índices de concentrações inibitórias fracionárias (FICIs), sinergia foi definida como FICI ≤ 0,5, nenhuma interação foi definida como FICI > 0,5 e ≤ 4, e antagonismo foi definido como FICI > 4 (Odds, 2003; Moody, 2004).

2.3. Ensaio da curva *time-kill*

Amicacina e gentamicina foram testados na concentração de 0,25 X MIC e o meropenem foi testado na concentração de 2 mg/L. Todos os ensaios incluíram um controle de crescimento sem antimicrobiano. O inóculo final utilizado foi de 10⁵ UFC / ml, todo experimento foi realizado em CAMHB. As amostras foram coletadas de cada uma das concentrações de bactérias /antimicrobiano às 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a adição do fármaco.

Alíquotas foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton (Kasvi). As contagens bacterianas (expressas em \log_{10} UFC / mL) foram realizadas após a incubação de 18 a 24 h a 37 ° C. A cada intervalo de tempo, o valor \log_{10} da contagem de colônias viáveis foi determinado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Wentao et al., 2018).

A atividade bactericida foi definida como uma diminuição $> 3 \log_{10}$ UFC/mL na contagem de colônias, às 24 horas, em relação ao inóculo inicial. O recrescimento foi definido como um aumento na contagem de colônias em relação a um ponto anterior. O sinergismo foi definido como uma redução na contagem de colônias $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL em 24 horas em comparação com o agente mais ativo isoladamente. A indiferença foi definida como uma alteração na contagem de colônias às 24 horas em $2 \log_{10}$ UFC/mL em comparação com o agente mais ativo isoladamente. Antagonismo foi definido como um aumento na contagem de colônias de $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL às 24 horas em comparação com o agente mais ativo isolado (CLSI, 1999).

2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios anteriores, as células do isolado P3R3 foram expostas aos agentes antimicrobianos usando as concentrações, 0,5 mg/L para amicacina e gentamicina e 1mg/L de meropenem. Após 8 h de crescimento, as células bacterianas foram cuidadosamente centrifugadas e fixadas por 2h a 4 °C em solução contendo glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% (Electron Microscopy Science), seguida de desidratação gradual com etanol (SigmaAldrich) (Veras et al., 2015). Após a desidratação, o material foi seco através do ponto crítico, metalizado e visualizado através do microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600 LV).

2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As células do isolado P3R3 foram expostas a agentes antimicrobianos usando as concentrações e os critérios descritos anteriormente. Em todos os processos, um controle para o isolado foi incluído nas mesmas condições e nas mesmas diluições, sem a presença do antibiótico. Após o crescimento, as células bacterianas foram centrifugadas e fixadas nas mesmas condições descritas para o ensaio de MEV. As células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% e logo em seguida contrastadas em acetato de uranila a 5% por 12h (Electron

Microscopy Science). Após esse tempo, as amostras foram desidratadas em série gradual de acetona (Sigma-Aldrich), infiltradas e emblocadas em resina epon 812 (Electron Microscopy Science) a 60°C por 72h. Cortes ultrafinos foram corados com uranila a 5% e citrato de chumbo e visualizados através do microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai™ Spirit G2 BioTWIN) (Veras et al., 2015).

3 Resultados

Apesar do isolado P3R3 ser resistente ao meropenem (CIM de 16 mg/L), à gentamicina (CIM de 16 mg/L) e à amicacina (64 mg/L), o ensaio *checkerboard* demonstrou que quando o meropenem foi testado simultaneamente com a gentamicina ou com a amicacina houve um sinergismo potencializando o efeito de ambos. O meropenem apresentou CIM de 0,5 mg/L quando combinado com a gentamicina e uma CIM de 1mg/L quando combinado com a amicacina. Com relação aos aminoglicosídeos os resultados também foram promissores com redução da CIM em 16 vezes para a gentamicina e 4 vezes para amicacina. Os resultados expressos pelo FICI mostraram um efeito predominantemente sinérgico nas duas combinações avaliadas, na combinação meropenem e gentamicina o menor FICI encontrado foi 0,09 e na combinação meropenem e amicacina, foi 0,31.

Os resultados dos ensaios *time-kill* corroboraram os resultados obtidos no *checkerboard*. Nas concentrações testadas, ambas as combinações apresentaram sinergismo e efeito bactericida, porém a combinação meropenem e gentamicina apresentou efeito bactericida a partir de 6h de incubação, erradicando a população de *P. mirabilis* nesse tempo. Já na combinação meropenem e amicacina o efeito bactericida só foi observado a partir de 12h de exposição aos antimicrobianos (**Figura 1**). Quando o isolado foi incubado apenas com amicacina ou gentamicina a uma concentração subinibitória de 16 mg/L e 4 mg/L, respectivamente, o crescimento bacteriano foi transitoriamente inibido, mas após 6h a população bacteriana voltou a crescer. Resultado semelhante foi obtido quando as células foram expostas ao meropenem sozinho, no entanto, um novo crescimento só foi observado após 12h de incubação.

A microscopia eletrônica de varredura indicou que as células do isolado P3R3 usadas como controle, sem exposição aos antimicrobianos, apresentaram uma morfologia bem conservada, em forma de bastonete e comprimento médio de 1 a 3 µm, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal (**Figura 2A-B**). Embora o isolado P3R3 tenha apresentado resistência à amicacina e a gentamicina, e seja carreador dos genes *aph(3)-VI*,

ant(2)-Ia e *aac(6)-Ib*, quando as células foram submetidas à esses aminoglicosídeos foi possível observar como principal alteração morfológica o alongamento celular. Além disso, a formação de cavidades, septos irregulares e o rompimento celular com extravasamento de material citoplasmático foram identificados quando as células foram expostas a amicacina (**Figura 2C-E**). Também nota-se a presença de estruturas flagelares nos quadros D e F, característicos da espécie *P. mirabilis*. As superfícies das células no grupo controle eram relativamente suaves, entretanto, alongamento e uma aparência enrugada foram predominantemente observadas nas células expostas ao meropenem.

Na figura 3, os quadros A-C mostram as alterações causadas pela combinação meropenem e gentamicina. De modo geral, observa-se uma considerável diminuição no número de células bacterianas. Além disso, há um predomínio de células com alterações mais intensas, o que levou a perda da morfologia característica dessa espécie. Adicionalmente é possível observar uma superfície áspera, divisões celulares incompletas e a presença de cavidades indicativas de alterações na membrana externa. Na combinação meropenem e amicacina foram observados células alongadas, septos irregulares ou ausência deles, divisão celular incompleta e discreto enrugamento celular. Apesar dessa combinação ser sinérgica, após 8h foi possível observar uma quantidade significativa de células bacterianas quando comparada a combinação meropenem e gentamicina (**Figura 3 D-F**).

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar as alterações internas e na parede das células do isolado P3R3. Nas células controle foi possível observar a preservação da morfologia, manutenção da integridade da parede celular, conteúdo citoplasmático eletrodense, presença de ribossomos e material genético distribuído no citoplasma bacteriano (**Figura 4A**). Células tratadas com amicacina apresentaram alongamento ou perda de morfologia, separação das camadas do envoltório celular, presença de espaços elétron-lucentes (indicando perda de conteúdo citoplasmático, ribossomos) e divisão celular irregular (**Figura 4 B-D**). Células sujeitas à gentamicina apresentaram grandes espaços elétron-lucentes no citoplasma com retração da massa citoplasmática, separação das camadas do envoltório celular, divisão celular incompleta, células alongadas e células “fantasma” (**Figura 4 E-G**). O mesmo foi observado nas células tratadas com o meropenem, porém, adicionalmente foram encontrados agregados intracelulares eletrodensos e células disformes (**Figura 4 H-J**).

Nas células tratadas com a combinação meropenem e gentamicina, é possível observar estruturas conhecidas como vesículas da membrana externa (OMV- *outer membrane vesicles*) (**Figura 5A e 5C**). Em ambas as combinações, houve um predomínio da presença de espaços

elétron-lucentes indicativo da perda de ribossomos, paredes celulares com aspecto plissado e ruptura com extravasamento do material citoplasmático (**Figura 5A e 5F**).

4 Discussão

A aquisição de genes codificadores de carbapenemases, como o *bla_{NDM}*, e de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos é particularmente preocupante em *P. mirabilis*, visto que, essa espécie é intrinsecamente resistente ao imipenem, à tigeciclina e as polimixinas, o que torna a terapia clínica extremamente difícil. Diante disso, o uso de combinações de antimicrobianos tem sido uma estratégia para controlar clinicamente as infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases e tentar inibir o crescimento de subpopulações resistentes (SIQUEIRA *et al.* 2014; SCHMID *et al.*, 2019).

O presente estudo relata pela primeira vez a atividade sinérgica e bactericida contra um isolado de *P. mirabilis* portador dos genes, *bla_{NDM-1}*, *aac(6)-Ib*, *ant(2)-Ia*, *aph(3)-VI* e resistente ao meropenem, a gentamicina e a amicacina. A sinergia foi encontrada em concentrações dos antimicrobianos dentro dos *breakpoints* propostos pelo CLSI, assim como Alves *et al.* (2018). Esse resultado é bastante promissor, já que concentrações mais baixas são fisiologicamente alcançáveis e podem ser mais viáveis para a prática clínica. Sobre a dosagem de aminoglicosídeos, a literatura recomenda uma CIM para gentamicina de 0,5–1 µg/ml para minimizar a toxicidade desse antimicrobiano para o paciente (BLAND; PAI; LODISE, 2018).

Apesar de encontrarmos sinergia e atividade bactericida utilizando a combinação meropenem e amicacina, contra apenas um isolado de *P. mirabilis* produtor de NDM-1, a curva de morte foi mais lenta, com a redução da população bacteriana após 12h. Tempo relativamente lento, quando comparamos ao descrito por Kulengowski *et al.* (2018), onde foi encontrado uma maior taxa de morte bacteriana em torno de 8 horas para um isolado de *Enterobacter cloacae* produtor de VIM-1 e sensível a amicacina.

Em contrapartida, os resultados obtidos com a combinação meropenem e gentamicina são animadores. Considerando o *checkerboard* e o ensaio *time-kill*, podemos afirmar que essa combinação foi a mais ativa contra esse isolado, visto que, houve um efeito sinérgico potencializando o efeito de ambos antimicrobianos, o que foi refletido em uma considerável redução da CIM, tanto do meropenem quanto da gentamicina. Além disso, no ensaio *time-kill* foi possível observar uma curva de morte mais rápida, quando comparada a combinação de meropenem com amicacina, com um efeito bactericida após 6h de exposição a essa combinação. Esses resultados também podem ser associados aos resultados observados nos

quadros A e D da figura 3, onde ficou evidente a redução no número de células bacterianas, indicativo do efeito bactericida.

Alterações morfológicas das células bacterianas induzidas pela exposição a sub-CIMs de antimicrobianos também foram observadas por outros pesquisadores em diferentes espécies (WOJNICZ *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2014; VERAS *et al.*, 2015; HAGIYA *et al.*, 2018). Wojnicz *et al.* (2007) relataram que a exposição de isolados Gram-negativos à sub-CIMs de amicacina e ciprofloxacina apresentaram alterações morfológicas como filamentos e células fantasmas. Já Hagiya *et al.* (2018) demonstraram que 0,5 x CIM do meropenem e do cefmetazole era capaz de induzir diferentes alterações morfológicas, nas células de *K. pneumoniae* portadora do gene *bla*_{KPC-2}. Assim como esses relatos, no presente estudo também foram observadas diferentes alterações nas células do isolado de *P. mirabilis*, portador do gene *bla*_{NDM-1}, expostas à sub-CIMs de meropenem, amicacina e gentamicina. Embora as sub-CIMs de antimicrobianos não matem as células bacterianas, essas concentrações ainda são capazes de modificar suas características físico-químicas e arquitetura de sua superfície, interferindo assim em alguns aspectos importantes da função bacteriana, e conseqüentemente reduzindo a sua patogenicidade (WOJNICZ *et al.*, 2007).

De modo geral, a alteração morfológica mais prevalente neste estudo foi o alongamento celular. A filimentação celular é uma alteração comumente observada no formato bacteriano, onde as células aumentam drasticamente de comprimento devido a inibição da divisão celular durante o crescimento (JUSTICE *et al.*, 2008). Vários fatores podem levar a esse fenômeno, na ausência de antimicrobianos ou stress ambiental o alongamento celular pode ocorrer como um mecanismo de proteção contra predação e fagocitose. Entretanto, também podem ocorrer durante a exposição as terapias antimicrobianas (CUSHNIE *et al.*, 2016).

Além disso, no caso da espécie *P. mirabilis* a formação de células alongadas geralmente ocorre em resposta ao contato com superfícies, o que é conhecido como “swarming”. Esse fenômeno é comum entre bactérias móveis e está relacionado a patogênese de infecções bacterianas, com aumento da virulência e produção de enzimas patogênicas (BELAS *et al.*, 2004; AUER *et al.*, 2019). Como o presente estudo foi realizado em caldo CAMHB, provavelmente o super alongamento sofrido pelas células do isolado estudado seja uma resposta a agressão sofrida pela exposição aos antimicrobianos utilizados.

O alongamento celular também pode ocorrer após a inibição ou interrupção da síntese de peptidoglicano. Células tratadas com β -lactâmico, por exemplo, apresentam essa alteração devido à inibição da PBP-3, que reticula o peptidoglicano na parede septal, mas não na parede lateral, resultando no alongamento celular sem divisão (CUSHNIE *et al.*, 2016).

Diferentemente das células ovais encontradas por Horii *et al.* (1998), neste estudo as células de *P. mirabilis* tratadas com meropenem apresentaram aspecto alongado. No caso do meropenem, além da afinidade pela PBP-3 há também uma alta afinidade pela PBP-2 que induz a formação de filamentos ou células ovais, dependendo da concentração do antimicrobiano e do período de exposição (HORII *et al.*, 1998).

Esse fenômeno também pode ocorrer se a síntese de proteínas for inibida, como por exemplo, após o uso de aminoglicosídeos (CUSHNIE *et al.*, 2016). Embora essa classe de antimicrobianos não influenciem diretamente na composição da parede celular, acredita-se que a síntese de certas enzimas envolvidas na formação dessa estrutura se torne prejudicada quando as bactérias crescem nas sub-CIMs desses antibióticos. Assim, os aminoglicosídeos podem influenciar indiretamente essa estrutura bacteriana e conseqüentemente gerar um discreto alongamento das células (WOJNICZ *et al.*, 2007). No presente estudo, assim como observado em outro estudo realizado com um isolado de *Serratia marcescens* (dados não publicados). O alongamento celular observado nas células tratadas com os aminoglicosídeos apresentou um aumento expressivo, o que poderia ser explicado pela duração da exposição das células a esses antimicrobianos (KLAINER; PERKINS, 1972; CUSHNIE *et al.*, 2016).

Outra alteração observada após a exposição das células a amicacina, por exemplo, foi a formação de cavidades na superfície. Esse fenômeno indica que houve um aumento da permeabilidade celular devido à ruptura da membrana externa bacteriana (**figura 5-F**), o que pode gerar o vazamento de material citoplasmático (**figura 5-D**). Isso pode ser explicado pelo fato do aminoglicosídeo permeabilizar a membrana externa das bactérias Gram-negativas favorecendo, por exemplo, a penetração do meropenem e sua ligação as PBPs (SHARMA *et al.*, 2017; ZAVASKI *et al.*, 2017). A perda do material citoplasmático também foi responsável por células conhecidas como “fantasmas” observadas pela MET, tal fenômeno já foi descrito tanto após a exposição aos β -lactâmicos quanto a gentamicina (CUSHNIE *et al.*, 2016).

A perda do material citoplasmático pode explicar outra alteração ultraestrutural observada neste estudo, a redução no número de ribossomos. Essa alteração já foi descrita por outro estudo em *P. mirabilis* (LORIAN; SABATH; SIMIONESCU, 1975) e tem sido observada, principalmente, quando as bactérias são tratadas com inibidores de proteínas, como amicacina e gentamicina, além de inibidores da síntese de peptidoglicano (CUSHNIE *et al.*, 2016). Lorian e Atkinson (1975) ainda associaram a diminuição no número de ribossomos as diversas alterações morfológicas encontradas nas células tratadas com penicilinas e aminoglicosídeos.

Com relação às combinações usadas neste estudo, os resultados foram bastantes distintos. A combinação de meropenem com gentamicina resultaram em células sem morfologia definida, ao contrário da combinação de meropenem com amicacina, que resultou em células super alongadas e com certa perda de rigidez da parede celular, como observado por AUER *et al.* (2019). Na MET também é possível observar que a combinação meropenem e gentamicina apresentou ruptura da célula bacteriana indicando atividade bactericida. Além disso, é possível descrever a presença de OMVs, muito encontradas em *Pseudomonas aeruginosa* (KADURUGAMUWA; BEVERIDGE, 1995; SIQUEIRA *et al.*, 2014). Essas vesículas são descarregadas da parede celular durante o crescimento de bactérias gram-negativas e desempenham um papel importante na virulência bacteriana, transportando enzimas e outros fatores de virulência para a célula hospedeira, também estão envolvidas nas respostas ao estresse, que envolvem a formação de biofilme, entrega de moléculas entre e intra-espécies, resistência a antibióticos e modulação da resposta imune do hospedeiro (BEVERIDGE, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2014; JAN, 2017).

No presente estudo, as alterações morfológicas e ultraestruturais observadas nas células tratadas com as combinações não demonstraram um somatório dos efeitos obtidos com a monoterapia, como observado por Siqueira *et al.* (2014) e Sharma *et al.* (2016). Por exemplo, foi observado que o meropenem associado à gentamicina não causou o alongamento celular, comum nas células expostas aos antimicrobianos utilizados isoladamente, e sim alterações mais intensas com perda da morfologia característica dessa espécie. Waisbren *et al.* (1980) sugerem que ocorrem alterações adicionais nas bactérias expostas a combinações de antimicrobianos do que naquelas expostas a antimicrobianos isoladamente, devido ao fato de que essas bactérias foram privadas de algum mecanismo de proteção quando expostas a combinações sinérgicas, o que pode ser um indicativo da eficácia da terapia combinada.

Através desse estudo pode-se concluir que o meropenem associado com a gentamicina foi a melhor combinação contra o isolado clínico de *P. mirabilis* MDR (P3R3) e portador dos genes *bla_{NDM}*, *aac(6)-Ib*, *aph(3)-VI*, *ant(2)-Ia*, com a eliminação da população bacteriana após 6h de exposição a essa combinação. Considerando as limitações de antibioticoterapia para as infecções causadas por *P. mirabilis*, o uso em combinação de antimicrobianos já conhecidos, como utilizados nesse estudo, representa uma alternativa contra a ameaça das infecções causadas por essas bactérias.

Figura 1 - *Time kill* do isolado de *Proteus mirabilis* (P3R3) sob ação de meropenem (MEM), amicacina (AMI) e gentamicina (GEN) isoladamente e em combinação.

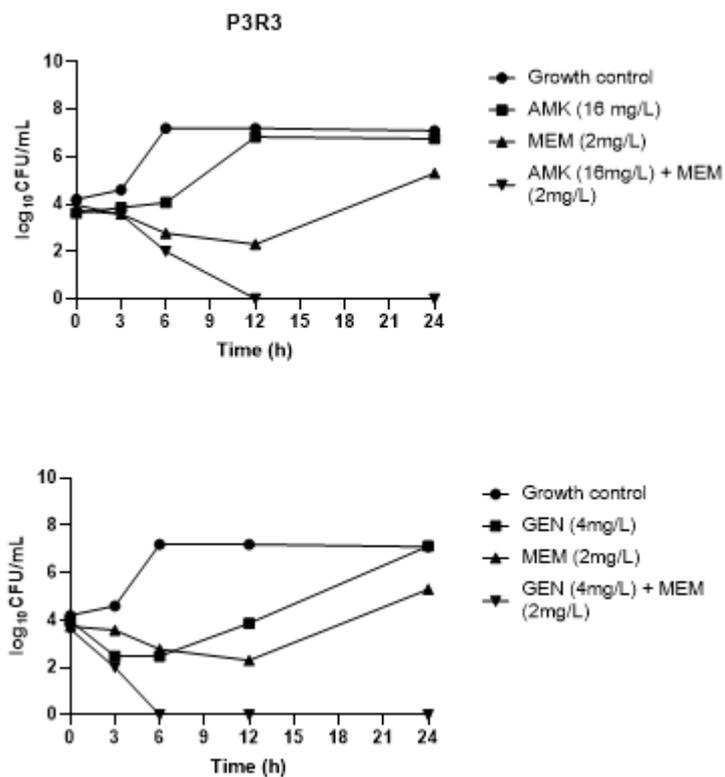
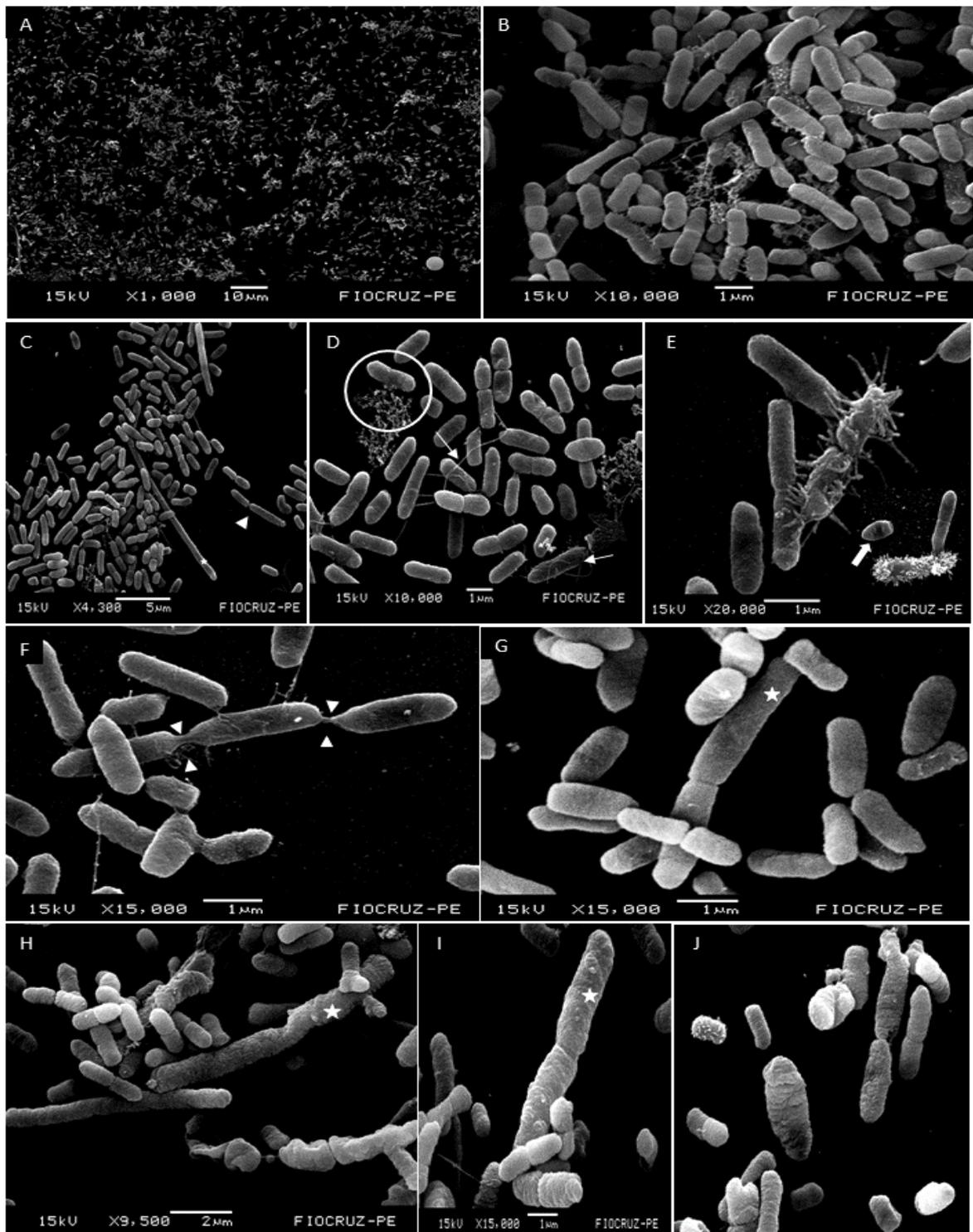


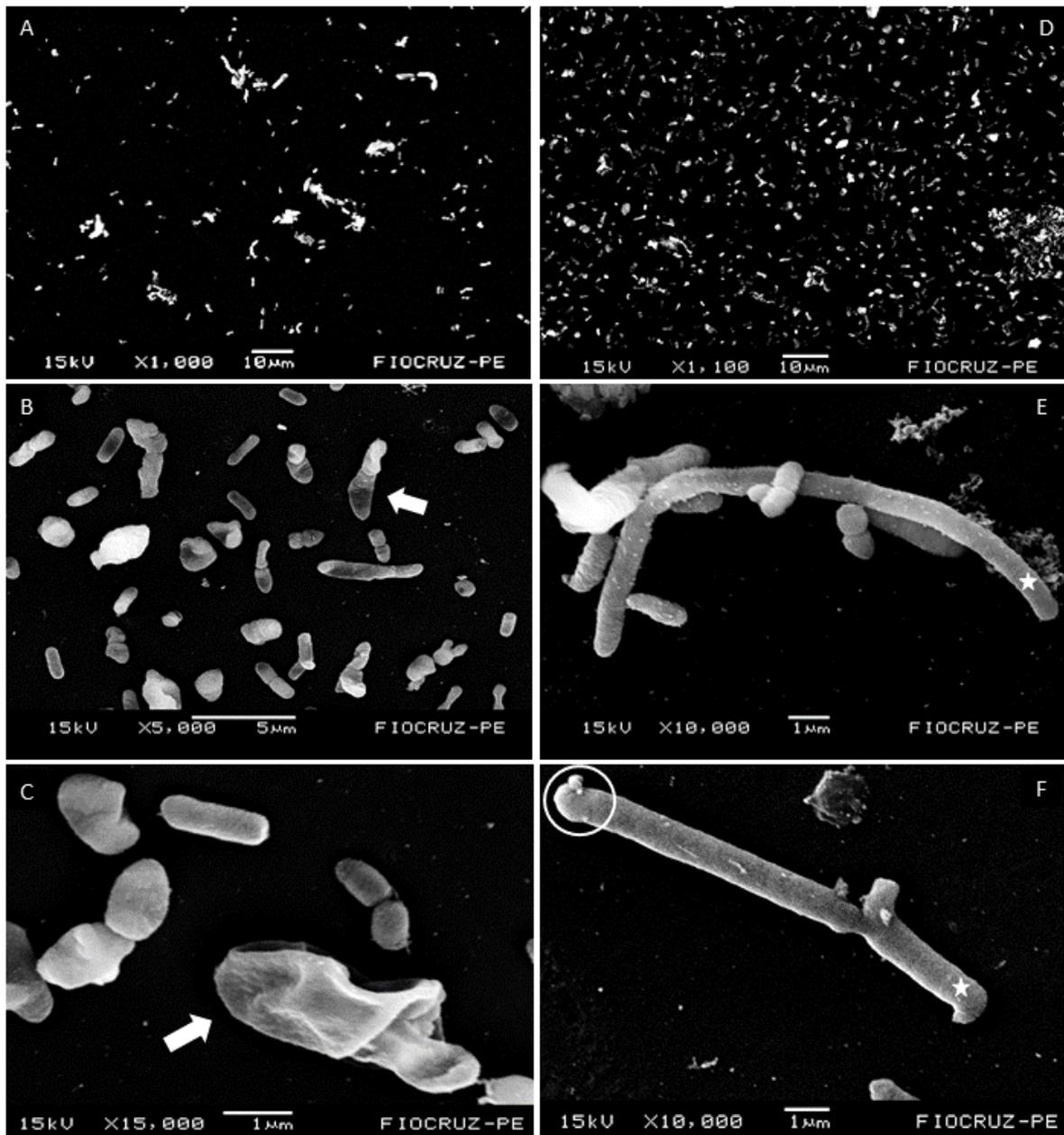
Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura do isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente



(A-B) Controle (sem antimicrobiano). Células com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência de formação de septos e divisão celular normal; (C-E) Células tratadas com concentrações subinibitórias de ampicacina (0,5 mg/L), (F-G) gentamicina (0,5 mg/L) e (H-J) meropenem (1 mg/L). Estrelas: indicam presença de alongamento celular. Setas: mostram a

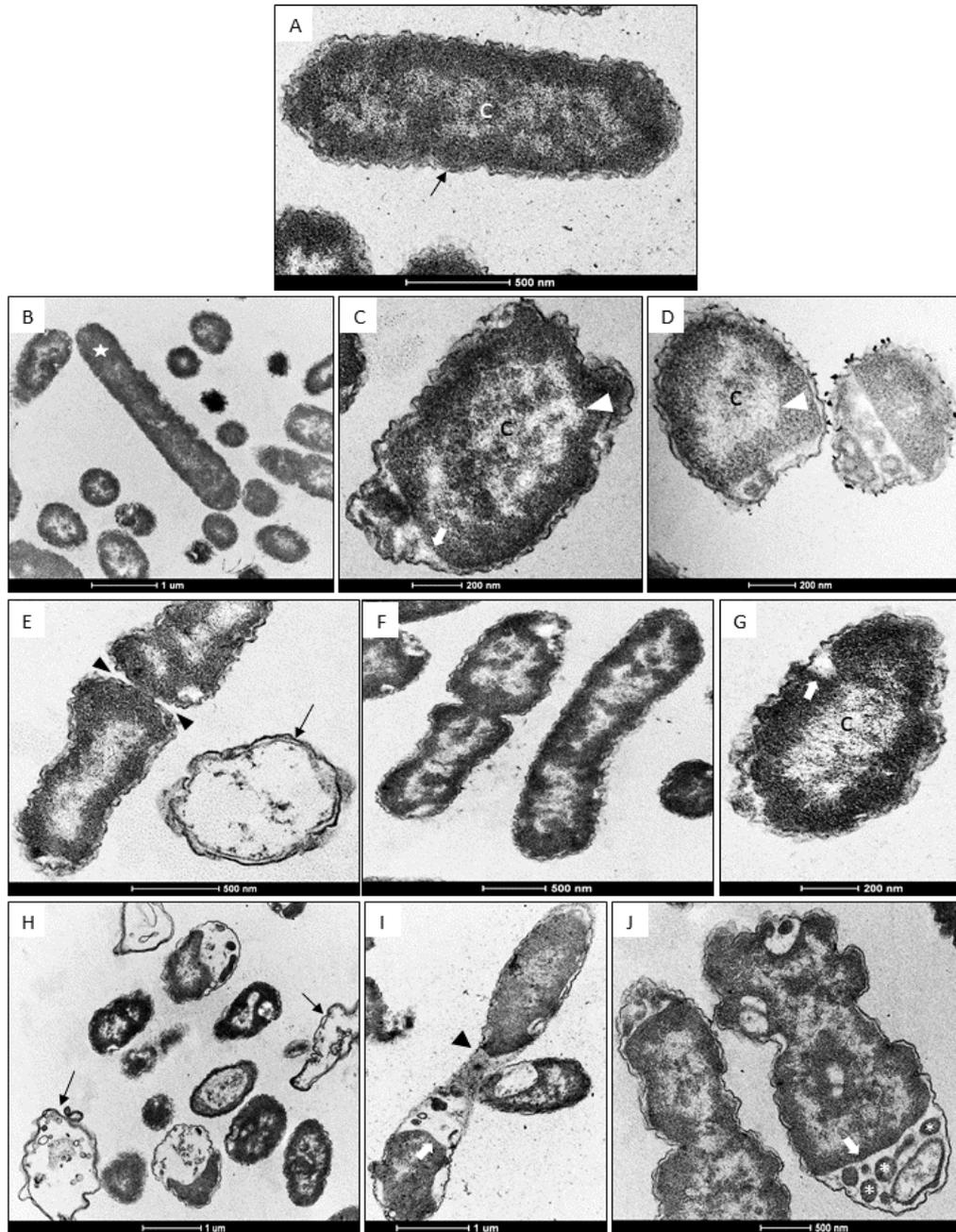
presença de flagelos. Pontas de seta: indicam septos irregulares e divisão celular incompleta. Setas grossas: indicam formação de pits. Círculo: indica ruptura da célula bacteriana com extravasamento de material citoplasmático. Nos quadros H-J é possível observar o enrugamento da superfície bacteriana.

Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura das combinações usadas contra do isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente.



(A-C) Células tratadas com a combinação de meropenem (1 mg/L) + gentamicina (0,5 mg/L). (D-F) Células tratadas com a combinação de meropenem (1 mg/L) + ampicacina(0,5 mg/L). Nos quadros B e C observa-se células sem morfologia definida e a formação de cavidades caracterizando a perda de material sem ruptura da membrana (seta branca) . Estrelas indicam alongamento celular. No quadro E é possível observar uma célula apresentando curvatura podendo indicar a perda da rigidez da parede celular e no quadro F o círculo indica uma protuberância.

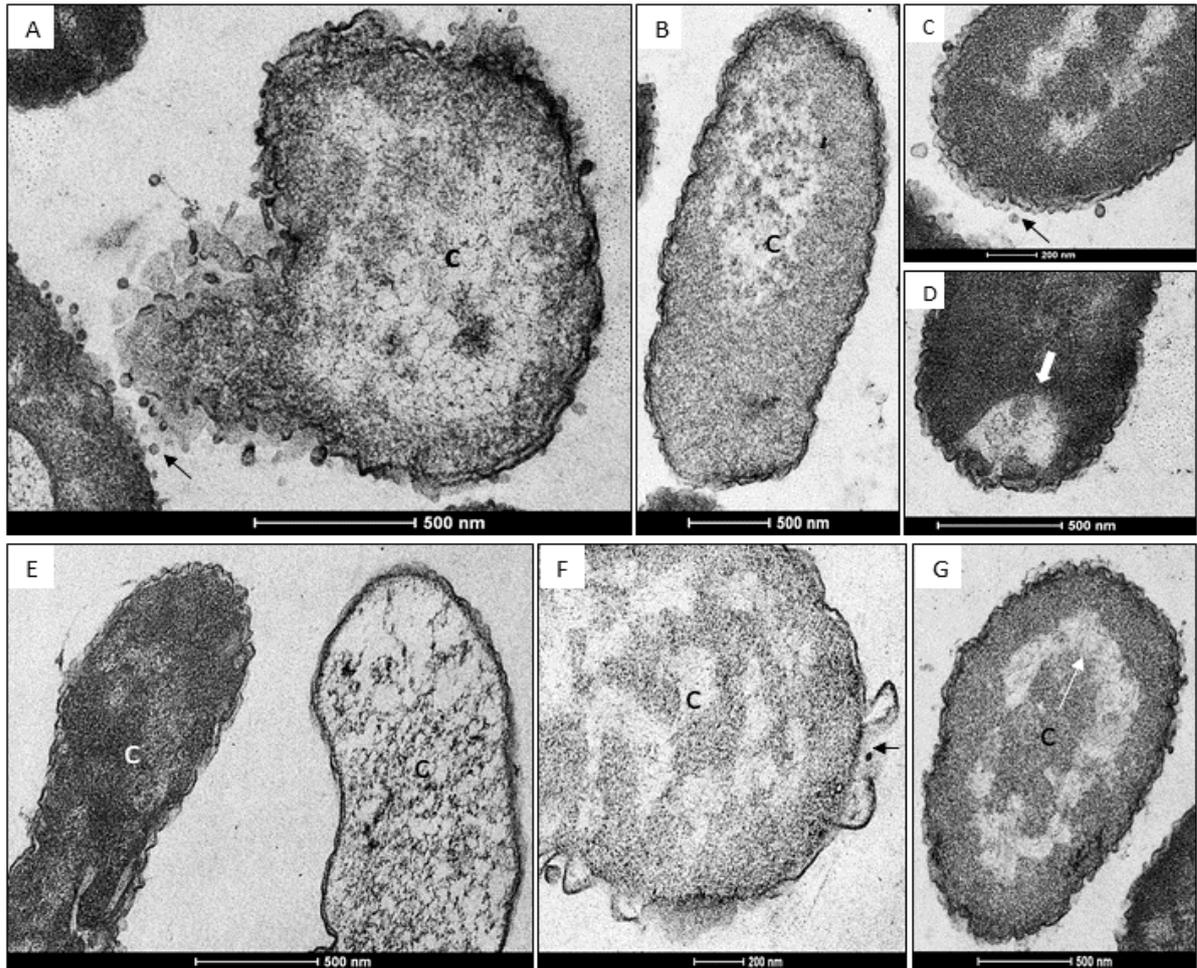
Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão do isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente.



(A) célula bacteriana sem tratamento (controle) - morfologia preservada, membrana citoplasmática, parede celular (setas pretas), e citoplasma (c) intactos. (B-D) Células expostas à amicacina (0,5 mg/L), observa-se a presença de células alongadas (estrela), separação das camadas do envoltório celular (seta branca), espaços eletrón-lucentes indicativos de perda de material citoplasmático (ponta de seta branca). (E-G) Células tratadas com gentamicina (0,5 mg/L) e (H-J) Células tratadas com meropenem (1 mg/L). Presença de divisão incompleta

(pontas de seta), células “fantasmas” (seta preta), espaços elétron-lucentes e retração citoplasmática (seta branca), agregados eletrodensos (asteriscos).

Figura 5 - Micrografia eletrônica de transmissão das combinações utilizadas no isolado clínico de *Proteus mirabilis* (P3R3) multidroga-resistente.



(A-D) Células expostas à combinação de meropenem e gentamicina. (c) Conteúdo citoplasmático. Nos quadros A e C, as setas indicam vesículas de membrana externa, observa-se também a ruptura da célula bacteriana com extravasamento do material citoplasmático e paredes com aspecto plissado. No quadro D a seta branca indica retração do citoplasma (E-G) células expostas ao meropenem e a amicacina apresentando parede celular com aspecto plissado e intensa perda de material citoplasmático, ribossomos (E), além de ruptura da parede celular indicada pela seta (F). No quadro G ainda é possível observar a condensação da cromatina indicado pela seta branca.

Referências

1. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*. 2018;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017
2. Qin S, Qi H, Zhang Q, *et al.* Emergence of Extensively Drug-Resistant *Proteus mirabilis* Harboring a Conjugative NDM-1 Plasmid and a Novel Salmonella Genomic Island 1 Variant, SGI1-Z. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6601–6604. doi:10.1128/AAC.00292-15
3. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12): p. 5046-5054 DOI: 10.1128/AAC.00774-09
4. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):151–171. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003
5. Siqueira, V. L., Cardoso, R. F., Caleffi-Ferracioli, K. R., Scodro, R. B., Fernandez, M. A., Fiorini, A., *et al.* Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(7), 3957–3967. DOI:10.1128/AAC.02584-13
6. Schmid A, Wolfensberger A, Nemeth J, Schreiber PW, Sax H, Kuster SP. Monotherapy versus combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative infections: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2019;9(1):15290. Published 2019 Oct 29. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51711-x>
7. Firmo EF, Beltrão EM, Silva FR, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, *et al.* Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Global Antimicrob Resis*. 2019; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>
8. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement M100-S28. [Online]. Wayne, PA.; 2018.
9. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1.

10. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution method in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM; p. 1–28, 2004. DOI:10.1128/9781555818814.ch5.16
11. Wentao, N., Guobao, L., Jin, Z., Junchang, C., Rui, W., Zhancheng, G., & Youning, L. In vitro activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *The Journal of Antibiotics*, 71(5), 506–513, 2018. DOI:10.1038/s41429-017-0024-9
12. CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
13. Veras DL, Lopes AC, da Silva GV, Goncalves GG, de Freitas CF, de Lima FC, Maciel MA, Feitosa AP, Alves LC, Brayner FA. Ultrastructural Changes in Clinical and Microbiota Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Carriers of Genes bla SHV, bla TEM, bla CTX-M, or bla KPC When Subject to beta-Lactam Antibiotics. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:57212. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/572128>
14. Alves PH, Boff RT, Barth AL, Martins AF. Synergy of Polymyxin B, Tigecycline and Meropenem against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolates. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.011>
15. Bland, C. M., Pai, M. P., & Lodise, T. P. (2018). Reappraisal of Contemporary Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles for Informing Aminoglycoside Dosing. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. doi:10.1002/phar.2193
16. Kulengowski, B., Clark, J. A., & Burgess, D. S. (2018). Killing activity of meropenem in combination with amikacin against VIM- or KPC-producing Enterobacteriaceae that are susceptible, intermediate, or resistant to amikacin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.020
17. Wojnicz, D., Kłak, M., Adamski, R., & Jankowski, S. Influence of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on morphology and adherence ability of uropathogenic strains. *Folia Microbiologica*. 2007; 52(4), 429–436. doi:10.1007/bf02932099
18. Hagiya, H., Aoki, K., Akeda, Y., *et al.* In vitro effectiveness of meropenem and cefmetazole combination treatment against KPC-2-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist*. v. 25, n. 6, p. 839–45, 2019.

19. Sharma R, Patel S, Abboud C, *et al.* Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(2):224–232. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.10.025
20. Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., & Hultgren, S. J. (2008). *Morphological plasticity as a bacterial survival strategy*. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 162–168. doi:10.1038/nrmicro1820
21. Belas, R., Manos, J. & Suvanasuthi, R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 72, 5159–5167 (2004).
22. Auer GK, Oliver PM, Rajendram M, *et al.* Bacterial Swarming Reduces *Proteus mirabilis* and *Vibrio parahaemolyticus* Cell Stiffness and Increases β -Lactam Susceptibility. *mBio*. 2019;10(5):e00210-19. Published 2019 Oct 8. doi:10.1128/mBio.00210-19
23. Cushnie TP, O’Driscoll NH, Lamb AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73 (23): 4471. DOI 10.1007/s00018-016-2302-2.
24. Klainer AS, Perkins RL. Surface manifestations of antibiotic-induced alterations in protein synthesis in bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972; 1:164–170.
25. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017; 15:519–26 DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1316193>
26. Lorian, V., Sabath, L. D., & Simionescu, M. (1975). *Decrease in Ribosomal Density of Proteus mirabilis Exposed to Subinhibitory Concentrations of Ampicillin or Cephalothin*. *Experimental Biology and Medicine*, 149(3), 731–735. doi:10.3181/00379727-149-38888
27. Lorian, V., & Atkinson, B. Abnormal Forms of Bacteria Produced by Antibiotics. *American Journal of Clinical Pathology*, 1975; 64(5), 678–688. doi:10.1093/ajcp/64.5.678
28. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol.* 1995;177(14):3998–4008. doi:10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995

29. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1999;181(16):4725–4733.
30. Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front Microbiol.* 2017;8:1053. Published 2017 Jun 9. doi:10.3389/fmicb.2017.01053.

5.4 ARTIGO 4 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM UM ISOLADO CLÍNICO DE *SERRATIA MARCESCENS* PORTADORA DOS GENES *BLA_{NDM-1}* E *BLA_{KPC-2}* E EXPOSTA A COMBINAÇÕES DE MEROPENEM-GENTAMICINA E MEROPENEM-AMICACINA

1 Introdução

Serratia marcescens é um importante patógeno associado a infecções graves e surtos, principalmente devido à resistência intrínseca à polimixinas e a aquisição de genes de resistência, como *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (Phan *et al.*, 2018; Firmo *et al.*, 2019). Além disso, a alta taxa de morbimortalidade e a escassez de novos agentes antimicrobianos destacam a necessidade de investigação de abordagens eficazes para o tratamento de infecções causadas por *S. marcescens*.

O uso extensivo de carbapenêmicos resultou no surgimento de enzimas, conhecidas como carbapenemases, que hidrolisam eficientemente quase todos β -lactâmicos. As carbapenemases KPC-2, NDM-1 e OXA-48, em particular, tornaram-se fontes generalizadas de resistência, principalmente ao meropenem, e estão associadas a altas taxas de falência terapêutica (van Duin; Doi, 2017).

Com o aumento da resistência ao meropenem, os aminoglicosídeos se tornaram uma das opções de escolha para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases e resistentes às polimixinas, visto que muitas vezes um aminoglicosídeo pode ser o único antimicrobiano ao qual esses isolados mostram suscetibilidade *in vitro* (Zavaski *et al.*, 2017). Porém, devido à menor eficácia clínica quando os aminoglicosídeos são prescritos como monoterapia, a terapia combinada tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana (Schmid *et al.*, 2019).

Raros estudos *in vitro* investigaram o sinergismo de combinações utilizando aminoglicosídeos (Tang *et al.*, 2016; Kulengowski *et al.*, 2018; Wentao *et al.*, 2018), principalmente quando se trata da espécie *S. marcescens* produtora de carbapenemases. Além disso, nenhum estudo analisou as alterações induzidas por aminoglicosídeos utilizados isoladamente ou em combinação com o meropenem na estrutura celular de *S. marcescens*.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar *in vitro* a atividade sinérgica e bactericida das combinações de amicacina e gentamicina com meropenem, além disso identificar alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por essas combinações em um isolado de MDR de *S. marcescens* portador dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*.

2 Material e Métodos

2.1 Isolado Bacteriano

Para este estudo, foi selecionado um isolado clínico de *S. marcescens* proveniente do sangue de um paciente de um hospital particular de Recife, PE, Brasil. O isolado S9U foi selecionado devido ao seu perfil de suscetibilidade e a presença dos genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1}, *aac*(3) -IIa e *aac*(6) -Ib (Firmo *et al.*, 2019), mostrando resistência ao meropenem (MEM) e a amicacina (AMI) e suscetibilidade à gentamicina (GEN), apresentando CIMs 128, 64 e 2mg/L, respectivamente. Segundo os critérios interpretativos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

2.2 Checkerboard

As combinações foram avaliadas em ensaios *checkerboard* em microplacas com caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CAMHB). Ambos os antimicrobianos foram testados sozinhos e combinados em concentrações duas vezes maiores do que as CIM dos isolados testados sozinhos. A concentração final de inóculo do isolado S9-U foi de aproximadamente 10⁵ UFC/ml, e as placas foram incubadas a 37 °C por 18-20 h. Os testes foram realizados em triplicata. Foram calculados índices de concentrações inibitórias fracionárias (FICIs), sinergia foi definida como $FICI \leq 0,5$, nenhuma interação foi definida como $FICI > 0,5$ e ≤ 4 , e antagonismo foi definido como $FICI > 4$ (Odds, 2003; Moody, 2004).

2.3 Time-kill

AMI e GEN foram testadas em concentrações de 0,25 X CIM. A concentração de MEM utilizada foi de 2 mg/L. Todos os ensaios incluíram um controle de crescimento sem antimicrobiano. O inóculo final utilizado foi de 10⁵ UFC/ml preparado em CAMHB. Foram retiradas amostras de cada uma das concentrações de bactérias/fármaco às 0, 3, 6, 12 e 24 h a partir do momento da adição do antimicrobiano. Alíquotas foram semeadas em placas com ágar Mueller-Hinton (Kasvi). As contagens bacterianas (expressas em log₁₀ UFC/mL) foram realizadas após a incubação a 37 °C de 18 a 24 h. Em cada intervalo de tempo, o valor log₁₀ da contagem de colônias viáveis foi determinado. Todos os experimentos foram realizadas em triplicata (Wentao *et al.*, 2018).

A atividade bactericida foi definida como uma diminuição >3 log₁₀ CFU/mL na contagem de colônias, às 24 horas, em relação ao inóculo inicial. O recrescimento foi definido

como um aumento na contagem de colônias em relação a um ponto anterior. O sinergismo foi definido como uma contagem de colônias $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL em 24 horas em comparação com o agente mais ativo isolado. A indiferença foi definida como uma alteração na contagem de colônias às 24 horas em $2 \log_{10}$ UFC/mL em comparação com o agente mais ativo isoladamente. O antagonismo foi definido como um aumento de $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL na contagem de colônias às 24 horas em comparação com o agente mais ativo isolado (CLSI, 1999).

2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células S9U foram expostas aos agentes antimicrobianos usando concentrações de acordo com os resultados obtidos no *checkerboard*. Após 8 h de crescimento, as células bacterianas foram cuidadosamente centrifugadas e fixadas por 2h a 4 °C em solução contendo glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% (Electron Microscopy Science), seguida de desidratação gradual com etanol (SigmaAldrich). Após a desidratação, o material foi seco através do ponto crítico, metalizado e visualizado através do microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600 LV).

2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As células do isolado S9U foram expostas a agentes antimicrobianos usando as concentrações e os critérios descritos anteriormente. Em todos os processos, um controle para o isolado foi incluído nas mesmas condições e nas mesmas diluições, sem a presença do antimicrobiano. Após o crescimento, as células bacterianas foram centrifugadas e fixadas nas mesmas condições descritas para o ensaio de MEV. As células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% e logo em seguida contrastadas em acetato de uranila a 5% por 12h (Electron Microscopy Science). Após esse tempo, as amostras foram desidratadas em série gradual de acetona (Sigma-Aldrich), infiltradas e emblocadas em resina epon 812 (Electron Microscopy Science) a 60°C por 72h. Cortes ultrafinos foram corados com uranila a 5% e citrato de chumbo e visualizados através do microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai™ Spirit G2 BioTWIN).

3 Resultado

O ensaio *checkerboard* mostrou que a combinação de meropenem e gentamicina apresentam sinergismo (FICI=0,26), com redução bastante significativa da CIM do meropenem (variou de 128 mg/L a 2 mg/L, quando combinado com 0,5 mg/L de gentamicina), entretanto a combinação meropenem e amicacina não apresentou interação (FICI=0,62). Os resultados dos ensaios de *time-kill* corroboraram os resultados obtidos no *checkerboard* e mostraram uma diminuição $\geq 2\text{-log}_{10}$ nas contagens viáveis apenas na combinação de meropenem e gentamicina indicando sinergismo, entretanto não foi observada atividade bactericida em nenhuma das combinações.

A microscopia eletrônica de varredura indicou que as células do isolado S9U usadas como controle, sem exposição ao tratamento, apresentaram uma morfologia bem conservada, em forma de bastonete e comprimento médio de 1 a 3 μm , com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal (**Figura 1A-B**). Embora o isolado S9U tenha apresentado resistência à amicacina e seja carreador dos genes *aac(3)-IIa* e *aac(6)-Ib*, quando as células foram submetidas à amicacina e gentamicina foi possível observar como principal alteração morfológica o alongamento celular, além disso a formação de cavidades e o rompimento celular com extravasamento de material citoplasmático foi identificado quando as células foram expostas a gentamicina (**Figura 1C-D**). As células tratadas com meropenem se mostraram em sua maioria ovais, raras células alongadas e algumas sem morfologia definida, além da presença de cavidades e aparência enrugada da superfície. Também é possível observar a formação irregular dos septos e a divisão celular incompleta, principalmente nas células tratadas com 8 mg/L de meropenem (**Figura 1E-F**). As alterações causadas pela combinação meropenem e amicacina são predominantemente as alterações observadas quando as células foram tratadas apenas com meropenem (8 mg/L), com a presença de raras células alongadas. Além disso o número de células bacterianas observadas também reflete a ausência de sinergismo da combinação. Do mesmo modo, ficou evidente, como mostra a **figura 1 (G-H)**, que a combinação sinérgica de meropenem com gentamicina causou uma maior diminuição no número de células bacterianas. Também é possível observar raras células ovais ou sem morfologia definida, superfície rugosa, com ruptura da membrana e extravasamento do material citoplasmático indicativo de morte celular.

A microscopia eletrônica de transmissão foi usada para avaliar as alterações internas e na parede das células do isolado S9U tratadas com meropenem, amicacina, gentamicina e combinações. Nas células controle foi possível observar a preservação da morfologia, manutenção da integridade da parede celular, conteúdo citoplasmático eletrodenso, presença de ribossomos e material genético distribuído no citoplasma bacteriano (**Figura 2A**). A exposição

à amicacina permitiu a identificação de células alongadas, com presença de vacúolos intracelulares e retração citoplasmática com separação das camadas do envoltório celular (**Figura 2B-C**). Células expostas à gentamicina apresentaram grandes espaços elétron-lucentes no citoplasma bacteriano com diminuição do material citoplasmático, formação de agregados intracelulares eletrodensos, septos irregulares e células alongadas (**Figura 2D-F**). Apesar de altamente resistente ao meropenem e ser portador dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} as células quando tratadas com meropenem apresentaram alterações ultraestruturais intensas, como retração citoplasmática com separação das camadas do envoltório celular, formação de agregados intracelulares eletrodensos, grandes espaços elétron-lucentes, células disformes e divisão irregular (**Figura 2G-L**). Embora a combinação meropenem e amicacina para esse isolado não apresentar sinergismo, foi possível observar pela MET que as células apresentaram características semelhantes quando foram expostas ao meropenem isoladamente, porém menos intensas (**Figura 3A-C**). Já na combinação sinérgica de meropenem e gentamicina foi observado um somatório das alterações observadas utilizando esses antimicrobianos isoladamente, porém com danos mais intensos.

4 Discussão

O uso de combinações de antimicrobianos tem sido uma estratégia para controlar clinicamente as infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases (Schmid *et al.*, 2019). No entanto, o mecanismo de ação dos antimicrobianos em combinação tem sido pouco investigado. A literatura sugere que o aminoglicosídeo permeabiliza a membrana externa de bactérias gram-negativas, favorecendo a penetração no local alvo do antibiótico usado em combinação. Para isso, é importante que um dos antimicrobianos utilizados apresente suscetibilidade *in vitro* (Zavaski *et al.*, 2017). Esse fato pode explicar os resultados obtidos no presente estudo, onde observou-se importante sinergismo da combinação de meropenem com gentamicina contra *S. marcescens*, porém o mesmo não foi observado entre amicacina e meropenem.

A atividade sinérgica entre meropenem e outros antimicrobianos tem sido relatadas, tanto por *checkerboard* quanto por *time-kill* frente a diversos microrganismos, entretanto *Enterobacterales* produtoras de KPC são as mais comumente avaliadas (Alves *et al.*, 2018; Kulengowski *et al.*, 2018). A descoberta de sinergismo contra isolados de *S. marcescens* resistentes aos carbapenêmicos e portadores dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} devem ser destacadas, uma vez que esses isolados são extremamente difíceis de tratar. Porém, poucos estudos

avaliaram esse problema no cenário clínico e experimental. Chibabhai *et al.* (2017) relataram um caso de uma infecção da corrente sanguínea, causada por uma *S. marcescens* produtora de NDM, que foi tratada com sucesso com uma combinação de meropenem e amicacina. Enquanto, Barth *et al.* (2015) demonstraram *in vitro* que a combinação de meropenem e polimixina B além de sinérgica foi bactericida, apesar dessa espécie ser intrinsecamente resistente as polimixinas. Esses achados destacam a importância do meropenem fazer parte da combinação usada para tratar infecções causadas por *S. marcescens*, assim como foi observado no nosso estudo.

Este é o primeiro estudo sobre as alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pelo meropenem, amicacina e gentamicina sozinhos e em combinação frente a um isolado multirresistente de *S. marcescens* carregando os genes *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}*, *aac(3)-IIa* e *aac(6)-Ib*. Geralmente inibidores da síntese de proteínas, como amicacina e gentamicina, causam um discreto alongamento celular quando comparados com os inibidores de peptidoglicano. Porém, no presente estudo, o alongamento celular observado nas células tratadas com os aminoglicosídeos apresentou um aumento expressivo, o que pode ser explicado pela duração da exposição das células a esses antimicrobianos, visto que foram utilizadas concentrações subinibitórias (KLAINER; PERKINS, 1972; CUSHNIE *et al.*, 2016).

A nível ultraestrutural as alterações encontradas condizem ao que já foi relatado na literatura para os inibidores da síntese de proteínas como é o caso dos aminoglicosídeos (CUSHNIE *et al.*, 2016). Vale destacar, que nossos resultados também mostraram que apesar de resistente à amicacina, quando submetido a concentrações subinibitórias desse antimicrobiano as células sofreram alterações morfológicas e ultraestruturais semelhante as obtidas quando foram expostas à gentamicina, a qual o isolado apresenta susceptibilidade. Esses dados estão de acordo com os descritos por Veras *et al.* (2015) e Scavuzzi *et al.* (2016) que sugerem que isolados MDR não são capazes de evitar completamente a interação entre os antimicrobianos com seu alvo, e conseqüentemente sofrem alterações estruturais decorrente da ação desses antimicrobianos.

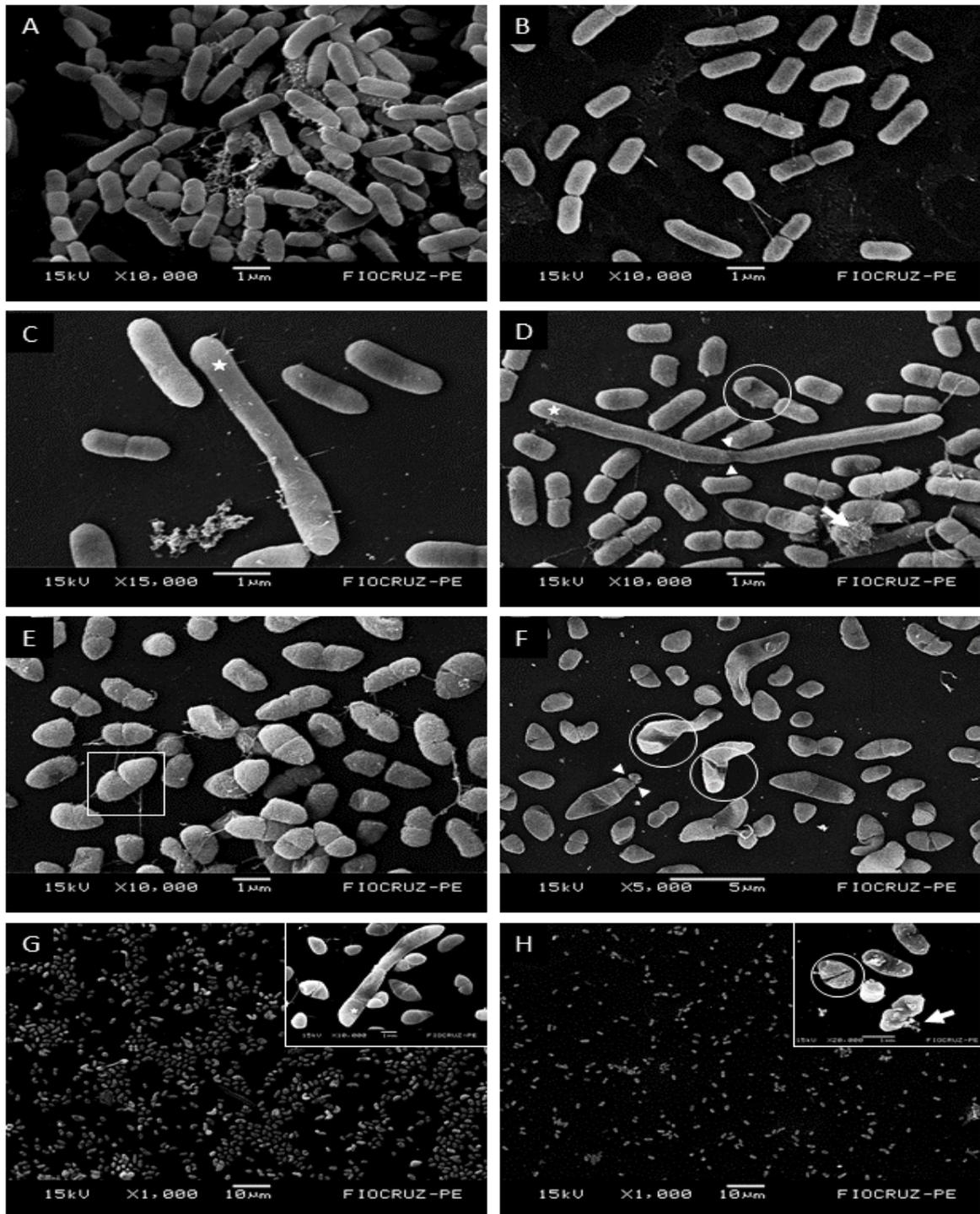
De maneira análoga, também foi observada uma atividade residual do meropenem, visto que, apesar de apresentar uma alta resistência a esse antimicrobiano as células sofreram alterações características de inibidores de peptidoglicano. A formação de células ovais induzida por β -lactâmicos foi relatada, não apenas em *E. coli* e *P. aeruginosa*, mas em muitas espécies de bactérias gram-negativas, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *S. marcescens* (HORII *et al.*, 1998). Como o meropenem tem alta afinidade pelas PBP-2 e PBP-3 (proteínas de ligação a penicilinas) é comum que células expostas a esse

antimicrobiano apresente formas alongadas e ovais, dependendo da concentração de antibióticos e do período de exposição (CUSHNIE *et al.*, 2016).

Assim como Siqueira *et al.* (2014) e Sharma *et al.* (2016), as alterações morfológicas e estruturais observadas nas células tratadas com as combinações sinérgicas mostraram um somatório dos efeitos observados quando em comparação com as células expostas apenas aos antimicrobianos isolados. Já as células expostas à combinação não sinérgica parecem refletir o mecanismo de ação apenas do meropenem, o que sugere a não interação desses fármacos contra este isolado.

Devido à escassez de antimicrobianos eficazes contra a produção de NDM, a combinação de antibióticos tem sido uma estratégia para prevenir o desenvolvimento da resistência. Neste estudo, foi demonstrado a atividade sinérgica da combinação de meropenem e gentamicina contra um isolado de *S. marcescens* portador dos genes *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*, *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. Apesar de não haver atividade bactericida, houve uma redução significativa da CIM do meropenem. O que se refletiu em danos mais extensos causados na célula bacteriana, o que pode sugerir que essa combinação é capaz de interferir em aspectos importantes da função bacteriana, e conseqüentemente reduzir a sua patogenicidade e a sua multiplicação.

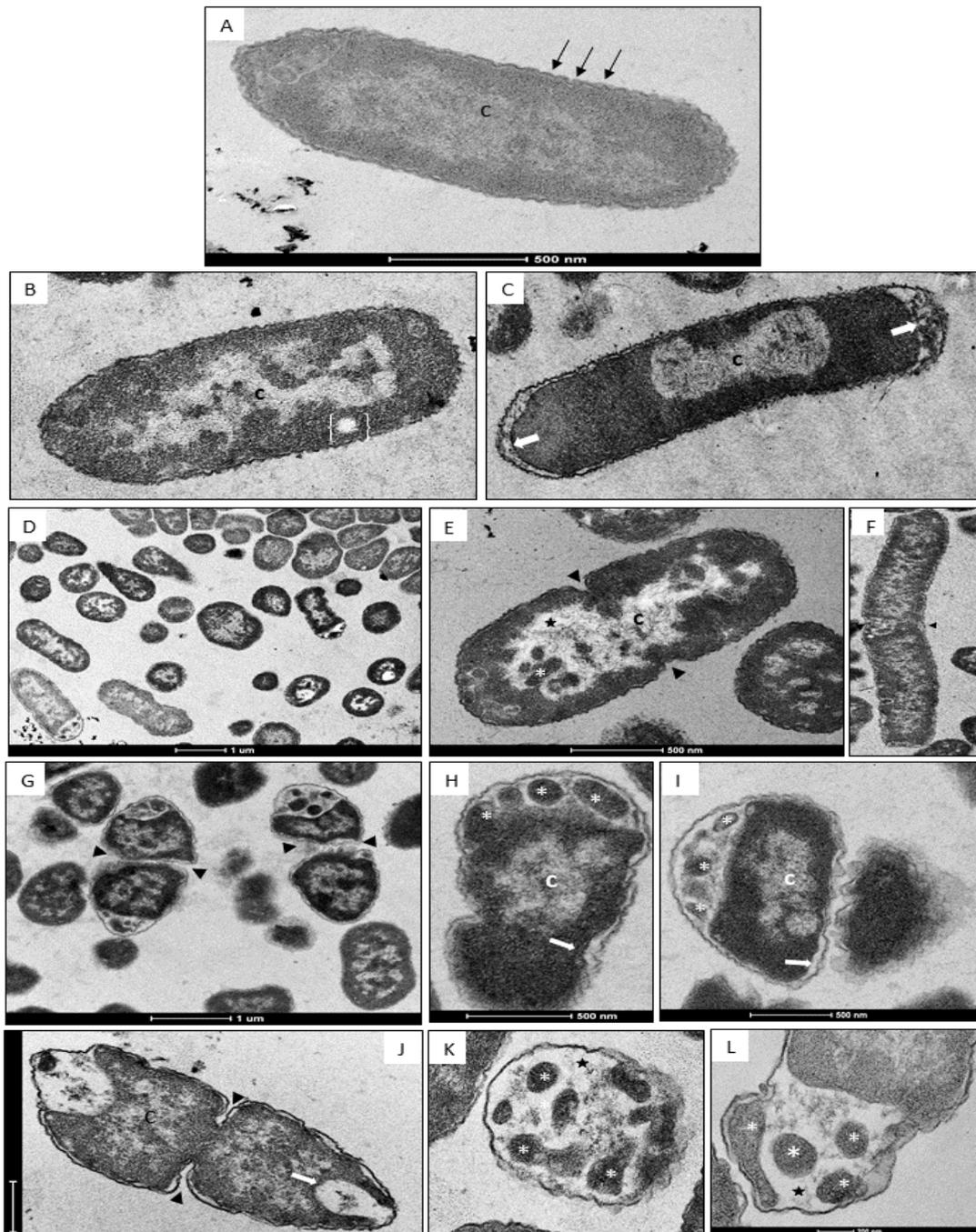
Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura do isolado clínico de *Serratia marcescens* (S9U) multidroga-resistente.



(A-B) Células com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal; Células tratadas com concentrações subinibitórias de (C) amicacina (16 mg/L), é possível observar o predomínio de células alongadas (estrela); (D) gentamicina (0,5 mg/L), além de alongamento celular (estrela) com septos irregulares (ponta de seta), observa-se a presença de cavidades indicativo de alteração da permeabilidade da membrana externa e

presença de ruptura celular (setas); (E-F) meropenem (1 and 8 mg/L, respectivamente), perda da morfologia bacteriana e aparência oval (quadrado). (G) combinação meropenem + amicacina, predomínio de células com aparência oval; e (H) combinação meropenem + gentamicina, observa-se a presença de células com aparência predominantemente oval com presença de cavidades e indícios de ruptura com extravasamento do material citoplasmático (seta)

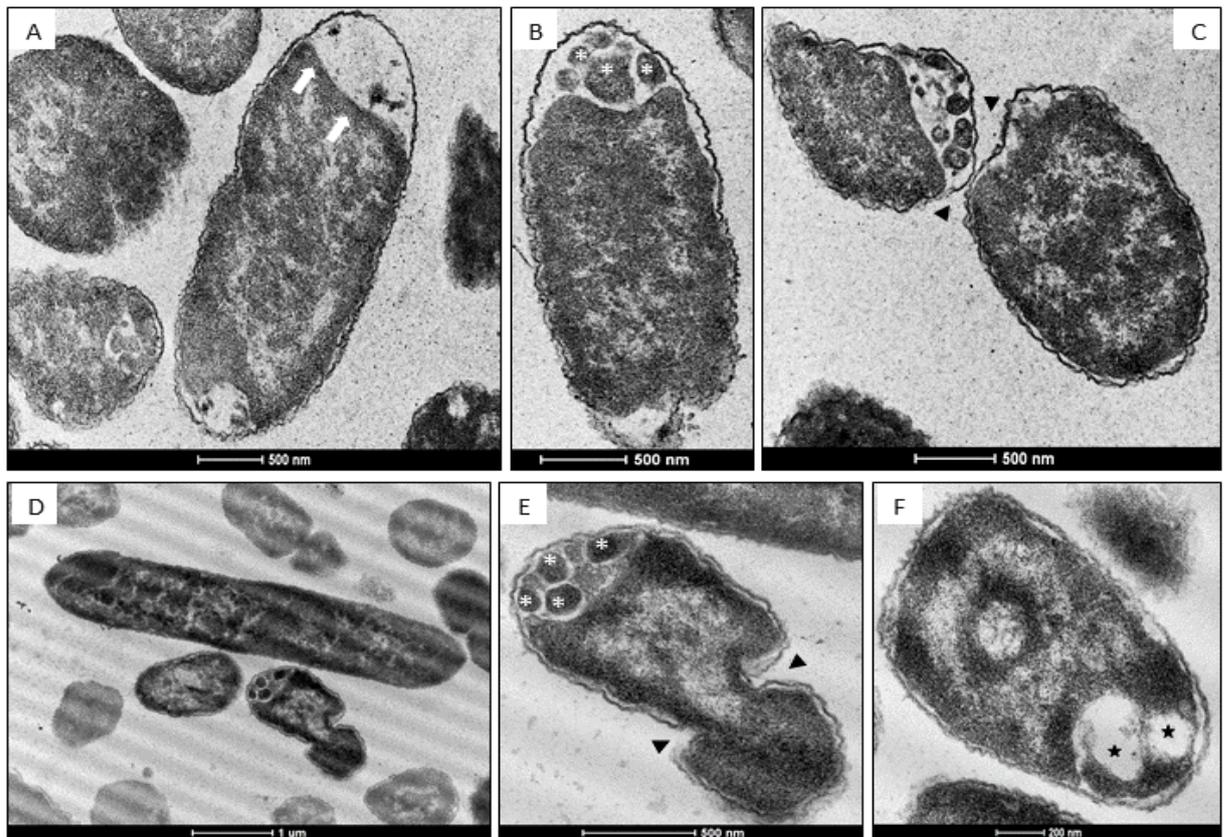
Figura 2 - Micrografia eletrônica de transmissão do isolado clínico de *Serratia marcescens* (S9U) multidroga-resistente



(A) célula bacteriana sem tratamento (controle) - morfologia preservada, membrana citoplasmática, parede celular (setas pretas), e citoplasma (c) intactos. (B-C) Células tratadas com amicacina (16mg/L), é possível observar o citoplasma elétron-lucente (c), células alongadas, com presença de vacúolos intracelulares (colchetes) e retração citoplasmática (setas brancas). (D-F) Células submetidas a gentamicina (0,5 mg/L), morfologia variada com presença de alongamento celular. Septos indicando divisão celular (ponta de seta), espaços eletron-

lucentes com presença de compartimento de membranas. (G-I) Células expostas ao meropenem (1mg/L) e (J-L) (8 mg/L). Pontas de seta indicam células em divisão. Grandes espaços elétron-lucente (estrela) com compartimentos de membrana (asteriscos), além de separação das camadas do envoltório celular (setas brancas).

Figura 3 - Micrografia eletrônica de transmissão das combinações utilizadas no isolado clínico de *Serratia marcescens* (S9U) multidroga-resistente.



(A-C) Células submetidas às combinações de meropenem (8mg/L) e ampicacina (16mg/L) e (D-F) meropenem (1 mg/L) e gentamicina (0,5mg/L). Presença de células disformes e alongadas, com presença de espaços elétron-lucentes (estrela), agregados intracelulares eletrodensos (asteriscos) e retração citoplasmática (setas brancas). Pontas de seta indicam divisão celular.

Referências

1. Firmo EF, Beltrão EM, Silva FR, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, *et al.* Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Global Antimicrob Resis.* 2019; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>
2. Phan HTT, Stoesser N, Maciucă IE, Toma F, Szekely E, Flonta M, *et al.* Illumina short-read and MinION long-read WGS to characterize the molecular epidemiology of an NDM-1 *Serratia marcescens* outbreak in Romania. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(3):672–679. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx456>
3. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017; 8:460–469. doi:10.1080/21505594.2016.1222343.
4. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther.* (2017) 15:519–26 DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1316193>
5. Schmid A, Wolfensberger A, Nemeth J, Schreiber PW, Sax H, Kuster SP. Monotherapy versus combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative infections: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):15290. Published 2019 Oct 29. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51711-x>
6. Kulengowski B, Clark JA, Burgess DS. Killing activity of meropenem in combination with amikacin against VIM- or KPC-producing Enterobacteriaceae that are susceptible, intermediate, or resistant to amikacin. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease.* 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.020>
7. Wentao, N., Guobao, L., Jin, Z. *et al.* Atividade in vitro da minociclina combinada com aminoglicosídeos contra a *K. pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. *J Antibiot.* 2018; 71, 506-513. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-017-0024-9>
8. Tang H. J., Lai C. C., Chen C. C., Zhang C. C., Weng T. C., Chiu Y. H., *et al.* Colistin-sparing regimens against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates: combination of tigecycline or doxycycline and gentamicin or amikacin. *J Microbiol. Immunol. Infect.* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.03.003>

9. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement M100-S28. [Online]. Wayne, PA.; 2018.
10. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1.
11. CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
12. Alves PH, Boff RT, Barth AL, Martins AF. Synergy of Polymyxin B, Tigecycline and Meropenem against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolates. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.011>
13. Chibabhai, V., Nana, T., Bosman, N., Thomas, T., Lowman, W. *Were all carbapenemases created equal? Treatment of NDM-producing extensively drug-resistant Enterobacteriaceae: a case report and literature review. Infection*. 2017; 46(1), 1–13. doi:10.1007/s15010-017-1070-8.
14. Barth N, Ribeiro VB, Zavascki AP. In vitro activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem, or tigecycline against KPC-2-producing Enterobacteriaceae with high MICs for these antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 3596–3597. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-15>.
15. Klainer AS, Perkins RL. Surface manifestations of antibiotic-induced alterations in protein synthesis in bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972; 1:164–170.
16. Cushnie TP, O’Driscoll NH, Lamb AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016; 73 (23): 4471. DOI 10.1007/s00018-016-2302-2.
17. Veras DL, Lopes AC, da Silva GV, Goncalves GG, de Freitas CF, de Lima FC, Maciel MA, Feitosa AP, Alves LC, Brayner FA. Ultrastructural Changes in Clinical and Microbiota Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Carriers of Genes bla SHV, bla TEM, bla CTX-M, or bla KPC When Subject to beta-Lactam Antibiotics. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:57212. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/572128>
18. Scavuzzi, AM; Alves, LC; Veras DL; Brayner FA; Lopes ACS. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene. *Journal of Medical Microbiology*. 2016; v.65, p. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000367>

19. Horii T, Kobayashi M, Sato K, Ichiyama S, Ohta M. An in vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41:435–442.
20. Siqueira, V. L., Cardoso, R. F., Caleffi-Ferracioli, K. R., Scodro, R. B., Fernandez, M. A., Fiorini, A., *et al.* Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014; 58(7), 3957–3967. DOI:10.1128/AAC.02584-13.
21. Sharma R, Patel S, Abboud C, Diep J, Ly NS, Pogue JM, *et al.* Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(2):224-232. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.10.025.

6 CONCLUSÕES

- Os dados do presente trabalho mostram a emergência do gene *bla*_{NDM-1}, associado com *bla*_{KPC-2} e genes EMAs, em isolados clínicos de enterobactérias com perfil multiclonal, tanto em *K. pneumoniae* quanto em *P. mirabilis* e *S. marcescens*, provenientes de pacientes de hospitais públicos e privados de Recife-PE entre 2016 e 2018.
- A KPC foi a carbapenemase de maior ocorrência entre os isolados clínicos de enterobactérias do estudo, seguida da NDM.
- Foi observada uma grande variabilidade de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), com maior ocorrência da fosfotransferase *aph(3)-VI*, nos isolados de *P. mirabilis* e *S. marcescens* e maior ocorrência das acetiltransferases, representadas pelos genes *aac(6')-Ib* e *aac(3)-IIa*, na espécie *K. pneumoniae*.
- Dados obtidos neste estudo alertam para a disseminação de genes de resistência entre isolados provenientes de colonização e infecção, e relacionados clonalmente. O que pode indicar uma alta probabilidade de pacientes estarem servindo de reservatórios para bactérias portadoras dos genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2} e outros determinantes de resistência.
- Metade dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistência à polimixina B, embora o gene *mcr-1* não tenha sido encontrado.
- Apesar da resistência à polimixina B, as combinações desse antimicrobiano com meropenem e amicacina, além de sinérgicas, foram bactericidas contra o isolado clínico de *K. pneumoniae* (K7R2) portador dos genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2}, mostrando que essas combinações podem ser uma alternativa contra infecções causadas por essas cepas multidroga-resistentes e portadores de genes de resistência.
- Meropenem associado à amicacina demonstrou sinergia e atividade bactericida contra o isolado clínico de *P. mirabilis* (P3R3), portador dos genes *bla*_{NDM}, *aac(6)-Ib*, *aph(3)-VI*, *ant(2)-Ia*, entretanto a eliminação da população bacteriana só foi observada após 12h de exposição a essa combinação.
- Meropenem associado à gentamicina foi a melhor combinação contra o isolado clínico de *P. mirabilis* (P3R3), portador dos genes *bla*_{NDM}, *aac(6)-Ib*, *aph(3)-VI*, *ant(2)-Ia*, além de sinérgica essa combinação foi bactericida com a eliminação da população bacteriana após 6h de exposição a esses antimicrobianos combinados.

- Mesmo quando submetidos a concentrações subinibitórias de meropenem, amicacina e gentamicina, isoladamente, os isolados clínicos de *P. mirabilis* (P3R3) e *S. marcescens* apresentaram alterações morfológicas e ultraestruturais significativas, mostrando que o isolado mesmo sendo MDR e portador de diversos genes de resistência sofre alterações estruturais sob a ação desses antimicrobianos.
- O isolado clínico de *P. mirabilis* (P3R3) quando submetido a concentrações subinibitórias de meropenem associado a gentamicina apresentaram uma maior intensidade das alterações morfológicas e ultraestruturais visualizadas quando comparada com os antimicrobianos testados sem associação, além de, uma maior diminuição do número de células bacterianas.
- Meropenem associado à amicacina não demonstrou interação nem atividade bactericida contra o isolado clínico de *S. marcescens* (S9U) multidroga-resistente portador dos genes *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}*, *aac(3) -IIa* e *aac(6) -Ib*. Em contrapartida, meropenem combinado com gentamicina demonstrou atividade sinérgica, porém não foi bactericida contra esse isolado. Mostrando a dificuldade de eliminar um isolado de *S. marcescens* com essas características genéticas de resistência com os antimicrobianos testados nesse estudo.
- O isolado clínico de *S. marcescens* (S9U) quando submetido a concentrações subinibitórias de meropenem associado a amicacina (combinação não sinérgica) apresentou alterações semelhantes aquelas observadas nas células tratadas apenas com meropenem, porém menos intensas. Entretanto, as células expostas a combinação sinérgica de meropenem e gentamicina apresentaram um somatório das alterações obtidas quando se utilizou os antimicrobianos isoladamente.
- Apesar do desafio de se alcançar uma antibioticoterapia adequada contra as infecções causadas por enterobactérias MDR e com alta variabilidade genética, os antimicrobianos utilizados nesse estudo mostraram ser uma alternativa para suprimir o desenvolvimento dessas bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABDUL RAHIM N. *et al.* Synergistic killing of NDM producing MDR *Klebsiella pneumoniae* by two ‘old’ antibiotics-polymyxin B and chloramphenicol. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, p. 2589–2597, 2015.
- ABUOUN, M.*et al.* mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 10, p. 2745-2749, 2017.
- ADEOLU M, ALNAJAR S, NAUSHAD S, GUPTA S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morgane*. **J. Syst. Evol. Microbiol**, p. 5575-5599, 2016.
- AIRES, CAM. *et al.* Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, 2017a.
- AIRES, CAM. *et al.* Emergence of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, pii: e00317-17, 2017b.
- AIRES-DE-SOUSA M. *et al.* Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Hospital, Portugal. **Emerg Infect Dis**, v. 25, n. 9, p. 1632–1638, 2019.
- ALABI OS, MENDONÇA N, ADELEKE OE, DA SILVA GJ. Molecular screening of antibiotic-resistant determinants among multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* from SouthWest Nigeria. **Afr Health Sci**, v. 17, n. 2, p. 356–365, 2017.
- AL-AGAMY MH, EL-MAHDY TS, RADWAN HH, POIREL L. Cooccurrence of NDM-1, ESBL, RmtC, AAC(6’)-Ib, and QnrB in Clonally Related *Klebsiella pneumoniae* Isolates Together with Coexistence of CMY-4 and AAC(6’)-Ib in *Enterobacter cloacae* Isolates from Saudi Arabia. **Biomed Res Int**, 2019.
- ALBA, P. *et al.* Molecular epidemiology of mcr-encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae from foodproducing animals in Italy revealed through the eu harmonized antimicrobial resistance monitoring. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1217, 2018.
- AL-GALLAS, N. *et al.* Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and rmtB gene in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and *Typhimurium* isolated from food-animal products in Tunisia. **Foodborne Pathog Dis**, v.10, p. 813–819, 2013.
- ALMEIDA, A. C. *et al.*, First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n.4, p. 2205-2206, 2012a.
- ALMEIDA, A. C. S. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the bla(KPC-2) gene in an Intensive Care Unit patient. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 40, n. 4, p. 374-376, 2012b.

ALOTAIBI, FE. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated from patients in a university hospital in Saudi Arabia. Epidemiology, clinical profiles and outcomes. **J Infect Public Health**, 2017.

AL SHEIKH, YA. *et al.* Prevalence of 16S rRNA methylase genes among b-lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. **Libyan J Med**, v. 9, p. 24432, 2014.

ALVES, PH. *et al.* Synergy of Polymyxin B, Tigecycline and Meropenem against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolates. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, 2018.

AMBLER RP. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 289, p. 321-31, 1980.

ANDERSON, K. F. *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiol**, v.45, p.2723-2725, 2007.

ANDRADE, L. N. *et al.* Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579-3583, Jul 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Módulo 3 Resistência Microbiana – mecanismo e impacto clínico. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica nº 01/2013 medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília, 17 de abril de 2013. [Internet]. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Ano IV Edição nº 7 de 10 de março de 2014. [Internet]. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f36b2d004380ce7fba2afadb8dfacc6d/Seguran%C3%A7a+e+qualidade+em+servi%C3%A7os+e+sa%C3%BAde+n7.pdf?MOD=AJPERES>

AQUILINI, E. *et al.* Functional identification of *Proteus mirabilis* eptC gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. **Int J Mol Sci**, v. 15, p. 6689–6702, 2014.

ARCILLA, MS. *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v 16, p. 147–149, 2016.

ARGENTE, M. *et al.* Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2018.

ARMBRUSTER CE, MOBLEY HLT, PEARSON MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017, 2018.

ARSLAN U. *et al.* *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. **Pediatr Int**, v. 52, n. 2, p. 208–212, 2010.

ASENSIO, A. *et al.* Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 55–60, 2000.

ÂTTMAN, E. *et al.* A *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit was successfully managed by rapid hospital hygiene interventions and screening. **Acta Paediatr**, v. 107, p. 425–429, 2018.

AVENT, ML. *et al.* Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal Medicine Journal**. v. 41, n. 6, p. 441-449, 2011.

AYAD, A, DRISSI, M, DE CURRAIZE C, *et al.* Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals. **Frontiers in Microbiology**, v. 7:1409, 2016.

BAILÓN H, SACSAQUISPE R. Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. **Rev Med Hered**, v. 24, n. 2, p. 101-108, 2013.

BARBERINO, MG. *et al.* Isolation of blaNDM-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis**, v. 22, p. 47–50, 2018.

BARGUIGUA A, *et al.* First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 121(7), p. 675–677, 2013.

BARON, S. *et al.* Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J Antimicrobi Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016.

BARTH N, RIBEIRO VB, ZAVASCKI AP. *In vitro* activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem, or tigecycline against KPC-2-producing Enterobacteriaceae with high MICs for these antimicrobials. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 3596–3597, 2015.

BEBRONE, C. *et al.* GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, p. 396-401, 2013.

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

BENGOECHEA JA, SA PESSOA J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiol Ver**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.

BERGEN PJ. *et al.* Rational Combinations of Polymyxins with Other Antibiotics. In: Li J., Nation R., Kaye K. (eds) Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1145. Springer, Cham.

BERTONCHELI, C.; HORNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. [online], v.44, n.4, p. 577-599, 2008.

BETTS, JW. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of tigecycline-colistin combination therapies against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 6, p. 3541–3546, 2014.

BOCANEGRA-IBARIAS P. *et al.* Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. **PLoS One**, 12:e0179651, 2017.

BOGAERTS, P. *et al.* Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, n. 3, p. 459-64, 2007.

BONNIN, RA. *et al.* Detection of GES-5 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a newcomer in France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61:e02263–16, 2017.

BOROWIAK, M. *et al.* Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in dtartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 3317–3324, 2017.

BRASILIANSE, D. *et al.* Diversity of metallo- β -lactamase-encoding genes found in distinct species of *Acinetobacter* isolated from the Brazilian Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 114:e190020, 2019.

BRATU, S. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin B and other agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 1, p. 128-132, Jul 2005.

BUENO, MFC. *et al.* Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397–2400, 2013.

BUENO, MFC. Complete Sequences of Multidrug Resistance Plasmids Bearing rmtD1 and rmtD2 16S rRNA Methyltransferase Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1928-1930, 2016.

BULMAN, Z. P. Polymyxin combinations combat *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaNDM-5: preparation for a postantibiotic era. *MBio*, v. 8, n. 4, p. e00540-17, 2017.

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

- BUSH K, FISHER JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 455-78, 2011.
- BUSH K. *et al.* Detection systems for carbapenemase gene identification should include the SME serine carbapenemase. **Int. J. Antimicrob. Agents**. V. 41, p. 1–4, 2013.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 969-976, Mar 2010.
- CABRAL e LOPES. ***Klebsiella pneumoniae*: mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos**. Novas Edições Acadêmicas, c.10, p. 63, 2014.
- CABRAL, AB. *et al.* Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.
- CABRAL, A. B, MACIEL MA, BARROS JF, *et al.* Detection of *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, (1), p. 94–95, 2015.
- CARATTOLI, A, VILLA, L, POIREL, L. *et al.* Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 56, p. 783–786, 2012.
- CARATOLLI, A. *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveill**, v. 22, n. 31, pii: 30589, 2017.
- CARVALHO-ASSEF AP. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013.
- CARVALHO-ASSEF AP. *et al.* Detection of NDM-1-CTX-M-15-, and *qnrB4*-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 58, (4), p. 2475–2476, 2014.
- CASSU-CORSI, D. *et al.* Characterisation of plasmid-mediated *rmtB-1* in Enterobacteriaceae clinical isolates from São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2018;113(12):e180392, 2018.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4654-4661, 2004a.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Emergence of the Extended-Spectrum β -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2344-2345, 2004b.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance

Program, 2006-2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1274–1278, 2011.

CATRY, B. *et al.* Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animal and possible impact on human and animal health. **Inter Jour of Antim Agent**, v. 46, n. 3, p. 297-306, 2015.

CAYÔ, R. *et al.* *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: A silent threat. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 357–358, 2017.

CDC- Centers For Disease Control And Prevention (US). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in Healthcare Settings. Atlanta, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/>.

CDC- Centers For Disease Control And Prevention (US). Tracking CRE Infections, 2016. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/TrackingCRE.html#CREmapNDM>

CERDEIRA, L. *et al.* Draft Genome Sequence of a Hospital-Associated Clone of *Klebsiella pneumoniae* ST340/CC258 Coproducing RmtG and KPC-2 Isolated from a Pediatric Patient. **Genome Announcements**, v. 4(6):e01130-16, 2016.

CHAI DAROON W, SUPALASET S. Corneal Ring Infiltrates Caused by *Serratia marcescens* in a Patient with Human Immunodeficiency Virus. **Case Reports in Ophthalmology**, v. 7, n. 2, p. 359-363, 2016.

CHEN, LF, ANDERSON, DJ, PATERSON, DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infect. Drug Resist**, v. 5, p.133-141, 2012.

CHEN, L. *et al.* First report of an OXA-48-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain from Gaza, Palestine. **Antimicrob Agents Chemother**, 2015.

CHEN DQ. *et al.* Emergence and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* KP01 carrying *bla*_{GES-5} from Guangzhou, China. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 6362–4, 2016.

CIRIT, O. S., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M., YAYLA, B., & MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and Syrian patients. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, p. 1–9, 2019.

CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.

CONCEIÇÃO-NETO, OC. *et al.* Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 50, n. 2, p. 282-284, 2017.

COSTELLO, SE. *et al.* Aminoglycoside-Modifying Enzymes and 16S Ribosomal RNA Methyltransferases-Encoding Genes Among a Global Collection of Gram-Negative Isolates. **J Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 278-285, 2019.

COTRIM, E. R.; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. F. R. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. **Revista do Centro Universitário Newton Paiva**, v. 5, n. 1, 2012.

CRISTINA ML, SARTINI M, SPAGNOLO AM. *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). **Int J Environ Res Public Health**, v.16, n. 4, p. 610, 2019.

CUI X, ZHANG H, DU H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. **Front Microbiol**, 10:1823, 2019.

CUSHNIE, TP; O'DRISCOLL, NH; LAMB, AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 23, p. 4471-4492, 2016.

CUZON, G. *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349-1356, 2010.

da SILVA, IR. *et al.* Distribution of clinical NDM-1-producing Gram-Negative bacteria in Brazil, 2019.

DABOS, L. *et al.* SME-4-producing *Serratia marcescens* from Argentina belonging to clade 2 of the *S. marcescens* phylogeny, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 7, p. 1836–1841, 2019.

DAIKOS, GL. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 58, p. 2322–2328, 2014.

DALMOLIN, TV. *et al.* Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 8, p. 2404-2406, 2017.

DALMOLIN, TV. *et al.* Low prevalence of the mcr-1 gene among carbapenemase producing clinical isolates of Enterobacteriales. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 2018. In press.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 3, p. 417-33, 2010.

DAVIS, MA. *et al.* Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, (6), p. 2666-2669, 2010.

DEINSTMANN, R. *et al.* Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

- DESHPANDE, LM. *et al* Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** V. 56, p. 367–372, 2006.
- DI PILATO, V. *et al*. mcr-1.2, a new mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 5612-5615, 2016.
- DJAHMI, N. *et al*. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- DO CARMO JUNIOR, NV. *et al*. First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of Sao Paulo. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 19, (6), p. 675-676, 2015.
- DOI Y, YOKOYAMA K, YAMANE K, *et al*. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p.491–6, 2004.
- DOI, Y; ARAKAWA, Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. **Clinical Infections Diseases**. v.45, p. 88-94, 2007.
- DOI, Y. *et al*. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.51, n. 3, p. 852-856, 2007.
- DOI Y, WACHINO J, ARAKAWA Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.
- DOLEJSKA, M. *et al*. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-celldivision/multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68(1), p. 34–39, 2013.
- DONG, F.; XU, XI-WEI; SONG, WEN-QI.; *et al*. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a pediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**. V. 121, p. 1611-1616, 2008.
- DONNENBERG, MS. *Enterobacteriaceae*. En: Mandell GL, Bennett JE. editors. Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia PA, EE.UU. Churchill Livingstone, p. 2815-34, 2010.
- DORTET, L; POIREL, L; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- DRALI, R. *et al*. Emergence 370 of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. **Sci Total Environ**, v. 642, p. 90-94, 2018.

DRAWZ, SM; BONOMO, RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

DROPA, M. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 630-632, 2010.

DRUSANO, GL. *et al.* Back to the future: using aminoglycosides again and how to dose them optimally. **Clin Infect Dis**, v. 45, p. 753–760, 2007.

DRUSANO, GL. *et al.* Resistance emergence mechanism and mechanism of resistance suppression by tobramycin for cefepime for *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 231–242, 2012.

DU, XD. *et al.* Tn1548-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6')*-Ib-cr and *bla*_{CTX-M-3} on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 246–248, 2012.

DU, H. *et al.* Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Lancet Infect Dis**, v. 15, n. 3, p. 287–288, 2016.

DUAN, H; CHAI, T; LIU, J; *et al.* Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental REsearch*. V. 109, p. 511-517, 2009.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R. *et al.* Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.33, p. 201-2015, 2009.

EBRINGER, A., RASHID, T. Rheumatoid arthritis is caused by a *Proteus* urinary tract infection. **APMIS**, v. 122, n. 5, p. 363-368, 2013.

ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm, Sweden: 2018. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. Annual Epidemiological Report for 2016.

EICHENBERGER EM, THADEN JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 2, p. 37, 2019.

EL-GAMAL, MI. *et al.* Recent updates of carbapenem antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 131, p. 185–195, 2017.

ESPINAL P, POIREL L, CARMELI Y, *et al.* Spread of NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* in the Middle East. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, (8), p.1928–1930, 2013.

EVANS BA, AMYES SG. OXA β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**. v. 27, n. 2, p. 241-63, 2014.

FALAGAS, ME; KASIAKOU, SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical care**, London, v. 10, n. 1, p. 27, 2006.

FARIA-JUNIOR, C. *et al.* NDM-producing Enterobacteriaceae strains among hospitals in Brasília, Brazil. **J. Microbiol. Exp.** v. 3, p. 1–6, 2016.

FERNANDES, MR. *et al.* Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveill**, v. 21, n. 17, p. 30214, 2016a.

FERNANDES, MR. *et al.* First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 60, n. 10, p; 6415-7, 2016b.

FERNANDES, MR. *et al.* Colistin-resistant *mcr-1* -positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. **Antimicrob Agents Chemoter**, 61:e00234–17, 2017.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M. *et al.* Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended Spectrum β -Lactamases Collected in Two Multicenter Studies in Spain. **Microb Drug Resist**, v. 24, n. 4, p. 367–376, 2018.

FIRMO, EF. *et al.* Emergence of aph(3')-VI and accumulation of aminoglycoside modifying enzyme genes in KPC-2-possessing *Enterobacter aerogenes* isolates from infections and colonization in patients from Recife-PE, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 52, e20180460, 2019a.

FIRMO EF. *et al.* Association of *bla*_{NDM-1} with *bla*_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. **J Global Antimicrob Resis.** 2019b.

FRIEDLLANDER C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie . **Arquivo F Pathol Anat**, v. 87, p. 319–324, 1882.

FRIEDMAN, N. D., TEMKIN, E., & CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416–422, 2016.

FRITSCHÉ, T. R.; CASTANHEIRA, M.; MILLER, G. H. *et al.* Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, p.1843–1845, 2008.

FRITZENWANKER, M. Treatment Options for Carbapenem- Resistant Gram-Negative Infections. **Dtsch Arztebl Int**, v. 115, n. 20-21, p. 345–352, 2018.

FUKUTSUJI, K.; YAMADA, S., HARADA, T. Ultrastructural cell wall characteristics of clinical gentamycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Medical Molecular Morphology**. 46:70–76, 2013.

FURSOVA, NK. *et al.* The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 2015.

GALANI, I. *et al.* Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek University Hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. E52–E54, 2012.

GALANI, I. *et al.* Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. **BMC Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 167, 2019.

GALES, AC. *et al.* Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, Ago. 2012.

GALIMAND, M. *et al.* Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2949–2953, 2005.

GARCIA-VALLVÉ S, PALAU J, ROMEU A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Mol Biol Evol**, v. 16: p. 1125–1134, 1999.

GARNEAU-TSODIKOVA S, LABBY KJ. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. (1), p.11–27, 2016.

GHAITH, DM. *et al.* First reported nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* harboring bla IMP-4 and bla VIM-2 in a neonatal intensive care unit in Cairo, Egypt. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 2211–2217, 2018.

GHAZAWI A. *et al.* NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, (2), p. E34–E36, 2012.

GIAMARELLOU, H. *et al.* Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, p. 2388–2390, 2013.

GIANNELLA, M. *et al.* Italian Study Group on Resistant Infections of the Societa' Italiana Terapia Antinfettiva (ISGRI-SITA). Effect of combination therapy containing a high-dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, p. 244–8, 2018.

GIBBS KA, GREENBERG EP. Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression. **Chemical reviews**, v. 111, n.1, p. 188–194, 2011.

GILLELAND, LB. *et al.* Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol**, v. 29, p. 41–50, 1989.

GIRARDELLO R, GALES AC. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **RECI**, v. 2, n. 2, p. 66–69, 2012.

- GIROMETTI, N. *et al.* Klebsiella pneumoniae bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. **Medicine** (Baltimore), v.93, p. 298–309, 2014.
- GOKMEN, T., NAGIYEV, T, MERAL, M. *et al.* NDM-1 and rmtC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Turkey. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9(10):e33990, 2016.
- GRAHNQUIST L, LUNDBERG B, TULLUS, K. Neonatal *Proteus* meningo encephalitis. Case report. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand**, v. 100, p. 734–736, 1992.
- GRAZZIOTIN, A.L, VIDAL, N.M, PALMEIRO, J.K. *et al.* Genome Sequencing of Four Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Isolates from Hospitalized Patients in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1649, 2016.
- GRUBER TM. *et al.* Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring blaNDM-1. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.70, n. 4, p.1026-1030, 2015.
- GUO, L. *et al.* Nosocomial Outbreak of OXA-48- Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383. **PLoS One**, 2016.
- HAN, S. *et al.* Aminoglycoside therapy for childhood urinary tract infection due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 414, 2015.
- HEJAZI A, FALKINER FR. *Serratia marcescens*. **J Med Microbiology**, v. 46, p. 903–912, 1997.
- HELLINGER WC, BREWER NS. Carbapenêmicos e monobactâmicos: Imipenem, Meropenem e Aztreonam. **Mayo Clinic Proceedings**, 74 (4), 420-434, 1999.
- HIDALGO, L. *et al.* Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68,p. 1543–1550, 2013.
- HIRSCH EB, TAM VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Review Pharmacoeconomics Outcomes Research**, v. 10, n. 4, p. 441-451, 2010.
- HOKINS KL. *et al.* *Serratia marcescens* producing SME carbapenemases: an emerging resistance problem in the UK?, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 5, p.1535–1537, 2017.
- HOPKINS KL, ESCUDERO JA, HIDALGO L, *et al.* 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. **Emerg Infect Dis**, v. 16, p. 712–5, 2010.
- HU, Y. *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 146–147, 2016.

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

HU, X. *et al.* First genome sequence of a blaKPC2-carrying *Citrobacter koseri* isolate collected from a patient with diarrhea. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2018.

HUANG, TW. *et al.* Complete sequences of two plasmids in a blaNDM-1-positive *Klebsiella oxytoca* isolate from Taiwan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4072-4076, 2013.

HUANG, TD. *et al.* Prevalence and mechanisms of resistance to carbapenems in Enterobacteriaceae isolates from 24 hospitals in Belgium multicentre study group. **J Antimicrob Chemother**, 2013.

HYO, Y.; YAMADA, S.; HARADA, T. Characteristic cell wall ultrastructure of a macrolide-resistant *Staphylococcus capitis* strain isolated from a patient with chronic sinusitis. **Medical Molecular Morphology**. 41:160–164, 2008.

IOVENE, MR. *et al.* First Italian outbreak of VIM-producing *Serratia marcescens* in an adult polyvalent intensive care unit, August-October 2018: A case report and literature review. **World J Clin Cases**, v. 6;7(21), p. 3535-3548, 2019.

IOVLEVA A, DOI Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Clin Lab Med**, v. 37, n. 2, p. 303–315, 2017.

IKONOMIDIS, A.; TOKATLIDOU, D.; KRISTO, I. *et al.* Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.10, p.5344-5347, 2005.

ITO, H.; ARAKAWA, Y.; OHSUKA, S. *et al.* Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β - lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.4, p.824-829, 1995.

ISENSTEIN D., HONIG E. *Proteus vulgaris* empyema and increased pleural fluid pH. **Chest** 97:511, 1990.

JABALAMELI, F. *et al.* Prevalence of metallo- β -lactamase-encoding genes among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Iran. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 51, n. 3, p. 270-276, 2018.

JACOBSEN, SM. *et al.* Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Rev**, v. 21, p. 26-59, 2008.

JÁCOME, PR. *et al.* First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n. 9, p. 4990, 2012.

JAIN, A. *et al.* NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 1777-1784, 2014.

JEON JH. et. al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **Int J Mol Sci**, v. 16(5), p. 9654-9692, 2015.

JIN JS, KWON KT, MOON DC, *et al.* Emergence of 16S rRNA methylase *rmtA* in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 490–491, 2009.

JOHNSON J, QUACH C. Outbreaks in the neonatal ICU: a review of the literature. **Curr Opin Infect Dis**, v. 30, p. 395–403, 2017.

KANG, H.Y.; KIM, K.Y.; KIM, J. *et al.* Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant Enterobacteriaceae isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 700–706, 2008.

KARAIKOS, I. *et al.* The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. **Front Public Health**, v. 7:151, 2019.

KARKEY, A. *et al.* Outbreaks of *Serratia marcescens* and *Serratia rubidaea* bacteremia in a central Kathmandu hospital following the 2015 earthquakes. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 112, n. 10, p. 467–472, 2018.

KHAJURIA, A. *et al.* Emergence of *Escherichia coli*, CoProducing NDM-1 and OXA-48 Carbapenemases, in Urinary Isolates, at a Tertiary Care Centre at Central India. **J Clin Diagn Res**, 2014.

KIAEI, S. *et al.* Endemic dissemination of different sequence types of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains harboring *bla*_{NDM} and *16S rRNA methylase* genes in Kerman hospitals, Iran, from 2015 to 2017. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 45–54, 2018.

KONEMAN, EW; ALLEN, SD; JANDRA, WM; SCHRECKENBERGER, PC; WINN, WC. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2008.

KONG Z, *et al.* First Reported Nosocomial Outbreak Of NDM-5-Producing *Klebsiella pneumoniae* In A Neonatal Unit In China. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 3557–3566, 2019.

KRAIEM, AG. *et al.* New Delhi metallo- β -lactamase and OXA-48 carbapenemases in gram - negative bacilli isolates in Libya. **Libyan J Med**, 2015.

KULENGOWSKI, B. *et al.* Effect of increasing meropenem MIC on the killing activity of meropenem in combination with amikacin or polymyxin B against MBL- and KPC-producing *Enterobacter cloacae*. **Diag Microb Infec Dis**, 2018a.

KULENGOWSKI, B. *et al.* Killing activity of meropenem in combination with amikacin against VIM- or KPC-producing Enterobacteriaceae that are susceptible, intermediate, or resistant to amikacin. **Diag Microb Infec Dis**, 2018b.

KUMARASAMY, KK. *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect. Dis.** v. 10, p. 597–602, 2010.

LAGERBÄCK, P. *et al.* Evaluation of antibacterial activities of colistin, rifampicin and meropenem combinations against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in 24h in vitro time–kill experiments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2321–2325, 2016.

LAKE JG, WEINER LM, MILSTONE AM, *et al.* Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011-2014. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 39, n. 1, p.1–11, 2018.

LAMBERT T, GERBAUD G, COURVALIN P. Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 32, p. 15–19, 1988.

LAURETTI L. *et al.* Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1584-1590, 1999.

LEE, K. *et al.* Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n. 11, p.4485-4491, 2005a.

LEE, GC; BURGESS, DS. Polymyxin and Doripenem combination against. KPC-Producing *K. pneumoniae*. **J Clin Med Res**, v. 5, n. 2, p. 97-100, 2013.

LEE, C. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 4109–4110, 2014.

LEE, C. *et al.* Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7 p. 895, 2016.

LEE TH. *et al.* *ArmA* and *RmtB* Were the Predominant 16S RMTase Genes Responsible for Aminoglycoside-resistant Isolates in Korea. **J Korean Med Sci**, v. 33, n. 42:e262, 2018.

LEULMI, Z. *et al.* First report of blaOXA-24 carbapenemase-encoding gene, armA Methyltransferase and aac(6)-Ib-cr producing multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* in Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2018.

LIANG, C. *et al.* Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. **Int Journal Exp Med**, v. 8, n. 1, p. 1381-1385, 2015.

LI, Y. *et al.* Rapid increase in prevalence of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) and emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in CRE in a hospital in Henan, China. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 4, p. e01932-17, 2018.

- LINCOPAN, N. *et al.* First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, (1), p. 516–519, 2005.
- LIN, YT. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of tigecycline nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. **BMC Infectious Diseases**, v.14, n.1, p. 1, 2014.
- LIN, QY. *et al.* *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 58, p. 5181–5190, 2014.
- LIU, YY. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 161–168, 2016.
- LORENZONI, V. V. *et al.* Bloodstream infection by mcr-1-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 356-357, 2018.
- LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net/index.html>. Acesso em: 28 de Outubro de 2019.
- LUO Y, YANG J, YE L, *et al.* Characterization of KPC-2-producing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella oxytoca* isolates from a Chinese Hospital. **Microb Drug Resist**, v. 20, p. 264–269, 2014.
- LYMAN M. *et al.* Notes from the field: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases—United States, 2010–2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 64, p.1315–1316, 2015.
- MAGILL, SS. *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N. Engl. J. Med**, v. 370, p. 1198–1208, 2014.
- MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011.
- MANAGEIRO V. *et al.* Draft Genome Sequence of the First NDM-1-Producing *Providencia stuartii* Strain Isolated in Portugal. **Genome announcements**, v. 3, n. 5, 2015.
- MANCINI, S. *et al.* Emergence of an MDR *Klebsiella pneumoniae* ST231 producing OXA-232 and RmtF in Switzerland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 3, p. 821–823, 2017.
- MANCINI, S. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 90, n. 2, p. 151-152, 2018.
- MARCHIARO P. *et al.* Convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of gram-negative carbapenemase producers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.336-344, 2008.

- MARGATE E, MAGALHAES V, FEHLBERG LC, *et al.* KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista Inst Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 57, (4), p. 359–360, 2015.
- MARTIN RM, BACHMAN MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8:4, 2018.
- MARTINS, W. M., CORDEIRO-MOURA, J. R, RAMOS, A. C. Comparison of phenotypic tests for detecting BKC-1 producing Enterobacteriaceae isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, 3, p. 246-248, 2016.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J.. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. **Enf Infec y Microb Clin**, v. 32, p. 4-9, 2014.
- MARTÍNEZ, M. *et al.* Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulânico acid isolated in Spain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2015.
- MARX, A. *et al.* Case report 496: intraosseous gas in *Proteus mirabilis* osteomyelitis complicating bone infarcts in sickle cell disease. **Skeletal Radiology**, v. 17, p. 510–513, 1988.
- MATASEJE LF. *et al.* *Serratia marcescens* harbouring SME-type class A carbapenemases in Canada and the presence of bla_{SME} on a novel genomic island., SmarGI1-1. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, p. 1825-9, 2014.
- MATSUMURA, Y. *et al.* Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 8, p. 2249-2258, 2017.
- MEINI M.R., LLARRULL L.I., VILA A.J. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo-beta-lactamases. **FEBS Lett**. v. 589, p. 3419–3432, 2015.
- MELO, R.C.A., BARROS, E.M.R., LOUREIRO, N.G., MELO, H.R.L., MACIEL, M.A.V, LOPES, A.C.S.. Presence of *fimH*, *mrkD* and *irp2* virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, 2014.
- MESSAOUDI, A. *et al.* Dynamic and molecular features of OXA-48-like-producing *Klebsiella pneumoniae* lineages in a Tunisian hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019.
- MEZZATESTA, ML. *et al.* Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1932–1934, 2013.
- MIR, RA. *et al.* Identification of Genes Codin Aminoglycoside Modifying Enzymes in *E. coli* of UTI Patients in India. **The Scientific World Journal**, ID 1875865, p. 1-5, 2016.

- MIRIAGOU, V.; TZELEPI, E.; GIANNELI, D.; TZOUVELEKIS, L.S. *Escherichia coli* with a selftransferable, multiresistant plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.1, p.395-397, 2003a.
- MIRIAGOU, V. *et al.* Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1297-1300, 2003b.
- MIRÓ, E. *et al.* Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in Enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. **Microbial Drug Resistance**, v.19, n. 2, p.94–99, 2013.
- MOFFATT, JH; HARPER, M; BOYCE, JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, p. 55–71, 2019.
- MOJICA MF. *et al.* “B1-Metallo-Beta-Lactamases: Where Do We Stand?” **Current drug targets**, v. 17.9, p.1029–1050, 2016.
- MOHAMMED, H. *et al.* Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M β -Lactamases in Imipenem-Resistant gram-Negative Bacilli Isolated from Egyptian Hospitals. **International Journal of Microbiology**, 2016.
- MONTAGNANI C, COCCHI P, LEGA L, *et al.* *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants. **BMC Infect Dis**, v. 15:11, 2015.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1, p.333-334, jan.2009.
- MOODY J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution method in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM; p. 1–28, 2004.
- MUNITA, J.M., ARIAS, C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, 2016.
- MUNOZ-PRICE LS. *et al.*, Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 9, p. 785-96, 2013.
- MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA. **Microbiologia Médica**. 7 ed. Ed. Elsevier, 2014.
- MUSHAM CK, JARATHI A, AGARWAL A. Acute epiglottitis due to *Serratia marcescens* in an immunocompetent adult. **Am J Med Sci**, v. 344, n. 2, p. 153–154, 2012.
- MUSHTAQ S, IRFAN S, SARMA JB, *et al.* Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2002–2005, 2011.

NAAS T, NORDMANN P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7693-7697, 1994.

NAAS T. *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, Abr 2008.

NAAS T. *et al.* Role of ISKpn7 and deletions in blaKPC gene expression. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 9, p. 4753–4759, Set. 2012.

NAAS T, DORTET L, IORGA BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. **Curr Drug. Targets**, 17:1006–1028, 2016.

NASTRO M. *et al.* First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, p. 617–619, 2013.

NATION RL, VELKOV T, LI J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese?. **Clin Infect Dis**, v. 59, n. 1, p. 88–94, 2014.

NICOLETTI AG, MARCONDES MF, MARTINS WM Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 5159-5164, 2015.

NIKOLAKOPOULOS, A. *et al.* A Case of *Serratia marcescens* Endocarditis in a Nonintravenous Drug-Using Male Patient and Review of Literature. **Case Rep Infect Dis**, 2019:3715404, 2019.

NODARI, CS; BARTH, LA. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae: focus on carbapenemase production. **J Inf Control**, v. 5, n. 1, p. 1-30, 2016.

NODARI CS. *et al.* Draft genome sequence of a GES-5 producing *Serratia marcescens* isolated in southern Brazil. **Braz J Microbiol**. 2017.

NOPPE-LECLERCQ, I. *et al.* PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. **Res Microbiol**. 1999; 150: p. 317-322

NORDMANN, P; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002.

NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

NORDMANN P, NAAS T, POIREL L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

NORDMANN P, DORTET L, POIREL L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! **Trends Mol Med**, v. 18, p. 263-272, 2012.

NORDMANN P, POIREL L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clin Microbiol and Infect Dis**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.

NORDMANN P, POIREL L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v. 69, n. 7, p. 521–8, 2019.

ODDS FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, 1, 2003.

O'HARA, C. M, BRENNER, F. W., MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 534-546, 2000.

O'HARA, J. *et al.* Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 57, p. 2413–2416, 2013.

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.**, v. 5, 643, 2014.

OLAITAN, AO. *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 147, 2016.

OLIVEIRA, JFP. *et al.* Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardiovasc Surg**, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

OLIVEIRA C. *et al.* Frequency and resistance profile of *Klebsiella* spp. isolates in a university hospital in Natal/RN during a ten-year period. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 589-594, 2011.

OLIVEIRA, F. A. *et al.* MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 52, n. 3, p. 438-440, 2018.

OSANO E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.1, p.71-78, 1994.

PACZOSA MK, MECSAS J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, p. 629–61, 2016.

PAGANO M. *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 444-445, 2015.

PASSARELLI-ARAÚJO, H. *et al.* Molecular epidemiology of 16S rRNA methyltransferase in Brazil: RmtG in *Klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). **An. Acad. Bras. Ciênc**, Rio de Janeiro, v. 91, supl. 1, e20180762, 2019.

- PASTERAN, F. *et al.* Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol*, v. 47, p. 1631–1639, 2009.
- PATEL JB, RASHEED JK, BRANDON KITCHEL, MS. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology and laboratory detection. **Clinical Microbiology News**; 31: 55-62, 2009.
- PEDERSEN, T. *et al.* Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical *Enterobacteriaceae* in Durban, South Africa. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62:e02178–17, 2018.
- PEIRANO, G. *et al.* Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.2, p.265-268, 2009.
- PELLEGRINO, F. *et al.* *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.10(4), p. 251-253, 2006.
- PENTEADO, AP. *et al.* Dissemination of *bla*(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr23*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 63,(1), p. 87–91, 2009.
- PEREIRA, PS. *et al.* Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 234–236, 2015a.
- PEREIRA, PS. *et al.* Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 580-582, 2015b.
- PEREZ, F. *et al.* Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy? **Expert. Opin. Pharmacother**, v. 17, p. 761–781, 2016.
- PEREZ, F. *et al.* Polymyxins: To Combine or Not to Combine? **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 2, p. 38, 2019.
- PERILLI, M. *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring *bla*KPC-3 and *bla*VIM-2 from central Italy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p. 218–221, 2013.
- PETRELLA S. *et al.* Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3725–3736, 2008.
- PETTY, LA. *et al.* Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Infect. Drug Resist**, v. 11, p. 1461–1472, 2018.

PFEIFER Y. *et al.* Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, 2012.

PHAN H, LEHMAN D. Cerebral abscess complicating *Proteus mirabilis* meningitis in a newborn infant. **Journal of Child Neurology**, v. 27, p. 405-407, 2012.

PICÃO, RC. *et al.* Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 796-807, 2010.

PILLONETTO, M. *et al.* First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7592-7594, 2014.

PILLONETTO, M. *et al.* Low level of polymyxin resistance among nonclonal mcr-1- positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 93, n. 2, p. 140-142, 2019.

PITOUT J, NORDMANN P, POIREL L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59(10), p. 5873-5884, 2015.

PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n. 4, p.589-603, 1998.

POIREL, L. *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 622–632, 2000.

POIREL, L. *et al.* GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598-2603, 2001.

POIREL L, HÉRITIER C, NORDMANN P. Chromosome-encoded ambler class D β -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. **Antimicrob Agents Chemother**, 2004a.

POIREL, L. *et al.* Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 48, p. 15–22, 2004b.

POIREL, L. *et al.* SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51, p. 2282–2283, 2007.

POIREL, L. *et al.* Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p.1730–1733, 2011b.

POIREL, L. *et al.* Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, 2011c.

- POIREL, L. *et al.* Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-spectrum- β -lactamase-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 618–9, 2014.
- POIREL L, JAYOL A, NORDMANN P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Ver**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017.
- POTRON, A. *et al.* Occurrence of the Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase Gene *bla*_{OXA-48} in the Environment in Morocco. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5413-5414, 2011.
- PROTONOTARIOU, E. *et al.* Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. **Int J Antimicrob Agents**, v. 52, p. 331–337, 2018.
- QIN, S. *et al.* Emergence of Extensively Drug-Resistant *Proteus mirabilis* Harboring a Conjugative NDM-1 Plasmid and a Novel Salmonella Genomic Island 1 Variant, SGI1-Z. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, (10), p. 6601, 2015.
- QUEENAN, AM. *et al.* SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, 2000.
- QUEENAN AM. *et al.* SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 3485–3487, 2006.
- QUEENAN, AM.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.
- QUILES, M. G. *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174-177, 2015.
- QURESHI, ZA. *et al.* Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, p. 2108–2113, 2012.
- RAAKHEE, T. *et al.* Bacteriological study of discharging ear in patients attending a tertiary care hospital. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 602-606, 2014.
- RAHMAN, M, SHUKLA, S.K, PRASAD, K.N, *et al.* Prevalence and molecular characterization of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, p. 30–7, 2014.
- RAJESHWARI, H.*et al.* Morphological changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to Cefotaxime: a scanning electron microscope study. **World J Microbiol Biotechnol**. 25: 2263-2266, 2009.

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

RAMIREZ, M; NIKOLAIDIS, N; TOLMASKY, E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. **Frontiers in Microbiol**, v. 4, 122, p. 1-7, 2013.

REDONDO-BRAVO L. *et al.* *Serratia marcescens* outbreak in a neonatology unit of a Spanish tertiary hospital: Risk factors and control measures. **Am. J. Infect. Control**. 2018.

RIBEIRO, V. B., *et al.* Detection of bla_{GES-5} in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n.1, p. 622-623, 2014a.

RIBEIRO, V. B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Brazilian Journal Infect Disease**, v. 18, n. 2, p. 231–232, 2014b.

RIGATTO, MH; FALCI, DR & ZAVASCKI, AP. Clinical Use of Polymyxin B. Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside, p. 197–218, 2019.

RIZI, K. *et al.* Prevalence of integrons and Antimicrobial Resistance Genes Among Clinical Isolates of *Enterobacter* spp. From Hospitals of Tehran. **Int J Enteric Pathog**, v. 3, n. 1, e22531, 2015.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of the KPC Gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-Based Nosocomial Surveillance. Study in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, p. 2968-2970, 2011.

ROCHA, I. V. *et al.* Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the mcr-1 gene associated with bloodstream infection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 5, p. 655-656, 2017.

RODRIGUEZ-BANO, J. *et al.* Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clin. Microbiol. Rev.** 31:e00079-17, 2018.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, Maio 2011.

ROZALES FP, RIBEIRO VB, MAGAGNIN CM, *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 25, p. 79–81, 2014.

RUIZ-SADA P, ESCALANTE M, LIZARRALDE E. Severe acute infection due to *Serratia marcescens* causing respiratory distress in an immunocompetent adult. **Rom J Intern Med**, v. 54, n. 2, p. 134–136, 2016.

SADER, HS. *et al.* Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 4, p. 379-81, 2015.

SAMPAIO, JL. *et al.* Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 6, :3566-7, 2014.

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

SAMUELSEN, O. *et al.* Identification of *Enterobacteriaceae* isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1682–1685, 2013.

SATLIN, MJ. *et al.* Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 12, p. 5893-9, 2011.

SCAVUZZI, A. *et al.* Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene. **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p. 1–8, 2016.

SCAVUZZI, A. *et al.* Emergência do blaNDM-1 associado aos genes aac(6')-Ib-cr, acrB, cps e mrkD em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente de Recife-PE, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 52, e20180352, 2019a.

SCAVUZZI, A. *et al.* Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in bla harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **J Glob Ant Res**, 2019b.

SELINA, F. *et al.* Organisms associated with ventilator associated pneumonia (VAP) in intensive care units (ICU). **J. BSA**, v. 22, p. 72–77, 2014.

SHARMA, R. *et al.* Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016.

SHAW, KJ. *et al.* Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. **Microbiol. Rev.** v. 57, p. 138–163, 1993.

SHENG, J. *et al.* blaKPC and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 31, p. 1585–1591, 2012.

SHEU, CC. *et al.* Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. **Front Microbiol**, v. 10, p. 80, 2019.

- SHIBATA, N. *et al.* PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5407-5413, 2003.
- SIDJABAT, H.E, TOWNELL, N, NIMMO, G.R. *et al.* Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Austrália. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 4059–4066, 2015.
- SIEVERT, DM. *et al.* National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2013.
- SILVA, KE. *et al.* Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from an outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, (7), p. 2324–2328, 2015.
- SIQUEIRA, VL. *et al.* Structural Changes and Differentially Expressed Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Exposed to Meropenem-Ciprofloxacin Combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3957-3967, Jul. 2014.
- SOUZA LOPES, AC. *et al.* Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**, v.160, n.1, p.37-46, 2005.
- STAMM, WE. Urinary tract infections. In: Root R K, editor. Clinical infectious diseases: a practical approach. New York, N.Y: Oxford University Press, Inc.p. 649–656, 1999.
- STEWART, A. *et al.* Treatment of Infections by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 11, :e01195-18, 2018.
- SU, LH. *et al.* Extended epidemic of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*. **Journal Clinical. Microbiology**, v. 41, p. 4726–4732, 2003.
- TADA, T. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 372–374, 2013.
- TADA, T. *et al.* Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. **BMC Infect Dis**, 2017.
- TAKAHASHI H. *et al.* Nosocomial *Serratia marcescens* outbreak in Osaka, Japan, from 1999 to 2000. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, n. 2, p. 156–61, 2004.
- TANGDEN, T. *et al.* Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time–kill experiments. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 1757–62, 2014.

TAVARES, CP. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 82(4), p. 326-30, 2015.

TIAN, GB. *et al.* Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15, and RmtB from Detroit, Michigan. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 55(8), p. 3966-7, 2011.

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

TOLEDO, PV. *et al.* Activity of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a rat model and time-kill assay. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 7, p. 4301–4304, 2015.

TOLEMAN, MA. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.673–679, 2002.

TONINI, M. A. *et al.* Carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST3901 carrying *mcr1* and *blaCTX-M* genes isolated from a diabetic foot infection in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 13, p. 209-210, 2018.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. (2012). *Microbiologia*. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed.

TUMBARELLO, M. *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clin. Infect. Dis**, v. 55, p. 943–950, 2012.

TUMBARELLO, M. *et al.* Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, p. 2133–43, 2015.

TRABULSI, LB; ALTERTHUM F. **Microbiologia** 5ed. São Paulo: Atheneu, p.780 , 2008.

TRIMBLE, MJ. *et al.* Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 6, n. 10:a025288, 2016.

TSE H, YUEN KY. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 145–146, 2016.

TZOUVELEKIS, LS. *et al.* Carbapenemases in *K. pneumoniae* na other Enterobacteriaceae: na evolving crisis of global dimensions. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.

TZOUVELEKIS, LS. *et al.* Treating infections caused by carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 9, p. 862-72, 2014.

van DUIN, D; BONOMO, RA. Ceftazidima / avibactam e ceftolozane / tazobactam: combinações de inibidor de β -lactama / β -lactamase de segunda geração. **Clin Infect Dis**, v. 63, p. 234 – 241, 2016.

van DUIN, D; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Virulence**. V. 8, p. 460–469, 2017.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for the future. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003.

VAZIRI, F. *et al.* The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (69)-I, aac (69)-II, ant (20)-I, aph (39)-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Science**, v. 66, n. 9, p. 1519-1522, 2011.

VELASCO, C. *et al.* Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum b-lactamase. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 157-163, 2009.

VELKOV, T. *t al.* Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. **Future Microbiology**. 8(6), 711-724; 2013.

VERAS, DL. *et al.* Ultrastructural changes in clinical and Microbiota isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, or blaKPC when subject to beta-lactam antibiotics. **ScientificWorldJournal**, 2015.

VILLA, J. *et al.* Long-term evolution of multiple outbreaks of *Serratia marcescens* bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Pediatr Infect Dis J**, v. 31, n. 12, p. 1298–300, 2012.

VILLEGAS, M.V. *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1553–1555. 2007.

VOELZ, A. *et al.* Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management. **Int J Hyg Environ Health**, v. 213, n. 2, p. 79–87, 2010.

VOIDAZAN, ALBU, TOTH, *et al.* Healthcare Associated Infections—A New Pathology in Medical Practice? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 760, 2020.

VOURLI, S.; TSORLINI, H.; KATSIFA, H. *et al.* Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. **Clinical Microbiol. Infect**, v.22, n.7, p.691-694, 2006.

WACHINO, J. *et al.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 12, p. 4401-4409, 2007.

- WACHINO, J; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic gram-negative bacteria: an update. **Drug resistance updates**, v. 15, n. 3, p. 133–148, 2012.
- WALSH TR. *et al.* Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, n.2, p.306-325, 2005.
- WALSH TR. *et al.* Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, (5), p. 355–362, 2011.
- WANG, R. *et al.* The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 1179, 2018.
- WANG, X. *et al.* Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p.122, 2018.
- WANG, X. *et al.* Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-8* and Its Variant in *Raoultella ornithinolytica*. **Frontiers in microbiology**, v.10, 228, 2019.
- WANGKHEIMAYUM, J. *et al.* Occurrence of Acquired 16S rRNA Methyltransferase-Mediated Aminoglycoside Resistance in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae within a Tertiary Referral Hospital of Northeast India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 6, e01037-16, 2017.
- WATANABE M, IYOBE S, INOUE M, MITSUHASHI S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.147–151, 1991.
- WATANAKUNAKORN, C.; PERNI, S. C. *Proteus mirabilis* bacteremia: a review of 176 cases during 1980–1992. **Scand. Journal Infectious Disease**, v. 26, p. 361–367, 1994.
- WEBB, HE. *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 144–145, 2016.
- WENTAO, N., GUOBAO, L., JIN, Z., *et al.* In vitro activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 5, p. 506–513, 2018.
- WILLIAMSON, DA. *et al.* Identification and molecular characterization of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 529–533, 2012.
- WISEMAN, LR, WAGSTAFF, AJ, BROGDEN, RN, & BRYSON, HM. Meropenem. **Drugs**, v. 50, n. 1, p. 73-101, 1995.
- WOLTER, D. J. *et al.* Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1660-1664, 2009.

WOODFORD, N. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **J. Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 4793-4799, Dez. 2004.

WHEAT, R.P., ZUCKERMAN, A.; RANTZ, L. A. Infection due to chromobacteria; report of 11 cases. AMA. **Archives Internal Medicine**, v. 88, p. 461–466, 1951.

WHO- World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

WU, Q. *et al.* Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai, China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53(1), p. 271-2, 2009.

XAVIER, B. B. *et al.* Identification of a novel plasmid-mediated colistinresistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 27, p.30280, 2016.

YAMANE, K. *et al.* Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. **Emerg Infect Dis**, v. 11, p. 951–953, 2005.

YAMANE, K.; ROSSI, F.; BARBERINO, M. G.; ADAMS-HADUCH, J. M.; DOI, Y.;; PATERSON, D. L. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 61, 746–747, 2008a.

YAN, J.J.; KO, W.C.; WU, J.J. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.8, p.2368-2371, 2001b.

YANG YJ, WU PJ, LIVERMORE DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 34, p. 755–758, 1990.

YANG, D. *et al.* The Occurrence of the Colistin Resistance Gene mcr-1 in the Haihe River (China). **Int J Environ Res Public Health**., v. 14, n. 6, p. 576, 2017.

YANG, YQ. *et al.* Colistin resistance gene mcr-1 and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 5, pii. e01204-16, 2017.

YANG, YQ. *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemoter**, v. 73, p. 1791-1795, 2018.

YAO Z. *et al.* Draft Genome Sequence of a Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strain Carrying a bla_{KPC-2} Carbapenemase Gene and an rmtB 16S rRNA Methylase Gene. **Genome Announc**, v. 5, n. 6 :e01549-16, 2017.

YEGANEH SEFIDAN, F., MOHAMMADZADEH-ASL, Y., & GHOTASLOU, R. High-Level Resistance to Aminoglycosides due to 16S rRNA Methylation in Enterobacteriaceae Isolates. **Microbial Drug Resistance**, 2019.

- YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolysing β - lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.1151-1161, apr.2001.
- YIGIT, H. *et al.* Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.12, p.3881-3889, dec.2003.
- YIN, W. *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. **MBio.**, v. 8, n. 3, pii. e00543-17, 2017.
- YOKOYAMA, K; DOI, Y; YAMANE, K. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lancet**. 362, p. 1888–93, 2003.
- YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p. 5046–5054, 2009.
- YOON, EJ. *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in South Korea: a report from the National Laboratory Surveillance System. **Future Microbiol**, 13:771–83, 2018.
- ZACHARCZUK, K. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. **Antimicrobial. Agents Chemotherapy**, v. 55, p. 443–446, 2011.
- ZARKOTOU, O. *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 17, p. 1798–1803, 2011.
- ZEKA, A. N. *et al.* GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1145-1146, 2014.
- ZHANEL, G. *et al.* Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem-beta-lactamase inhibitor combinations. **Drugs**, v. 78, p. 65–98, 2018.
- ZHANG, R. *et al.* Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.574–576, 2007.
- ZHAO, F. *et al.* Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 5, ed. 4, 2010.
- ZHAO W-H, HU Z-Q. IMP-type metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. **Crit Rev Microbiol**, v. 37, p. 214-226, 2011.
- ZHOU, B. *et al.* Clinical and microbiological profile of babies born with risk of neonatal sepsis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 6, p. 3621-3625, 2016.

ZHU, Y. *et al.* Identification of an NDM-5-producing *Escherichia coli* Sequence Type 167 in a Neonatal Patient in China. **Scientific Reports**, v. 6:29934, 2016.

ZONG Z, PARTRIDGE SR, IREDELL JR. RmtC 16S rRNA methyltransferase in Australia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 794–795, 2008.

ZURFUH, K. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in river water and imported vegetable samples in Switzerland. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 2594–2595, 2016.

ZUSMAN, O. *et al.* Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 29–39, 2017.

POIREL L, GOUTINES J, AIRES-DE-SOUSA M, NORDMANN P. High Rate of Association of 16S rRNA Methylases and Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* Recovered from Hospitalized Children in Angola. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62(4):e00021-18, 2018.

de JONGE, BL. *et al.* *In vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 3163–3169, 2016.

KARLOWSKY, JÁ. *et al.* *In vitro* activity of imipenem against carbapenemase positive *Enterobacteriaceae* isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014. **J Clin Microbiol**, v. 55, p. 1638–1649, 2017.

PITOUT, JDD. *et al.* The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. **Clin Microbiol Rev**, 33(1), 2019.

TZOUVELEKIS, LS, *et al.* Carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae* : uma crise em evolução de dimensões globais. **Clin. Microbiol. Rev.** 25 682–707, 2012.

NATION, RL; VELKOV, T; LI, J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? **Clin Infect Dis**, v. 59, p. 88–94, 2014.

APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO



Journal of Global Antimicrobial Resistance

Available online 7 September 2019

In Press, Journal Pre-proof



Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil

Elza Ferreira Firmo ^a, Elizabeth Maria Bispo Beltrão ^a, Felipe Rogério Ferreira da Silva ^b, Luis Carlos Alves ^c, Fábio André Brayner ^c, Dyana Leal Veras ^c, Ana Catarina Souza Lopes ^a

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>

[Get rights and content](#)

Highlights

- First report of *P. mirabilis* and *S. marcescens* co-harboring bla_{KPC-2} and bla_{NDM-1} in Brazil.
- Association of AMEs, bla_{KPC-2} and bla_{NDM-1} genes in CPE.
- *K. pneumoniae* from colonization, resistant to polymyxin b and carrying aac(3)-IIa, aac(6)-Ib, bla_{KPC-2} and bla_{NDM-1}.

Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil.

Elza Ferreira Firmo^[1], *Elizabeth Maria Bispo Beltrão*^[1], *Felipe Rogério Ferreira da Silva*^[2], *Luis Carlos Alves*^[3], *Fábio André Brayner*^[3], *Dyana Leal Veras*^[3] and *Ana Catarina Souza Lopes*^[1].

[1] Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil. [2] Serviço de Patologia Clínica da Secretaria de Saúde de Pernambuco [3] Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhaes – IAM/FIOCRUZ-PE.

Corresponding author: Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas (CCM), Área de Medicina Tropical. Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Recife-PE, Brasil 50.732-970.

Phone: +55 81 21268526; **Fax:** +55 81 21268528

e-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com

Abstract

Objective

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are often involved in healthcare-associated infections worldwide. Therefore, the objective of this study was to investigate the frequency of the main genes for carbapenemases, methylases, aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), and *mcr* gene, as well as the clonal relationship of enterobacteria isolates resistant to carbapenems and aminoglycosides from colonization and infection in patients from hospitals in northeastern Brazil.

Methods

The antimicrobial susceptibility was determined by automated system, and the occurrence of carbapenemase, AME and 16S rRNA methylase genes, as well as *mcr*, was determined by PCR and amplicon sequencing. The genetic variability was determined by ERIC-PCR.

Results

Among the 35 isolates selected, because they were resistant to carbapenems and aminoglycosides, *Klebsiella pneumoniae* was the most detected, followed by *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*. AME genes were found in 97% of the isolates. The most common being *aph (3)-VI*, followed by *aac (6')-Ib*. *bla_{NDM-1}* and *bla_{KPC-2}* were detected in 26% and 89% of the isolates, respectively. Five isolates presented these genes concomitantly. According to the literature, this is the first report of the association of *bla_{NDM-1}* and *bla_{KPC-2}* in *P. mirabilis* and *S. marcescens* isolates. The isolates showed a multiclonal profile by ERIC-PCR.

Conclusions

The emergence of the bla_{NDM-1} associated with bla_{KPC-2} and AMEs genes in *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *S. marcescens* isolates, with a multiclonal profile is of concern, as this limits the therapeutic options. These results should alert medical authorities to institute rigorous methods of detection and thus reduce the spread of these bacterial genes.

Keywords

carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, NDM, KPC, aminoglycoside-modifying enzymes.

1. INTRODUCTION

The prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) causing Healthcare-Associated Infections (HAIs) poses a major threat to global public health (1). Among the species of enterobacteria involved in HAIs, *Klebsiella pneumoniae* is the most investigated. However, resistance to carbapenems has now been highlighted in less studied species such as *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*. The increasing tendency of these latter two species to acquire resistance is of concern, since they are intrinsically resistant to polymyxins and consequently only a limited number of antimicrobials remain available for clinical use (2).

Carbapenems have been considered to be the most effective antimicrobial agents for the treatment of HAIs. However, their usefulness has been limited due to the increased resistance mainly driven by the production of carbapenemases such as KPC, GES, VIM, IMP and more recently NDM (3). The first worldwide report of this enzyme occurred in a *K. pneumoniae* isolate from India in 2009 (4). In Brazil, the first report of bla_{NDM-1} was described in 2013 in a *Providencia rettgeri* isolate from the city of Porto Alegre (5). To date, this gene has been identified in several other species of enterobacteria (6,7,8,9).

Due to the rapid spread of carbapenemases, polymyxins were reintroduced as a last resort for the clinical treatment of CPE-infected patients. However, the inappropriate use of polymyxins in medicine and animal production allowed the bacteria to develop an acquired resistance mediated by the *mcr* (mobilized colistin resistance) gene (10). Generally the genes encoding the carbapenemases and the *mcr* are located in plasmids, which may also harbor other resistance determinants, including AME (aminoglycoside modifying enzymes) and 16S rRNA methylase genes (11). Enzymatic inactivation by producing AMEs is the most common

mechanism against aminoglycosides, followed by methylation of 16S rRNA which imparts a high level of resistance mainly to tobramycin, amikacin and gentamicin (12,13).

Therefore, the objective of this study was to investigate the frequency of the main genes for carbapenemases, methylases, aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), and *mcr* gene, as well as the clonal relationship of enterobacteria isolates resistant to carbapenems and aminoglycosides from colonization and infection in patients from three hospitals in the city of Recife-PE, in northeastern Brazil.

2. METHODS

2.1. BACTERIAL ISOLATES

Enterobacteriaceae clinical isolates from different patients were obtained from three hospitals of Recife-PE, Brazil, between 2016 and 2018. The inclusion criteria were that in addition to being resistant to at least one carbapenem, these isolates would also be resistant to at least one aminoglycoside. All the isolates were identified biochemically by VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), an automated system and were maintained as frozen stock at -20 °C with 15% glycerol.

2.2 TESTING FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

The antimicrobial susceptibility was determined by the automated VITEK® 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The antimicrobials tested included penicillin (ampicillin), β -lactam complexes/ β -lactamase inhibitors (ampicillin/ sulbactam, piperacillin/ tazobactam), monocyclic β -lactams (aztreonam), cephalosporins (cefepime, ceftazidime, cefuroxime, cefazolin, cefoxitin, ceftriaxone and cefotaxime), aminoglycosides (tobramycin, amikacin and gentamicin), fluoroquinolones (ciprofloxacin), carbapenems (ertapenem,

imipenem, meropenem) and tigecycline. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for the amikacin (AMI), gentamicin (GEN), tobramycin (TOB) and meropenem (MER) antimicrobials were confirmed by microdilution in broth, according to the recommendations and interpretative criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (14). The MIC of polymyxin B (PMB) by the microdilution method was carried out in accordance with the Brazilian Committee for Sensitivity Test (15). *Klebsiella pneumoniae* isolates with MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ were categorized as susceptible to polymyxin B, and those with MIC > 2 $\mu\text{g/ml}$ were considered resistant. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as standard strain in the antibacterial susceptibility test. The susceptibility to polymyxin B was tested only for *K. pneumoniae*, as *P. mirabilis* and *S. marcescens* presented intrinsic resistance to this antimicrobial.

2.3. DNA EXTRACTION, PCR AND SEQUENCING OF RESISTANCE GENES

Total DNA extraction was performed by using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. PCR was performed to detect the resistance genes using primers and the conditions according to the literature, and to detect carbapenem-resistant genes bla_{OXA-48}, bla_{BKC}, bla_{NDM}, bla_{KPC}, bla_{GES}, bla_{VIM}, bla_{IMP} and bla_{SME} (16,17,18), aminoglycoside-resistant genes, 16S rRNA methylase genes (armA, rmtD and rmtG), AME genes *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* and *aph(3')-VI* (19,13,20,21,22) and the *mcr* (10). Representative amplicons, positive for the resistance genes, were purified by the SV Total DNA Isolation System (Promega) and subjected to DNA sequencing (23). The results were analyzed using the BioEdit, Clustal and BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4. MOLECULAR TYPING BY ERIC-PCR

The genetic variability of the isolates, grouped by species, was determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR using primers: ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC-3) and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3) (24), and PCR conditions described in the literature. ERIC-PCR profiles were scored by fragment size using GelAnalyser software. The amplified fragments were analyzed and then classified as absent (0) or present (1) in order to aid the construction of dendrograms. The dendrograms and the similarity coefficient were obtained based on the average similarity of the matrix, according to the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), using DendroUPGMA (<http://genomes.urv.es/UPGMA>) (25).

3. RESULTS

3.1. SPECIES OF ENTEROBACTERIA DETECTED AND THE PROFILE OF SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIALS

Among the 35 *Enterobacteriaceae* isolates selected, because they were resistant to carbapenems and aminoglycosides, *K. pneumoniae* (n=16) was the most frequently detected species, followed by *P. mirabilis* (n=10) and *S. marcescens* (n=9). The isolates were collected from different specimens, including urine (n=12), tracheal secretion (n=7), blood (n=4), liquor (n=3), surgical wound (n=2), rectal swab (n=1), bone (n=1), lesion swab (n=1), abscess (n=1), sacral ulcer (n=1) and fibrosis (n=1) (**Table 1**).

The results from the profile of the antimicrobial susceptibility of the 35 isolates indicated high resistance rates to carbapenems, aminoglycosides, cephalosporins and quinolones in all three species (**Figure 1**). All isolates were resistant to one or more carbapenems, were always resistant to meropenem, the MIC ranging from 8 to 512 µg/mL (**Table 2**), and the isolates also exhibited high resistance rates to ertapenem and imipenem.

Considering only the resistance to the three aminoglycosides tested, 6 different phenotypes were observed, AMK and GEN/TOB being the most resistant, both with 28.5% (n=10). Five isolates were resistant to AMK, GEN and TOB. The MIC ranges for these antimicrobials ranged from 2 to 512 µg/mL, 1 to 256 µg/mL, 0.5 to 64 µg/mL, respectively (**Table 2**). As for polymyxin B, the MIC of 50% (8/16) of the *K. pneumoniae* isolates was >2 and these isolates were classified as resistant. The MIC for this antimicrobial ranged from 0.5 to 32µg/mL. Amicacin and tigecycline were the antimicrobials with best activity for *K. pneumoniae*, while gentamicin and piperacillin/tazobactam were the best against *P. mirabilis* and *S. marcescens*.

3.2. ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES

PCR results followed by sequencing the amplicons showed the following genes for carbapenemases: bla_{NDM-1} (n=9; 26%) and bla_{KPC-2} (n=31; 89%). Five isolates presented these two genes concomitantly. The genes for the bla_{OXA-48}, bla_{BKC}, bla_{GES}, bla_{VIM}, bla_{IMP} and bla_{SME} carbapenemase genes were not detected in this study

Thirty-four isolates (97%) harbored AME genes (**Table 3**). Among them, the most common was *aph(3)-VI*, its occurrence being 63% (n=22/35), and this was followed by *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa* and *ant(2'')*, their occurrence being 43% (n=15/35), 40% (n=14/35) and 20% (n=07/35) respectively. The *aac(3)-Ia* gene was not found. The combination of *aac(3)-IIa* and *aac(6')-Ib* was observed in seven (20.5%) isolates and *aac(6')-Ib*, *aph(3)-VI* in three (9%). Some samples had a high level of resistance to amikacin and gentamicin (MIC ≥128µg/mL), all of which were negative for the methylase genes tested (namely *armA*, *rmtD* and *rmtG*).

The *mcr-1* gene was investigated in *K. pneumoniae* isolates, but all were negative. This gene was not investigated in *P. mirabilis* and *S. marcescens* because of the intrinsic resistance to polymyxins of these species. Sequences of the antibiotic resistance genes including bla_{NDM-1}, bla_{KPC-2} were sent to the GenBank under the accession numbers: **MK442916**, **MK860790**, **MH891076**, **MK543945**, **MK543946**, **MK543948**.

3.3. ERIC-PCR

The ERIC-PCR analysis of the 16 isolates of *K. pneumoniae* showed that only 3 isolates (19%) (K4R3, K6R3 and K7R3) presented a single-band pattern, presenting 100% genetic similarity, that is, a clonal relationship. The other 13 isolates of *K. pneumoniae* presented heterogeneous profiles, with a maximum of 40% similarity (**Figure 2**). Regarding *S. marcescens* isolates, the S1U and S3U samples presented a unique profile, indicating a clonal relationship. It was also observed that the isolates S4U and S9U presented 80% similarity. The other isolates presented distinct genetic profiles. Finally, the analysis of the 10 isolates of *P. mirabilis* revealed that 20% of them (P5R3 and P7R3) shared the same profile when ERIC-PCR was used, and another 8 isolates showed a maximum of 20% similarity and were considered genetically unrelated (**Figure 2**).

3.4. COMPARATIVE ANALYSIS OF RESISTANCE GENES ACCORDING TO SPECIES

On conducting a comparative analysis with regard to resistance genes in the three species studied, we found that *K. pneumoniae* was the species with the highest occurrence of the bla_{NDM-1} and bla_{KPC-2} genes in a single isolate, and these were associated with the *aac(6')-Ib* and *aac(3)-IIa* genes, which was also shared by a *S. marcescens* isolate, S9U. Only the *P. mirabilis* P6R3 isolate had the bla_{NDM-1} and bla_{KPC-2} genes associated with the *aph(3)-VI* gene. In addition, was observed a *K. pneumoniae* isolate (K7R3) from a rectal swab that was a carrier of the bla_{NDM-1} and bla_{KPC-2} genes and presented a clonal relationship with two other infection isolates (K4R3 and K6R3) from the same hospital, but from different sectors.

Another point observed among the three species was the high prevalence of the bla_{KPC-2} gene, in addition to the emergence of bla_{NDM-1}. Among the AME genes, *aph(3)-VI* was observed in all *P. mirabilis* isolates, 67% of *S. marcescens* and only 37% of *K. pneumoniae*. However, the highest occurrence of acetyltransferases, represented by *aac(6')-Ib* and *aac(3)-*

Ila genes, was observed in the *K. pneumoniae* species. This species also had a higher occurrence of the *ant(2'')-Ia* gene.

4. DISCUSSION

The global incidence of carbapenem-producing Enterobacteriaceae (CPE) has increased considerably, but the species *P. mirabilis* and *S. marcescens* are still neglected and few have been studied. This fact is very worrying, since the production of carbapenemases by species intrinsically resistant to polymyxins represents a risk to therapeutic success and contributes to high mortality rates due to HAIs caused by these bacteria (26,27).

In Brazil, KPC has been endemic since 2006, and was first reported in the city of Recife-PE (28), but recently NDM has been detected in isolates of Gram-negative bacteria in several regions of the country, mainly in *K. pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* (11,6). In this paper, it was observed that most of the isolates that had the *bla*_{NDM-1} gene also had the *bla*_{KPC-2} gene and different genes encoding AMEs (*aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib* and *aph(3)-VI*). This data shows the persistence of KPC over the years in the Northeast of Brazil and gives evidence of the emergence of a new carbapenemase, NDM. To our knowledge, this is the first study to describe the association of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} in isolates of *P. mirabilis* and *S. marcescens*, as well as the association with AME genes. This association of resistance demonstrates the rapid evolution of these bacteria and their ability to acquire and maintain different genes, indicating the urgent need for investigations into the genetic environment where these genes are found.

With respect to the resistance to aminoglycosides, disparities were observed between the phenotypic profile and the genotypic profile Fernandez-Martinez et al. (29) also found disparities of this type. It is a complex matter to establish the exact relationship, since a certain enzyme can modify different aminoglycosides and an isolate may or may not express the AME gene that it presents. In addition, inefficient acetylation also impairs inactivation of the

aminoglycoside (12). On the other hand, when the prevalence of the genes found by species is observed in isolation, they are in agreement with the predominance of the phenotypic profile, as, for example, is observed in isolates of *P. mirabilis* and *S. marcescens* resistant to amikacin and that presented predominantly the *aph(3')-VI* gene, the main gene responsible for resistance to this antimicrobial.

Likewise, a high prevalence of the *aac(3)-IIa* gene was observed in *K. pneumoniae* isolates, which showed high levels of resistance to gentamicin (12). It is also worth mentioning that perhaps the high MICs for amikacin and gentamicin found in this study are due to the presence of other 16S rRNA methylase genes that have not been researched, as observed by Kumarasamy et al (30) and Wu et al (7) in other species.

The high percentages of bacterial resistance to carbapenems and cross-resistance to various antimicrobials observed in this study are worrying. In our study it was observed that the majority of isolates exhibited a high level of resistance to almost all antimicrobial agents tested, including cephalosporins from a broad spectrum, carbapenems, quinolones, aminoglycosides and polymyxin B. Recent studies warn of the significant growth of resistance to polymyxin in *Enterobacteriaceae* producing carbapenemases, thereby suggesting a strong association between the presence of carbapenemases and the decrease of polymyxin activity against these isolates (31,32).

This study shows the presence of the high level of resistance to polymyxin B among half of the isolates of *K. pneumoniae*, all of which are carbapenem positive. The K7R2 isolate should be given most attention, since it is also a carrier of the *bla_{NDM-1}* and has a MIC that is considered to be high for polymyxin B. Despite the high polymyxin B resistance rate detected in this study, the *mcr-1* was not found. It should be noted that polymyxin resistance in *K. pneumoniae* is mainly related to chromosomal mutations in two-component regulatory systems

involved in the lipopolysaccharide synthesis pathway (33), even though the *mcr-1* has already been described in this bacterial species (34,35).

ERIC-PCR demonstrated that *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *S. marcescens* presented a multiclonal profile. This genetic variability, which has also been observed in previous studies (36,37,38), is essential for the persistence of these species in the hospital environment. Colonization isolates carrying several resistance genes and presenting clonal relationships with other isolates indicate a high probability that patients are serving as reservoirs for bacteria bearing the bla_{NDM-1} and bla_{KPC-2} genes and other resistance determinants. These findings are worrying, since the association of these resistance mechanisms further limits the antimicrobial options available for the treatment of HAIs by these bacteria.

Therefore, data from the present study point to the emergence of the bla_{NDM-1} gene, associated with bla_{KPC-2} and AME genes, in isolates of enterobacteria which have a multi-clonal profile, and we stress that these genes have been found in *P. mirabilis* and *S. marcescens*, which are species that have received little attention from researchers. We emphasize that if the emergence of the bla_{NDM} gene is not contained, there is a great risk that this gene will become endemic in Brazil and in other countries, as occurred with the bla_{KPC} gene. These results should alert medical authorities to institute rigorous methods of detection and thus reduce the spread of these bacterial genes.

Declarations

Funding:

This work was supported by the Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) – Ministério da Saúde – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) [APQ-0837-2.12/17].

Competing Interests: None declared.

Ethical Approval: The bacterial isolates used came from the project that was approved by the Ethics Committee for Ethics in Research that involves human beings (CEP / Plataforma Brasil), and that was registered under the number CAAE: 88576518.0.0000.5208.

Acknowledgments

Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ-PE.

Figure 1 - Antimicrobial resistance profile of *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*. All isolates were pre-selected based on resistance to carbapenems and aminoglycosides.

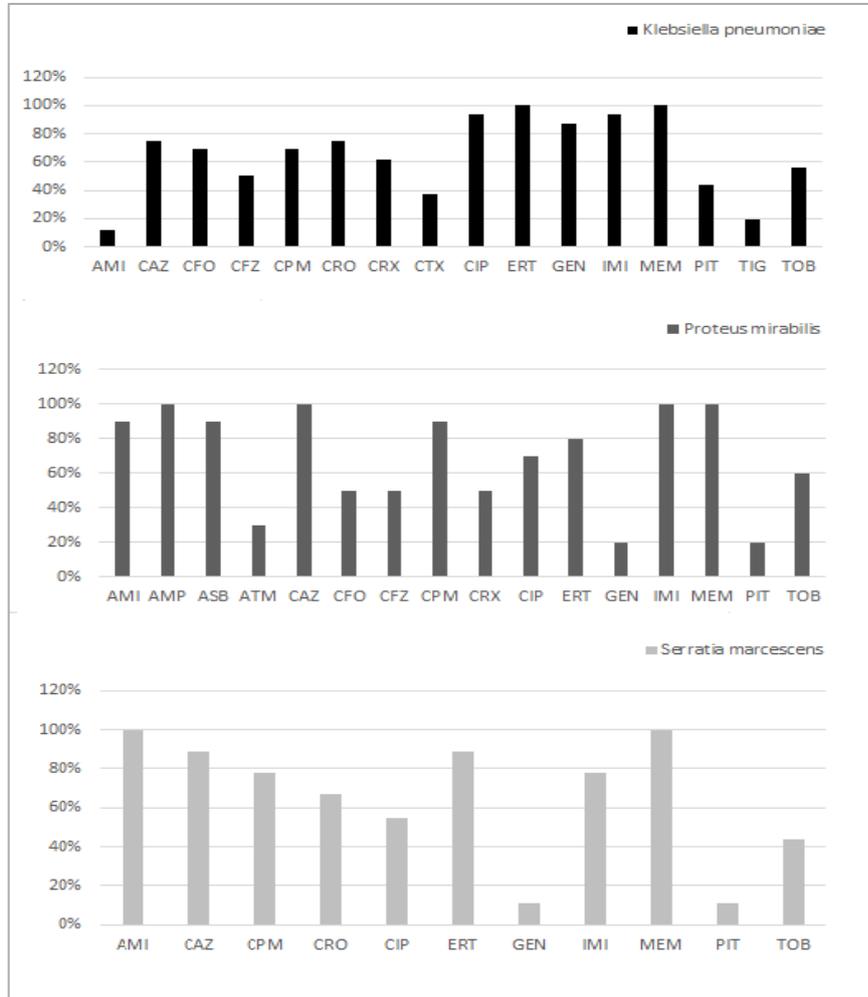


Table 1 - Origin and antimicrobial resistance profile of *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* from three hospitals in the years 2016 and 2018 of Recife-PE, Brazil.

Isolates	Date of isolation (mm/dd/yy)	Site of isolation	Hospital unit	Antimicrobial resistance profile
1. K7-R2	04/25/2016	Urine	Adult ICU	CPM, CAZ, CRX, ERT, GEN, IMI, MEM, PMB
2. K10-R2	05/22/2016	Urine	Medical Clinical	CFZ, CPM, CAZ, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM
3. K11-R2	05/25/2016	Urine	Ortopedics	CFZ, CPM, CAZ, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, PMB
4. K1-R3	10/31/2017	Urine	Adult ICU	CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, AMK, GEN, ERT, IMI, MEM, PMB
5. K2-R3	10/06/2017	Urine	Traumatology	CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, GEN, ERT, IMI, MEM
6. K4-R3	09/14/2018	Urine	Adult ICU	ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, MEM, TIG, TOB
7. K5-R3	09/13/2018	Operative wound	General ICU	CFZ, CPM, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TOB
8. K6-R3	09/14/2018	Bone	Ortopedics	ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TIG, TOB
9.K7-R3	09/17/2018	Rectal Swab	Adult ICU	CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TIG, TOB
10. K2-U	09/22/2016	Tracheal aspirate	General ICU	CPM, CAZ, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, PIT, PMB
11. K8-U	03/10/2017	Cerebrospinal fluid	Neurology	AMK, CPM, CAZ, CRO, CRX, CFO, CTX, CIP, IMI, MEM, ERT, PIT, PMB
12. K2-C4	12/15/2016	Urine	ICU	

				CAZ, CRO,CFO, CTX, CIP, IMI, MEM, ERT, GEN, PIT, TOB
13. K3-C4	01/04/2016	Rectal Swab	ICU	AMP, CRO, CFO, CTX, CIP, PIT, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PMB
14. K5-C4	02/12/2016	Tracheal aspirate	ICU	CRO, CFO, CTX, CIP, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PIT, PMB
15. K6-C4	03/02/2016	Tracheal aspirate	ICU	CRO,CFO, CTX,CIP, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PIT
16. K7-C4	01/15/2017	Blood	ICU	CRO, CFO, CTX, CIP, GEN, TOB, MEM, IMI, ERT, PIT, PMB
17. P1-U	07/29/2016	Urine	General ICU	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, CIP, ERT, MEM, IMI
18. P2-U	07/30/2016	Urine	General ICU	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, CIP, GEN, MEM, IMI, ERT, TOB,
19. P4-U	05/19/2016	Blood	General ICU	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, MEM, IMI, ERT, PIT
20. P8-U	09/22/2016	Tracheal aspirate	Isolation	AMP, ASB, AMK, CPM, CAZ, MEM, IMI, PIT
21. P1-C4	03/02/2016	Lesion Swab	ICU	AMP, AMK, CAZ, CRO, CIP, MEM, IMI, GEN, TOB
22. P2-R3	10/23/2017	Abscess	General ICU	AMP, ASB, AMK, ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT
23. P3-R3	10/25/2017	Urine	General ICU	AMP, ASB, AMK, ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
24. P5-R3	11/01/2017	Cerebrospinal fluid	Neurology	AMP, ASB, AMK, ATM, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
25. P6-R3	04/09/2018	Sacral ulcer	Adult ICU	AMP, ASB, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, GEN, MEM, IMI, ERT, TOB
26. P7-R3	04/29/2018	Urine	Adult ICU	AMP, ASB, AMK, CFZ, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB

27. S1- R3	03/21/2018	Fibrosis	Ortopedics	AMK, CPM, CAZ, CRO, CIP, MEM, ERT, IMI
28. S2- R3	09/08/2018	Operative wound	General ICU	AMK, CPM, CAZ, CRO, CIP, ERT, MEM, TOB
29. S1- R2	04/07/2016	Cerebrospinal fluid	Neurology	AMK, CAZ, CIP, ERT, GEN, IMI, MEM, TOB
30. S1- U	05/01/2016	Tracheal aspirate	General ICU	AMK, CPM, CAZ, CRO, MEM
31. S2- U	05/03/2016	Urine	General ICU	AMK, CPM, CAZ, CRO, MEM, IMI, ERT
32. S3- U	06/01/2016	Tracheal aspirate	General ICU	AMK, CPM, CAZ, CRO, MEM, IMI, ERT
33. S4- U	05/30/2016	Tracheal aspirate	General ICU	AMK, CPM, CAZ, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
34. S9- U	09/02/2016	Blood	General ICU	AMK, CPM, CAZ, CIP, MEM, IMI, ERT, TOB
35. S1- C4	09/29/2016	Blood	ICU	AMK, CRO, MEM, IMI, ERT, PIT

K: *Klebsiella pneumoniae*; **P:** *Proteus mirabilis*; **S:** *Serratia marcescens*. **R/C:** public hospital; **U:** private hospital; **AMP:** ampicilin; **ASB:** ampicilin/sulbactam; **ATM:** aztreonam; **AMK:** amikacin; **CFZ:** cefazolin; **CPM:** cefepime; **CFO:** cefoxitin; **CAZ:** ceftazidima; **CRO:** ceftriaxona; **CRX:** cefuroxima; **CTX:** cefotaxime; **CIP:** ciprofloxacin; **GEN:** gentamicin; **TOB:** tobramicina; **MEM:** meropenem; **IMI:** imipenem; **ERT:** ertapenem; **PIT:** piperacilina/tazobactam; **PMB:** polymyxin B; **TIG:** tigeciclina. **ICU:** intensive care unit.

Table 2 - Clonal, genotypic and phenotypic profile of isolates *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* from three hospitals in the years 2016 and 2018 of Recife, Brazil.

Isolate	ERIC	Resistance determinants	MIC($\mu\text{g/ mL}$)				
			PB	AMK	GEN	TOB	MEM
1. K7-R2	E2 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	16	16	128	4	16
2. K10-R2	E1 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	2	2	16	1	16
3. K11-R2	E5 _K	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i> <i>aph(3)-VI</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	4	8	64	4	16
4. K1-R3	E9 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	4	64	16	4	32
5. K2-R3	E7 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	2	2	64	2	64
6. K4-R3	E14 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	1	4	256	16	32
7. K5-R3	E13 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3)-VI</i>	1	8	64	16	32
8. K6-R3	E14 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	0,5	4	128	16	64
9. K7-R3	E14 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	1	4	64	16	64
10. K2-U	E6 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	4	16	16	1	16
11. K8-U	E11 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	32	64	1	1	16
12. K2-C4	E10 _K	<i>bla</i> _{KPC}	0,5	16	32	8	64
13. K3-C4	E8 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	4	4	128	16	32
14. K5-C4	E4 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	4	4	128	16	64
15. K6-C4	E12 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>ant(2)-Ia</i>	2	2	128	16	64
16. K7-C4	E3 _K	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	4	16	32	32	64
17. P1-U	E3 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	128	4	4	16
18. P2-U	E7 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3)-VI</i> ,	IR	128	256	16	16
19. P4-U	E2 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	32	4	4	8
20. P8-U	E4 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	4	16

21. P1-C4	E9 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i>	IR	128	8	16	16
22. P2-R3	E1 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	4	16
23. P3-R3	E5 _P	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	IR	64	16	32	16
24. P5-R3	E6 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i>	IR	256	4	16	256
25. P6-R3	E8 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	256	128	16	16
26. P7-R3	E6 _P	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3)-VI</i>	IR	512	16	64	128
27. S1-R3	E3 _S	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	0,25	512
28. S2-R3	E4 _S	<i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(6)-Ib</i>	IR	64	2	16	128
29. S1-R2	E5 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>ant(2)-Ia</i>	IR	64	256	32	256
30. S1-U	E6 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	32	1	1	16
31. S2-U	E1 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	1	1	16
32. S3-U	E6 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	1	1	16
33. S4-U	E7 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	64	4	16	16
34. S9-U	E7 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6)-Ib</i>	IR	64	2	16	128
35. S1-C4	E2 _S	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aph(3)-VI</i>	IR	128	4	1	16

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-polymerase chain reaction. **PB:** polymyxin B; **AMK:** amikacin; **GEN:** gentamicin; **TOB:** tobramycin; **MEM:** meropenem. **IR:** intrinsically resistant to polymyxins.

Table 3 - Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) genes and correlation with expected and observed antibiograms in 35 Enterobacteriaceae isolates producing carbapenemases.

AME gene	N° of isolates	Expected resistance phenotype	Observed phenotype (N° of isolates)
<i>aph(3)-VI</i>	14	AMK	As expected (10) AMK, GEN, TOB (1) AMK, TOB (1) GEN, TOB (1) GEN (1)
<i>ant(2'')-Ia</i>	1	GEN, TOB	As expected (1)
<i>aac(6')-Ib</i>	1	AMK, TOB	As expected (1)
<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib</i>	7	AMK, GEN, TOB	GEN, TOB (5) AMK, TOB(1) GEN (1)
<i>aac(3)-IIa, ant(2'')-Ia</i>	2	GEN, TOB	AMK, GEN, TOB (1) GEN (1)
<i>aac(3)-IIa, aph(3)-VI</i>	2	AMK, GEN, TOB	As expected (1) GEN, TOB (1)
<i>aac(6')-Ib, aph(3)-VI</i>	3	AMK, TOB	As expected (1) AMK, GEN, TOB (2)
<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, ant(2'')-Ia</i>	1	AMK, GEN, TOB	GEN(1)
<i>aac(6')-Ib, aph(3)-VI, ant(2'')-Ia</i>	1	AMK, GEN, TOB	As expected (1)
<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, ant(2'')-Ia, aph(3)-VI</i>	2	AMK, GEN, TOB	GEN(1) AMK, GEN (1)
None	1		GEN, TOB
Total N° of isolates	35		

AMK: amikacin; **GEN:** gentamicin; **TOB:** tobramycin.

References

1. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2016; p. 460-469 DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
2. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert review of anti-infective therapy*. 2017; 15 DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1316193>
3. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Scj (Basel)*. 2017; 6: p. 1 DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/medsci6010001>
4. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12): p. 5046-5054 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
5. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beirão GC, Chagas TP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: p. 2956-2957 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt298>
6. da Silva IR, Aires CA, Conceição-Neto OC, Olivera Santos IC, Ferreira Pereira N, J MS, et al. Distribution of clinical NDM-1-producing Gram-Negative bacteria in Brazil. 2019 DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0240>

7. Wu W, Feng Y, Carattoli A, Zong Z. Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM carbapenemases by whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: p. 6625-6628 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01275-15>
8. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res.* 2015; 48(2): p. 174-177 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144154>
9. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, A ME, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist.* 2015; 21(2): p. 234-236 DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2014.0171>
10. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16: p. 161-168 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
11. Aires CA, Pereira PS, de Araujo CF, Chagas TP, Oliveira J, Buonora S, et al. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;; p. 1-6 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01048-16>
12. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates.* 2010; 13(6): p. 151-171 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>

13. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: p. 88-94 DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/518605>
14. CLSI CaLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement M100-S28. [Online]. Wayne, PA.; 2018.
15. BrCAST BCoAST.; 2017. Available from: <http://brcast.org.br/>.
16. Dong F, Xu X, Song W, Lu P, Yu S, Yang Y, et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a pediatric clinic in China. *Chhin Med J.* 2008; 121: p. 1611-1616. PMID: 19024085
17. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle J, Steward C, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2001; 45(4): p. 1151-1161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
18. Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore D, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class a beta-lactamase, SME-1, from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38: p. 1262-1270 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.38.6.1262>
19. Lee H, Yong D, Yum J, Roh K, Lee K, Yamane Y, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 56: p. 305-312 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.002>

20. Bueno MC, Francisco GR, O'Hara JA, Garcia DO, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): p. 2397-2400 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02108-12>
21. Huang J, Ye M, Jia X, Yu F, Wang M. Coexistence of armA and genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Acinetobacter baumannii*. *Afric J Microb Res*. 2012; 6(25): p. 5325-5330 DOI: 10.5897/AJMR11.1529
22. Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol*. 1999; 150: p. 317-322 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80057-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80057-6)
23. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 74: p. 5463-5467 DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
24. Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res*. 2009; 109: p. 511-517 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>
25. Garcia-Vallvé S, Palau J, Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol*. 1999; 16: p. 1125-1134 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026203>
26. Phan H, Stoesser N, Maciucă I, Toma F, Szekely E, Flonta M, et al. Illumina short-read and MinION long-read WGS to characterize the molecular epidemiology of an NDM-1

- Serratia marcescens outbreak in Romania. The Journal of Antim Chemother. 2017; 73(3): p. 672-679 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx456>
27. Qin S, Qi H, Zhang Q, Zhao D, Liu Z, Tian H, et al. Emergence of extensively drug-resistant *Proteus mirabilis* harboring a conjugative NDM-1 plasmid and a novel *Salmonella* genomic island 1 variant, SGI1-Z. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59: p. 6601-6604 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00292-15>
28. Monteiro J, Santos A, Asensi D, Peirano G, Gales A. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2009;: p. 333-334 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00736-08>
29. Fernandez-Martinez M, Castillo BR, Lecea-Cuello MJ, Rodriguez-Baño J, Pascual A, Martínez LM. Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing extended spectrum beta-lactamases collected in two multicenter studies in Spain. Microb Drug Res. 2017 DOI: <http://doi.org/10.1089/mdr.2017.0102>
30. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: p. 243-244 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr431>
31. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins:antibacterial activity, susceptibility testing and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017; 30: p. 557-96 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
32. Bradford PA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Wise MG, Hackel M, Sahm DF. Correlation of beta-lactamase production and colistin resistance among Enterobacteriaceae

- isolates from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 60(3): p. 1385-1392 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01870-15>
33. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci.* 2010; 17: p. 60 DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-17-60>
34. Li A, Yang Y, Miao M. Complete Sequences of mcr-1-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum- β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(7): p. 4351-4354 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00550-16>
35. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, De Angelis L, Fortunato S, et al. mcr1.2, a New mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2016; 60(9): p. 5612-5615 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01075-16>
36. de Cássia Andrade Melo R, de Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Current microb.* 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-014-0662-0>
37. Souza Lopes AC, Rodrigues JF, Morais Junior MA. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. 2005; 160: p. 37-46 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.007>

38. Cabral AB, de Cássia Andrade Melo R, Maciel MAV, Souza Lopes AC. Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45: p. 572-578 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000500007>

APÊNDICE B – ARTIGO ACEITO

Journal of Global Antimicrobial Resistance

In vitro activity of polymyxin B in combination with meropenem, amikacin and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates coharboring AMEs, bla NDM-1 and bla KPC-2

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JGAR-D-20-00020
Article Type:	Original Article
Keywords:	Synergism; carbapenemases; polymyxin B; meropenem; Amikacin; gentamicin
Corresponding Author:	ELZA FERREIRA FIRMO, Msc Recife, PE BRAZIL
First Author:	Elza Ferreira Firmo, Msc
Order of Authors:	Elza Ferreira Firmo, Msc Jorge Belém Oliveira Júnior Alexsandra Maria Lima Scavuzzi Luis Carlos Alves Fábio André Brayner Dyana Leal Veras Ana Catarina Souza Lopes
Abstract:	<p>Objective Multidrug resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> which carries bla NDM-1 and bla KPC-2 genes is a worldwide concern and combination antimicrobial therapy may be the only viable option. Therefore, the aim of this study was to investigate in vitro, using subinhibitory concentrations of each antibiotic, combination therapy with polymyxin B (PMB), meropenem (MEM), amikacin (AMK) and gentamicin (GEN) against two clinical isolates of bla NDM-1, bla KPC-2 and AMEs and resistant to polymyxin B.</p> <p>Methods In this study, synergistic and bactericidal activity were evaluated by checkerboard and time-kill, against two clinical isolates of polymyxin B-resistant <i>K. pneumoniae</i> which are resistant to polymyxin B (PMB) and are carriers of the bla NDM-1, bla KPC-2, aac(3)-IIa, aac(6)-Ib aph(3)-VI and ant(2)-Ia genes. Five combinations using the antimicrobials polymyxin B, meropenem (MEM), amikacin (AMK) and gentamicin (GEN) were evaluated.</p> <p>Results The PMB/MEM and PMB/AMK combinations proved to be the best options against these isolates, mainly because they demonstrated bactericidal activity when using subinhibitory concentrations of these antimicrobials.</p> <p>Conclusions In conclusion, the combinations used in this study were synergistic against NDM- and KPC-producing isolates, but, given the bactericidal activity, the combinations of PMB/MEM and PMB/AMK, were the most active against these isolates. It also can be concluded that the antimicrobials to which bacteria were resistant could be part of these combinations.</p>

In vitro activity of polymyxin B in combination with meropenem, amikacin and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates coharboring AMEs, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2}

Running Title: Synergistic combinations against *K pneumoniae*

Elza Ferreira Firmo^[1], *Jorge Belém Oliveira Júnior*^[1], *Alexsandra Maria Lima Scavuzzi*^[1], *Luis Carlos Alves*^[2], *Fábio André Brayner*^[2], *Dyana Leal Veras*^[2] and *Ana Catarina Souza Lopes*^[1].

[1] Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil. [2] Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhaes – IAM/FIOCRUZ-PE.

Corresponding author: Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas (CCM), Área de Medicina Tropical. Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Recife-PE, Brasil 50.732-970.

Phone: +55 81 21268526; **Fax:** +55 81 21268528

e-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com

Abstract

Objective

Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* which carries *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} genes is a worldwide concern and combination antimicrobial therapy may be the only viable option. Therefore, the aim of this study was to investigate *in vitro* activity of combinations of polymyxin B (PMB) with meropenem (MEM), amikacin (AMK) and gentamicin (GEN) in subinhibitory concentrations against two clinical isolates of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} and AMEs and resistant to polymyxin B.

Methods

In this study, synergy and bactericidal activity were evaluated by checkerboard and time-kill, against two clinical isolates of polymyxin B-resistant *K. pneumoniae* which are resistant to polymyxin B (PMB) and are carriers of the *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}, *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib* *aph(3)-VI* and *ant(2)-Ia* genes. Five combinations using the antimicrobials polymyxin B, meropenem (MEM), amikacin (AMK) and gentamicin (GEN) were evaluated.

Results

The PMB / MEM and PMB / AMK combinations proved to be the best options against the K7R2 isolate, mainly because they demonstrated bactericidal activity when using subinhibitory concentrations of these antimicrobials. However, none of the studied combinations were bactericidal against the K11R2 isolate.

Conclusions

In conclusion, the combinations used in this study showed synergy against NDM and KPC producing isolates, but, given the bactericidal activity, the combinations of PMB / MEM

and PMB / AMK were the most active only against one isolate. It also can be concluded that the antimicrobials to which the bacteria were resistant could be part of these combinations.

Keywords: Synergy; carbapenemases; polymyxin B; meropenem; amikacin; gentamicin.

1. Introduction

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* poses a threat to human health worldwide. Among the enzymes responsible for the resistance to carbapenems, metallo- β -lactamase New Delhi (NDM) deserves attention due to its localization in mobile genetic elements and to its coexistence with many other determinants of resistance such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) (1,2,3). Because they are typically resistant to all β -lactams and many other classes of antimicrobials, the infections caused by NDM and KPC-producing isolates are extremely difficult to treat, especially when monotherapy is used, as this leads to an increase in morbidity and economic costs (4).

In recent years, polymyxins have regained significant interest as a consequence of the increasing incidence of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria, especially *K. pneumoniae*. In contrast, recent studies demonstrate the growth of resistance to polymyxin B in gram-negative bacteria, both worldwide and in Brazil (1,5). In this scenario, combined therapy has been proposed as a strategy to increase antimicrobial activity and to reduce the emergence of resistance (6,7,8).

Unfortunately, the optimal combinations of antibiotics which are used in clinics to treat healthcare associated infections (HAIs) caused by *K. pneumoniae* MDR remain uncertain and are used empirically. Although there is some researches which is reporting *in vitro*

combinations that are effective against these bacteria, it is critical to continue the search for combinations in order to maintain the clinical efficacy of currently used antimicrobials (6,7,9). Therefore, the aim of this study was to investigate *in vitro* activity of combinations of polymyxin B (PMB) with meropenem (MEM), amikacin (AMK) and gentamicin (GEN) in subinhibitory concentrations against two clinical isolates of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} and AMEs and resistant to polymyxin B.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

For this study, two *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates of patients from a hospital in Recife, PE, Brazil, were selected. The K7R2 and K11R2 isolates were obtained from urine. The susceptibility profile and presence of the genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1}, *aac(3)-IIa* and *aac(6)-Ib*, *aph(3)-VI* and *ant(2)-Ia* had been determined in a previous study (1), which showed resistance to meropenem (MEM) and gentamicin (GEN), and susceptibility to amikacin (AMK). The interpretative criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) of 2018 (10) were used.

2.2. Chequerboard analysis

The chequerboard microdilution panel method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the combinations amikacin/meropenem, gentamicin/meropenem, amikacin/polymyxin B, gentamicin/polymyxin B and polymyxin B/meropenem. The MICs of each antibiotic were also determined by broth microdilution tests, and the data obtained from these tests were used in calculations of synergy. For the K7R2 isolate, the concentrations tested were: 0.25-32 mg/L for amikacin, meropenem and polymyxin B, and 2-256 mg/L for gentamicin. While for the K11R2 isolate, the concentrations tested were: 0.12-16 mg/L for amikacin, 0.25-32 mg/L for meropenem, 0.06-8 mg/L for polymyxin B and

1-128 mg/L for gentamicin. Dilutions were tested in triplicate. The inoculum of each bacterial isolate was prepared in cation-adjusted Mueller-Hinton broth with 0.5 McFarland standard and added to the wells at a final concentration of 5×10^5 colony forming unit (CFU)/mL in a final total volume of 100 μ L per well.

The plates were incubated for 18–20h at 37°C and the presence or inhibition of microbial growth was determined visually. Total fractional inhibitory concentrations (FICs) for each well were calculated according to the formula: $\sum \text{FIC} = \text{FIC of agent A} + \text{FIC of agent B}$, where the FIC of agent A or B = MIC of agent A or B in combination/MIC of agent A or B alone. In interpreting the results of calculations, the following principles were used: $\sum \text{FIC}$ values of ≤ 0.5 indicate ‘synergy’, $\sum \text{FIC}$ values of $> 0.5 - 4$ indicate ‘indifference’ and $\sum \text{FIC} > 4$ ‘antagonism’ (11).

2.3. Time–kill assays

Time–kill assays were performed with *K. pneumoniae* K7R2 and K11R2 to confirm activity of the combination. Mueller–Hinton broth 2 (cation adjusted) (Sigma-Aldrich) was inoculated with the bacterial suspension to reach a final inoculum of 10^5 CFU/mL. The antimicrobial concentrations tested were $0.125 \times \text{MIC}$ (subinhibitory concentration) for all antimicrobials. Control experiments without an active compound (i.e. a bacterial growth curve) were conducted simultaneously with the time–kill studies.

Samples were taken from each of the bacteria/drug concentrations at 0, 3, 6, 12 and 24 h from the time that the drug was added. Aliquots were plated Mueller–Hinton agar (Kasvi) plates. Bacterial counts (expressed as \log_{10} CFU/mL) were performed after incubation from 18–24 h at 37°C. At each time interval, the \log_{10} value of the viable colony count was determined. All experiments were performed in triplicate.

Bacteriostatic activity was defined as a $<3 \log_{10}$ CFU/mL decrease in the colony count. Bactericidal activity was defined as a $>3 \log_{10}$ CFU/mL decrease in the colony count, at 24h hours, relative to the initial inoculum. Regrowth was defined as an increase in the colony count from a previous time point. Synergy was defined as a $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL lower colony count at 24 hours compared to the most active agent alone. Indifference was defined as a change in the colony count at 24 hours within $2 \log_{10}$ CFU/mL compared to the most active agent alone. Antagonism was defined as a $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL higher colony count at 24 hours compared to the most active agent alone (12).

3. Results

The susceptibilities for K7R2 and K11R2 strains and checkerboard results are listed in **Table 1**. Both isolates were resistant to meropenem (MIC 16 mg/L), polymyxin B (MICs 4 and 16 mg/L) and gentamicin (MICs 64 mg/L and 128 mg/L), respectively. Amikacin was the most active antimicrobial tested, with MICs of 8 and 16 mg/L.

The checkerboard assay revealed a synergy on the five combinations tested in both isolates, even though they are susceptible only to amikacin and carriers of AMEs, *bla_{NDM-1}* and *bla_{KPC-2}* genes. Considering the smallest Σ FIC found, the combinations of PMB with AMK and PMB with MEM performed better on the K7R2 isolate with a 16-fold reduction in the MIC of PMB when combined, compared to its use alone.

Similarly, for isolate K11R2, PMB and AMK was the best combination with about a 32-fold decrease in the MIC of the PMB. Antagonism was not observed with any isolate.

Time-kill curves for AMK, GEN, MEM and PMB and of the respective combinations evaluated in relation to isolates K7R2 and K11R2 are shown in **Figure 1**. Against K7R2, it was observed that MEM and PMB which was used alone produced a reduction in the colony count when compared with the growth curve and a bacteriostatic activity. However, against K11R1,

an NDM-only producer, a new growth was observed after 6h for both antimicrobials. GEN was ineffective against both isolates and presented a performance similar to the control of growth. AMK demonstrated activity against both isolates until 6h after the onset of exposure, but regrowth was observed after this period. In both isolates, synergy was observed in the combinations tested in this study, except for the combination of PBM and GEN (**Figure 1**). MEM in combination with AMK or GEN against the K7R2 isolate resulted in bactericidal activity, with no CFU/mL being detected after 12h, but the combinations of PBM with AMK and MEM showed better bactericidal activity, with no bacterial growth after 6h. For the K11R2 isolate, although the combinations tested (0.125X MIC) showed synergy, a reduction of >3 \log_{10} CFU/mL in the number of colonies was not observed. Therefore there was no bactericidal activity.

4. Discussion

In this study, we evaluated the antibacterial effects of combinations including PMB, MEM, AMK and GEN against clinical isolates of *K. pneumoniae* that produced AMEs, NDM-1 and KPC-2 and were resistant to polymyxin B. The use of these antimicrobials alone was ineffective and there was regrowth after 6h in most cases, which is suggestive of selection of resistant populations and potential clinical failure, as found by Lim et al. (13) and Cai et al. (14). In the case of GEN, its use alone was irrelevant and its time kill curve was similar to the growth curve, this may be due to the high MICs found for this antimicrobial, in both isolates. In addition, high MICs may have directly influenced for lower performance of combinations involving GEN.

In contrast, the *in vitro* efficacy of the PMB/MEM and PMB/AMK combinations was demonstrated. In our study, we found a synergy among the antimicrobials, even though both isolates present resistance to PMB, MEM and GEN. However, in the time-kill tests, we

observed a bactericidal effect only on the K7R2 isolate, which may have been due to the doubling of the polymyxin B concentration as compared to the K11R2 isolate, since the MICs of the isolates were different. Different antibacterial activity among isolates with a similar resistance profile was also observed by Alves et al. (15) and Lim et al. (13).

In combination trials it is important to consider the concentrations of antimicrobials used. Some studies show that this concentration can directly influence synergy (15,16). Similar to Alves et al., this study found synergy on using subinhibitory antimicrobial concentrations and within the breakpoints set by the CLSI (2018) which may be more useful for clinical practice than results obtained from studies that used concentrations which are much higher than those that are physiologically achievable. Moreover, unlike Kulengowski et al. (16), it was not possible to state that synergy was directly dependent on the MIC of meropenem, as only one concentration was used.

Despite the development of new antimicrobials to tackle infections caused by multiresistant microorganisms, it is noteworthy that these new drugs are ineffective against producers of metallo- β -lactamase such as NDM (17). Therefore, it is important for research to be carried out to find combinations that may be able to treat these infections. Even with the high resistance to meropenem, some *in vitro* studies show that meropenem has been effective when combined with other antimicrobials against carriers of the *bla*_{NDM} gene (9,18).

Other studies have demonstrated the efficacy of combinations involving polymyxin B against isolates that carry the *bla*_{NDM} gene (8,14,16). Cai et al. investigated combinations of PMB with other antimicrobials, including AMK and MEM, in four extensively drug-resistant *E. cloacae* isolates containing the enzymes NDM-1 or IMP-1. Similarly to this study, we found synergy and a bactericidal effect in the combinations of PMB/MEM and PMB/AMK, but at a 32-fold lower meropenem concentration.

Evaluating the combination of meropenem with amikacin, Kulengowski et al. (2018) demonstrated synergy and bactericidal activity of this combination against amikacin-sensitive KPC-producing isolates with a kill-time of about 8 hours. However, in our study, we observed a slower bacterial death which occurred only after 12 hours of exposure to antimicrobials. This suggests that the concentration used, besides the presence of other resistance genes, interferes with killing rates.

In conclusion, the combinations used in this study showed synergy against isolates of *K. pneumoniae* producing NDM and KPC. The combinations of PMB / MEM and PMB / AMK were considered the most active, however, only in isolate K7R2 did these antimicrobials show bactericidal activity. It can also be concluded that the antimicrobials to which the bacteria were resistant could be part of these combinations. Additional research is needed to elucidate the mechanisms of activity among the antimicrobials used, in addition to testing the application of these combinations in clinical contexts. As this information becomes available, its translation to the clinic should prolong the effectiveness of these last resort antimicrobials.

Declarations

Funding:

This work was supported by the PPSUS – Ministry of Health – FACEPE, Brazil [APQ-0837-2.12/17].

Conflicts of interest

The authors declare have no conflicts of interest.

Ethical Approval: The bacterial isolates used came from the project that was approved by the Ethics Committee for Ethics in Research that involves human beings (CEP / Plataforma Brasil), and that was registered under the number CAAE: 88576518.0.0000.5208.

References

1. Firmo EF, Beltrão EM, Silva FR, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. J Global Antimicrob Resis. 2019; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>
2. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. Braz J Med Biol Res. 2015; 48(2): p. 174-177 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144154>
3. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: p. 243-244 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr431>
4. Thabit AK, Crandon JL, Nicolau DP. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. Expert Opin Pharmacother. 2015;16(2):159-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2015.993381>
5. Diep JK., Sharma R., Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao GG. Evaluation of Activity and Emergence of Resistance of Polymyxin B and ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2018; 62(2), e01815-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01815-17>
6. Hagiya, Hideharu & Aoki, Kotaro & Akeda, Yukihiro & Yamamoto, Norihisa & Shanmugakani, Rathina Kumar & Yoshikazu, Ishii & Tomono, Kazunori. *In Vitro* Effectiveness of Meropenem and Cefmetazole Combination Treatment Against KPC-2-Producing *Enterobacteriaceae*. *Microbial Drug Resistance*. 2019; 25. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0397>.
7. Kulengowski B, Clark JA, Burgess DS. Killing activity of meropenem in combination with amikacin against VIM- or KPC-producing *Enterobacteriaceae* that are susceptible,

intermediate, or resistant to amikacin. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.020>

8. Bulman ZP, Chen L, Walsh J, Satlin MJ, Qian Y, Bulitta JB, et al. Polymyxin combinations combat *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaNDM-5: Preparation for a Post-antibiotic Era. *mBio*. 2017 Jul-Aug; 8(4): e00540-17. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00540-17>

9. Tangden T, Hickman RA, Forsberg P, et al. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time–kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 1757–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00741-13>

10. CLSI CaLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th informational supplement M100-S28. [Online]. Wayne, PA.; 2018.

11. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq301>.

12. CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999

13. Lim TP, Cai Y, Hong Y, Chan EC, Suranthran S, et al. *In vitro* pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively 8 drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:2515- 24. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.03639-14>.

14. Cai Y, Lim TP, Teo J, Sasikala S, Lee W, et al. *In Vitro* Activity of Polymyxin B in Combination with Various Antibiotics against Extensively Drug- Resistant *Enterobacter cloacae* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:5238-46. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00270-16>

15. Alves PH, Boff RT, Barth AL, Martins AF. Synergy of Polymyxin B, Tigecycline and Meropenem against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolates. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2018; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.011>
16. Kulengowski B, Campion JJ, Feola DJ, Burgess DS. Effect of the meropenem MIC on the killing activity of meropenem and polymyxin B in combination against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017;70:974-8. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.73>
17. Karaiskos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019; 15:133–49. DOI: <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1563071>
18. Lagerbäck, P., Khine, W. W. T., Giske, C. G., & Tängdén, T. Evaluation of antibacterial activities of colistin, rifampicin and meropenem combinations against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in 24h *in vitro* time–kill experiments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016; 71(8), 2321–2325. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw213>

Figura 12 - Time kill curves of amikacin, gentamicin, meropenem and polymyxin B alone and in combination against K7R2 isolates.

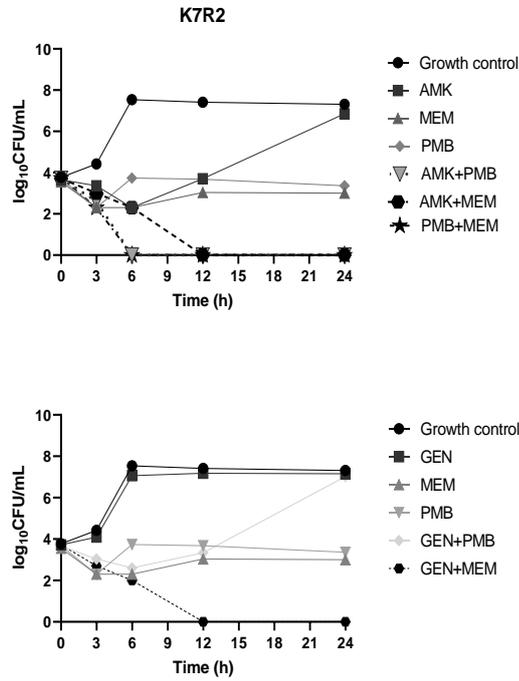


Figura 13 - Time kill curves of amikacin, gentamicin, meropenem and polymyxin B alone and in combination against K11R2 isolates.

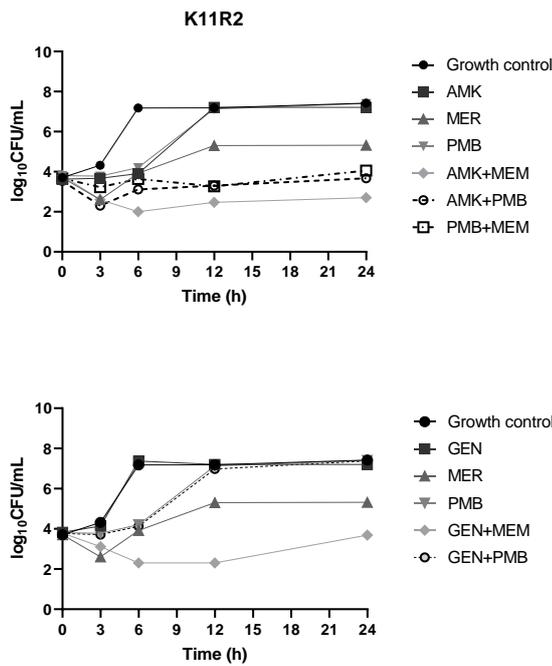


Table 1 - Minimum Inhibitory Concentrations of Amikacin, Gentamicin, Meropenem, and Polymyxin B alone and results of checkerboard assays for clinical *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} positive *Klebsiella pneumoniae* isolates.

<i>Checkerboard assay</i>														
Isolate	CIM (mg/L)				AMI+MEM		AMI+PMB		GEN+MEM		GEN+PMB		PMB+MEM	
	AMK	GEN	PMB	MEM	ΣFIC	Interpretation								
K7R2	16	128	16	16	0.26	synergy	0.07	synergy	0.14	synergy	0.26	synergy	0.07	synergy
K11R2	8	64	4	16	0.09	synergy	0.06	synergy	0.14	synergy	0.26	synergy	0.14	synergy

MIC, minimum inhibitory concentration; ΣFIC smallest total fractional inhibitory concentration (FIC of agent A+ FIC of agent B).

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO COM O GRUPO DE PESQUISA

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Vol.:52:e20180352- 2019

doi: 10.1590/0037-8682-0352-2018



Short Communication

Emergence of *bla*_{NDM-1} associated with the *aac(6')-Ib-cr*, *acrB*, *cps*, and *mrkD* genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil

Alexandra Maria Lima Scavuzzi^[1], Elza Ferreira Firmo^[1],
Érica Maria de Oliveira^[1], and Ana Catarina de Souza Lopes^[1].

[1]. Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Abstract

Introduction: The emergence of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) is concerning because it reduces the antibiotic therapy options for bacterial infections. **Methods:** Resistant and virulent genes from an isolate of *Klebsiella pneumoniae* derived from a patient with sepsis in a hospital in Recife-PE, Brazil, were investigated using PCR and DNA sequencing. **Results:** *bla*_{NDM-1}, *aac(6')-Ib-cr* and *acrB* resistance genes, and *cps* and *mrkD* virulence genes were detected. **Conclusions:** To our knowledge, this is the first report on *bla*_{NDM-1} in Recife-PE. This detection alerts researchers to the need to control the spread of *bla*_{NDM-1} resistance gene by this bacterium in Brazil.

Keywords: *bla*_{NDM-1}. *Klebsiella pneumoniae*. Resistance. Virulence.

New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) is a β-lactamase classified as Ambler class B, and it differs from other carbapenemases because it uses zinc in its active site, which facilitates antimicrobial hydrolysis and confers resistance against all β-lactam antibiotics except aztreonam. The *bla*_{NDM-1} gene was first detected in 2009 in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from the feces of a Swedish patient in India¹. Since this first description, *bla*_{NDM-1} has been reported worldwide². In South America, *bla*_{NDM-1} was reported in Uruguay in a *Providencia rettgeri* isolate and in Brazil in the state of Rio Grande do Sul. In both countries, *bla*_{NDM-1} was reported for the first time in the same species³.

In addition to its resistance mechanisms, these *K. pneumoniae* isolates may present several virulence factors, those that stand out are the production of polysaccharide capsules, fimbrial adhesin type 3, and yersiniabactin. Fimbrial adhesins type 3 can mediate the binding of *K. pneumoniae* isolates to various human cells, such as the endothelial and

epithelial cells of the respiratory tract and urinary tract⁴. The accumulation of virulence genes along with resistance genes may facilitate infection and limit therapeutic options.

This paper analyzes a *K. pneumoniae* isolate (K2-R2) from a female patient with sepsis who was admitted to the clinical medicine department of a public hospital in Recife, Brazil, on 12/04/2016. The K2-R2 isolate was pre-selected because it is involved in sepsis and is multi-drug resistant (MDR), including to carbapenems. The isolate was biochemically identified using the automated (Bactec 9120/Phoenix-BD system). The culture was preserved in 20% glycerol at -70 °C and grown in the medium of Brain Heart Infusion (BHI) at 37 °C for 18 hours prior to analysis. Susceptibility to several classes of antimicrobials was detected using the automated Bactec 9120 (Phoenix BD) system, and susceptibility to the following antimicrobials was tested: amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftazidime, cefepime, cefoxitin, ciprofloxacin, ceftriaxone, cefuroxime, colistin, gentamycin, ertapenem, imipenem, meropenem, and tigecycline. Interpretation was performed according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁵.

The genomic DNA of the K2-R2 isolate was extracted using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) in accordance with the manufacturer's instructions. The genes encoding resistance to carbapenems (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA})

Corresponding author: Prof.^a Dr.^a Ana Catarina de Souza Lopes.
e-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com
Orcid: 0000-0003-0277-108X
Received 30 August 2018
Accepted 1 March 2019



Letter to the Editor

Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2}-harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil

Alexsandra Maria Lima Scavuzzi, Elizabeth Maria Bispo Beltrão, Elza Ferreira Firmo, Érica Maria de Oliveira, Fernanda Gomes Beserra, Ana Catarina de Souza Lopes 

 Show more

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.009>

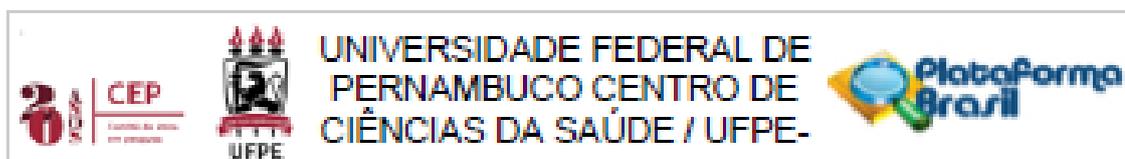
[Get rights and content](#)

 Previous article in issue

Next article in issue 

[View full text](#)

ANEXO B- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de genes de resistência a antimicrobianos em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes provenientes de um hospital de Recife-PE e avaliação ultraestrutural após ação de antimicrobianos e análise de antibioticoterapia in vitro.

Pesquisador: ELZA FERREIRA FIRMO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 88576518.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.776.662

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado apresentado ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL, pela aluna ELZA FERREIRA FIRMO, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes e co-orientação da Profa. Dra. Dyana Leal Veras.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Investigar a ocorrência de genes de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos em isolados de enterobactérias multidroga-resistentes (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*) e determinar o sinergismo e as alterações ultraestruturais provocadas pelo uso da amicacina, gentamicina, polimixina B e o meropenem isoladamente e em associação nos isolados clínicos provenientes de um hospital de Recife- PE.

Objetivos específicos:

- 1 - Determinar a ocorrência e sequência de genes codificadores de EMAs (*ant(2'')*-Ia, *aac(6')*-Ib, *aac(3)*-Ia, e *aph(3')*-VI) em isolados clínicos de enterobactérias multidroga-resistentes.
- 2 - Determinar a ocorrência e sequência dos genes codificadores de 16S rRNA metilases (*armA*,

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (011)2126-6588 E-mail: cepocs@ufpe.br