

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento de um Método Rápido para Detecção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Otávio von Ameln Lovison

PORTO ALEGRE, 2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento de um Método Rápido para Detecção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Dissertação apresentada por Otávio von Ameln Lovison para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Andreza Francisco Martins

Porto Alegre, 2019

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Franciele Maboni Siqueira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Gertrudes Corção  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Leandro Réus Rodrigues Perez  
Hospital Mãe de Deus (HMD)

Lovison, Otávio A.  
 Desenvolvimento de um Método Rápido para Detecção  
 de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em  
 cromatografia líquida acoplada a espectrometria de  
 massas (LC-MS/MS) / Otávio A. Lovison. -- 2019.  
 124 f.  
 Orientador: Andreza F. Martins.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
 Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
 Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
 BR-RS, 2019.

1. Enterobacterales. 2. Carbapenêmicos. 3.  
 Carbapenemase. 4. KPC. 5. LC-MS/MS. I. Martins,  
 Andreza F., orient. II. Título.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE/HCPA) em parceria com o Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS). O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE/HCPA – nº 18-0052). O autor recebeu bolsa de estudo patrocinada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).



À Maíra e à minha família

“Não tenha pena dos mortos. Tenha pena dos vivos, e acima de tudo, daqueles que vivem sem amor.”

Alvo Dumbledore





## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Dra. Andreza Francisco Martins, e ao coordenador do LABRESIS, prof. Dr. Afonso Luis Barth, pela confiança e paciência, pelas oportunidades, ensinamentos e pelos exemplos de pensamento crítico, postura acadêmica e fino trato. Vocês me proporcionaram o maior crescimento da minha vida profissional.

Às colegas do LABRESIS, Daiana Morales, Priscila Link, Maiara Carneiro, Tanise Dalmolin, Lisiane Pancotto, Amanda Martins, Renata Rau, Aline Nunes, Evelyn Almeida, Marina Niada, Helena Ávila, Cibele Magagnin, Laura Antochewis, Franciéli Rozales, Mariana Pagano e ao colega Everton Inamine, pela recepção acolhedora, pelos ensinamentos, frutíferos debates, pela imprescindível ajuda, apoio, e pelos momentos de diversão!

À toda equipe do RPM/Lanagro e ao Dr. Aldemir Ribeiro (Microbiologia/Lanagro), pelo acolhimento, ensinamentos e suporte. Um agradecimento especial ao Dr. Fabiano Barreto, coordenador do Lanagro/RS, pela colaboração mais do que fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio José Lovison e Mariângela Nobre von Ameln Lovison, pelo alicerce que me proporcionou chegar até aqui. Vocês são meus exemplos de humanidade.

À minha irmã, Anne von Ameln Lovison de Lucca, pelo apoio e incentivo em alçar vôos cada vez mais altos!

À família Haase Pacheco e seus agregados, pela forma como me receberam e pelo enorme carinho.

Ao meu amor, Maíra Haase Pacheco, pelo imprescindível suporte, apoio, incentivo e amor imensurável. Tu me transformas em uma pessoa melhor diariamente!



## ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*“Evolution is cleverer than you are.”*

Leslie Orgel



## RESUMO

*Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) foram reconhecidas como uma ameaça urgente à saúde global que causam a maioria das infecções de difícil tratamento em estabelecimentos de saúde e estão associadas a elevada mortalidade. ERCs produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), principalmente *Klebsiella pneumoniae*, são mundialmente disseminadas e responsáveis por um grande número de surtos. Métodos rápidos de diagnóstico proporcionam grandes benefícios clínicos e epidemiológicos. Recentemente, um método de detecção direta de KPC baseado em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi desenvolvido. O objetivo deste trabalho foi padronizar e validar este método, com adaptações adequadas às nossas especificações e disponibilidade de equipamentos. Testamos o nosso método contra uma ampla variedade de isolados, incluindo produtores de outras carbapenemases. Para fase de validação foram selecionados 111 isolados (49 KPC-positivos e 62 KPC-negativos) provenientes de um estudo de vigilância para o monitoramento de *Enterobacteriales* com susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos. Os resultados foram avaliados por um operador experiente que desconhecia a caracterização prévia dos isolados. O operador classificou corretamente 47 dos 49 isolados KPC-positivos. Todos os isolados KPC-negativos (n=62) foram corretamente classificados. O método apresentou uma sensibilidade de 96,07% e uma especificidade de 100%. A presença de outras carbapenemases não interferiu nos resultados. O peptídeo APIVLAVYTR se apresentou negativo em 19 dos 49 isolados KPC-positivos, enquanto GFLAAAVLAR apresentou apenas um resultado negativo. LTLGSALAAPQR e LALEGLGVNGQ foram detectados em todos extratos proteicos. Em conclusão, nossos resultados demonstram que os peptídeos marcadores de KPC foram robustamente detectados pelo método em LC-MS/MS, que apresentou elevada sensibilidade e especificidade e pode ser utilizado como um método confirmatório para detecção deste mecanismo de resistência em *Enterobacteriales*.

Palavras-chave: *Enterobacteriales*, carbapenêmicos, carbapenemases, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC, LC-MS/MS



## Abstract

Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) have been recognized as an urgent threat to global health that cause of the majority of the difficult-to-treat infections in health-care settings and are associated with high mortality. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing CREs, specially *Klebsiella pneumoniae*, are globally disseminated and responsible for a large number of outbreaks. Rapid methods for KPC detection provide great clinical and epidemiological benefits. Recently, a method based in liquid chromatography-tandem MS (LC-MS/MS) was developed. The aim of this study was to standardize and validate this method, with adaptations to suit our equipment availability and specifications. We tested our method against a broad variety of isolates, including other carbapenemases producers. For validation phase 111 isolates (49 KPC-positives and 62 KPC-negatives) from a surveillance study monitoring *Enterobacterales* with reduced susceptibility to carbapenems were selected. The results were evaluated by an expert operator blinded to the isolates previous characterization. The operator correctly classified 47 of 49 KPC-positive isolates. All KPC-negative isolates (n=62) were correctly classified. The method yields 96.07% sensitivity and 100% specificity. The presence of other carbapenemases did not interfere in the results. The APIVLAVYTR peptide was called negative in 19 from 49 KPC-positive isolates while GFLAAAVLAR presented just one negative result. LTLGSALAAPQR and LALEGLGVNGQ were detected in all protein extracts. In conclusion, our results demonstrate that the KPC peptide markers were robustly detected by the method which presented high sensitivity and specificity and therefore can be used as a confirmatory method to identify this resistance mechanism among *Enterobacterales*.

Keywords: *Enterobacterales*, carbapenems, carbapenemases, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC, LC-MS/MS





## LISTA DE FIGURAS

- 1 - Distribuição global das principais carbapenemases em *Enterobacterales*
- 2 - Teste de Hodge Modificado
- 3 - Esquema para aplicação dos discos no teste de discos combinados
- 4 - Resultados representativos do teste com e sem ácido fenilborônico
- 5 - Teste mCIM
- 6 - CHROMID® CARBA SMART
- 7 - Resultados no *Resist-3 O.K.N K-Set*
- 8 - Resultados representativos do teste Carba NP
- 9 - Resultados representativos do teste Blue Carba
- 10 - Análise da degradação de ertapenem (ERT) em MALDI-TOF MS pela metodologia MBT STAR-BL
- 11 - Pico associado a presença de *bla<sub>KPC</sub>* em MALDI-TOF MS
- 12 - Triplo quadrupolo
- 13 - Funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo
- 14 - Cromatogramas em LC-MS/MS dos 3 peptídeos selecionados como marcadores de KPC.
- 15 - Resultados da técnica de PCR em tempo real *High Resolution Melting (HRM)*



## LISTA DE TABELAS

- 1 - Classificação das principais carbapenemases em *Enterobacterales*
- 2 - Pontos de corte para triagem de enterobactérias produtoras de carbapenemases (adaptado de EUCAST, 2012)
- 3 - Prós e contras das opções terapêuticas para ERC
- 4 - Opções terapêuticas em estágio final de desenvolvimento



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmpC – cefalosporinase

ACN - acetonitrila

APT - bifosfato de amônio

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPE - Centro de Pesquisa Experimental

CRE - *Carbapenem-resistant Enterobacterales*

CSI - *conserved signature insertions/deletions*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERC - *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos

ESBL -  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado

FA – *formic acid* (ácido fórmico)

FIPE - Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino

HCCA - ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Kp – *Klebsiella pneumoniae*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

KpKPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC

KpRC - *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

LABRESIS - Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana

LANAGRO/RS - Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

MBL - metalo- $\beta$ -lactamase

MLSA - *multiple gene/protein-based multilocus sequence analysis*

OXA - oxacilinase

PBP - penicillin binding protein

RNA - ácido ribonucléico

rRNA - RNA ribossomal

ST - *Sequence type*

WHO - World Health Organization



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	23
2 OBJETIVOS .....	25
2.1 Objetivo Geral .....	25
2.2 Objetivos Específicos .....	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
3.1 Ordem <i>Enterobacterales</i> .....	25
3.2 Epidemiologia das Infecções causadas por Enterobactérias .....	27
3.3 Resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias .....	29
3.4 Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos .....	31
3.5 Carbapenemases em Enterobactérias .....	33
3.5.1 Carbapenemases de classe A.....	35
3.5.2 Carbapenemases de classe B.....	37
3.5.3 Carbapenemases de classe D .....	39
3.6 Métodos para detecção de carbapenemases.....	41
3.6.1 Métodos de triagem.....	41
3.6.2 Métodos fenotípicos para produção de carbapenemase .....	43
3.6.2.1 Teste de Hodge Modificado (MHT) .....	43
3.6.2.2 Teste de disco combinado com inibidores.....	43
3.6.2.3 Método modificado de inativação de carbapenêmicos (Modified Carbapenem Inactivation Method – mCIM) .....	45
3.6.2.4 Meios cromogênicos.....	47
3.6.2.5 Testes imunocromatográficos .....	47
3.6.2.6 Carba NP/Blue Carba.....	49
3.6.2.7 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS) .....	51
3.6.2.8 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) .....	53
3.6.2.8.1 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) em Microbiologia Clínica .....	57
3.6.2.8.1.1 Determinação de Resistência Antimicrobiana com LC-MS/MS.....	57
3.6.2.9 Outras abordagens em MS .....	61
3.6.3 Métodos moleculares .....	61
3.7 Opções terapêuticas para infecções causadas por ERC .....	63
4 MANUSCRITO I .....	69

5 OUTROS RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
5.1 Detecção de marcadores de KPC em MALDI-TOF MS .....	91
5.2 Detecção de peptídeos marcadores de KPC em MALDI-TOF MS.....	93
5.3 Detecção de um pico marcador da molécula de KPC intacta.....	95
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
8 ANEXOS .....	123



## 1 INTRODUÇÃO

A ordem *Enterobacterales* (previamente conhecida como *Enterobacteriales*), que pertence a classe *Gammaproteobacteria*, é um diverso grupo de bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, fermentadores da glicose e que possuem exigências nutricionais simples. Esta ordem possui 60 gêneros que englobam mais de 250 espécies bacterianas que podem ser diferenciados rotineiramente através de uma série de características fenotípicas (BRENNER & FARMER III, 2005; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; PARTE, 2014; FORSYTHE *et al.*, 2015).

Os gêneros e espécies de maior importância clínica são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., sendo que *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. estão entre os principais microrganismos associados a infecções comunitárias e hospitalares (FORSYTHE *et al.*, 2015, HIDRON *et al.*, 2008).

Os antibióticos de escolha para tratamento dessas infecções são as cefalosporinas e outras classes de antibióticos como quinolonas e aminoglicosídeos. Entretanto, nos anos 90, o uso de cefalosporinas levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a esses antibióticos, como a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). No início dos anos 2000, com o surgimento de cepas produtoras de ESBLs, os carbapenêmicos se tornaram as drogas antimicrobianas de último recurso. Porém, seguindo-se o crescente uso de carbapenêmicos, novos mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos foram surgindo (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; FORSYTHE *et al.*, 2015).

*Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) vem sendo reportadas a mais de 10 anos em todo o mundo (AKOVA *et al.*, 2012; PATEL & BONOMO, 2013). Em 2015 a OMS divulgou que *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KpRC) já foi encontrada em todas as regiões do mundo (WHO, 2015). A resistência a carbapenêmicos pode ser mediada por diversos mecanismos, dentre eles redução da permeabilidade da membrana

externa, perda de porinas ou produção de enzimas  $\beta$ -lactamases (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC, metalo- $\beta$ -lactamase - MBL,  $\beta$ -lactamase de espectro estendido - ESBL, oxacilinasas - OXAs), sendo a produção de carbapenemases ( $\beta$ -lactamases) o principal mecanismo de resistência, tanto do ponto de vista clínico-epidemiológico quanto de saúde pública (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; ROBERT *et al.*, 2014). Além disso, o arsenal de seus elementos genéticos móveis, carreadores de mecanismos de resistência e determinantes de virulência, continua a se expandir (LOGAN & WEINSTEIN, 2017).

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é considerada a mais importante carbapenemase na ordem *Enterobacterales* e tem sido extensivamente reportada. Atualmente, mais de 20 variantes de KPC já foram descritas (LAHEY CLINIC, 2018). O primeiro isolado portando *bla*<sub>KPC</sub> foi uma *Klebsiella pneumoniae* (KpKPC) isolado de um paciente em 1996, na Carolina do Norte nos Estados Unidos da América (EUA) (YIGIT, 2001) e desde então vem sendo relatada em diferentes países (LOGAN & WEINSTEIN, 2018). As taxas de mortalidade em infecções causadas por produtores de KPC pode ser até 3 vezes mais alta que a mortalidade causada por microrganismos sensíveis aos carbapenêmicos, mesmo que estes sejam multirresistentes. Um dos fatores que mais contribui para isso é justamente o atraso no uso de agentes microbiologicamente ativos no tratamento dessas infecções. Como produtores de carbapenemase podem se apresentar sensíveis aos carbapenêmicos pelos métodos tradicionais, inclusive os automatizados, existe uma demanda urgente para que sejam desenvolvidos e implementados novos métodos rápidos de diagnóstico e detecção de carbapenemases para minimizar a morbidade e mortalidade destas infecções (CARVALHAES, 2014; MONACO *et al.*, 2014; BEN-DAVID *et al.*, 2012; GALLAGHER *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2018; BRIZENDINE, 2015; DAIKOS *et al.*, 2009; PATEL, 2008; TRECARCHI *et al.*, 2015; HUSSEIN *et al.*, 2013; PERKINS *et al.*, 2017; PORRECA *et al.*, 2018).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Padronizar e validar um método rápido para detecção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacterales*.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar quais peptídeos marcadores de KPC são mais robustos;
2. Avaliar a presença de interferentes no método;
3. Determinar a sensibilidade e especificidade do método.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Ordem *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* (previamente conhecida como *Enterobacteriales*), que pertence a classe *Gammaproteobacteria*, é um diverso grupo de bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, fermentadores da glicose e que possuem exigências nutricionais simples. Esta ordem possui 60 gêneros, incluindo os recentemente descritos gêneros *Chania sp.* (EE *et al.*, 2016) e *Atlantibacter sp.* (HATA *et al.*, 2016). Estes 60 gêneros englobam mais de 250 espécies bacterianas que podem ser diferenciados rotineiramente através de uma série de características fenotípicas (BRENNER & FARMER III, 2005; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; PARTE, 2014; FORSYTHE *et al.*, 2015).

A diversidade bioquímica dentro da ordem *Enterobacterales* torna difícil sua classificação fenotípica em subgrupos (BRENER & FARMER III, 2005; OCTAVIA & LAN, 2014). Até pouco tempo atrás, nosso entendimento acerca da filogenia e da inter-relação dos membros desta ordem era primariamente baseado no gene 16S rRNA. Contudo, este gene possui um baixo poder discriminatório e as árvores filogenéticas baseadas em 16S não proporcionavam uma boa resolução. As ramificações dos gêneros e espécies dentro da ordem *Enterobacterales* apresentavam considerável aleatoriedade, dependendo do algoritmo usado e dos microrganismos utilizados (NAUM *et al.*, 2008; OCTAVIA & LAN, 2014).

Outros genes (*rpoB*, *gyrB*, *dnaJ*, *recA*, *fusA*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, *sucA*, dentre outros) foram empregados na tentativa de elucidar a filogenia da ordem *Enterobacterales* e a inter-relação entre seus membros, levando a um número significativo de reclassificações e solucionando boa parte dos problemas relacionados à gêneros polifiléticos (EE *et al.*, 2016; HATA *et al.*, 2016).

O aumento do uso das tecnologias de sequenciamento de genoma total vem proporcionando um crescimento significativo no volume de dados de genomas sequenciados, disponíveis publicamente. Atualmente, existem mais de 30.000 genomas de organismos da ordem *Enterobacterales* disponíveis no banco de dados de genomas do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, em 15/12/2018). Essas sequências estão proporcionando estudos mais robustos e confiáveis de reconstrução de árvores filogenéticas baseados em genoma, que demonstram um poder de resolução muito maior que os estudos baseados em poucos genes ou proteínas (ADEOLU *et al.*, 2016).

Uma classe de características moleculares em particular que vem sendo utilizada com grande efeito recentemente em estudos taxonômicos de procariotos são as assinaturas conservadas de inserções/deleções (*conserved signature insertions/deletions* – CSIs), presentes em proteínas amplamente distribuídas (GUPTA, 2014, 2016). CSIs são inserções ou deleções (indels) que estão presentes unicamente em um grupo relacionado de organismos. Uma breve explicação para a presença de CSIs em um grupo relacionado de organismos é a existência de um ancestral em comum. Desta forma, CSIs apresentam características sinapomórficas, ou seja, proporcionam evidência confiável de que, independente das árvores filogenéticas, as espécies dos grupos nos quais elas se encontram são especificamente relacionadas devido a um ancestral em comum (GUPTA, 2016; ADEOLU, 2016).

Na segunda metade de 2016, um estudo reconstruiu uma árvore filogenética utilizando 179 genomas completos representativos dos membros da ordem *Enterobacterales*, baseada em 1548 proteínas compartilhadas do core genômico, bem como árvores filogenéticas baseadas em 53 proteínas ribossomais e 4 proteínas MLSA (*multiple gene/protein-based multilocus sequence analysis*) para identificar características moleculares conservadas que pudessem ser usadas para determinar as inter-relações dentro da ordem

*Enterobacterales*. Através de 5 CSIs únicos desta ordem, 66 CSIs que se mostraram específicas para 7 principais grupos de gêneros em conjunto com CSIs descobertas previamente (NAUSHAD *et al.*, 2014) foi possível reconstruir árvores filogenéticas altamente robustas que propiciaram um novo entendimento acerca das inter-relações dentro da ordem *Enterobacterales* e compuseram a base de uma nova estrutura taxonômica. Com base nas análises dessas novas árvores filogenéticas, foi proposta a divisão da ordem *Enterobacterales* em 7 novas famílias. Estas famílias são *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* – *Escherichia*), *Erwiniaceae* (*Erwinia* – *Pantoea*), *Pectobacteriaceae* (*Pectobacterium* – *Dickeya*), *Yersiniaceae* (*Yersinia* – *Serratia*), *Hafniaceae* (*Hafnia* – *Edwardsiella*), *Morganellaceae* (*Proteus* – *Xenorhabdus*) e *Budwiciaceae* (*Budvicia*) (ADEOLU *et al.*, 2016).

Os gêneros e espécies de maior importância clínica são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., sendo que *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, estão entre os principais microrganismos associados a infecções hospitalares (FORSYTHE *et al.*, 2015, HIDRON *et al.*, 2008).

### 3.2 Epidemiologia das Infecções causadas por Enterobactérias

Amplamente distribuídas na natureza, são encontradas na água, solo, plantas e microbiota de diversos animais, incluindo humanos, sendo uma importante fonte de infecções comunitárias e hospitalares devido a sua facilidade de disseminação (PARTRIDGE, 2011; TOLEMAN & WALSH, 2011). Dentre as infecções mais graves estão pielonefrite, sepse, pneumonia, peritonite, meningite e infecções associada à dispositivos invasivos (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; FORSYTHE *et al.*, 2015).

*E. coli* é a espécie mais frequentemente isolada de humanos e a que mais sabemos a respeito. *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella* spp. e *Providencia* spp. também figuram entre os microrganismos mais frequentemente isolados da ordem *Enterobacterales*, tanto em infecções comunitárias quanto hospitalares (STROCKBINE *et al.*, 2015; FORSYTHE *et al.*, 2015). Estes gêneros têm sido extensivamente reportados

como colonizantes do trato gastrointestinal e como causadores de infecção de corrente sanguínea, trato urinário, trato respiratório, infecção de sítio cirúrgico, dentre outros. São particularmente preocupantes por se apresentarem frequentemente como multirresistentes (CDC, 2013; FORSYTHE *et al.*, 2015).

Os antibióticos de escolha para tratamento dessas infecções são as cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos. Entretanto, nos anos 90, o uso de cefalosporinas levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a esses antibióticos, como a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). No início dos anos 2000, com o surgimento de cepas produtoras de ESBLs, os carbapenêmicos se tornaram as drogas antimicrobianas de último recurso. Porém, seguindo-se o crescente uso de carbapenêmicos, novos mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos foram surgindo (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; FORSYTHE *et al.*, 2015).

### 3.3 Resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias

Os  $\beta$ -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais utilizados em todo mundo e compreende as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Dentre os diversos mecanismos de resistência a esses antibióticos, estão: alteração do sítio alvo (*penicillin binding protein* ou PBPs); alterações de permeabilidade de membrana; hiperexpressão de bombas de efluxo; inativação enzimática, através da produção de  $\beta$ -lactamases (NIKAIDO, H. 2003; NORDMANN *et al.*, 2009; ZAVASCKI *et al.*, 2010). A produção destas enzimas é o mecanismo mais importante dentre estes, e a sua maior prevalência parece estar diretamente associada ao intenso uso dos  $\beta$ -lactâmicos (PITOUT *et al.*, 2008). O número de  $\beta$ -lactamases vêm crescendo rapidamente e sua contagem já ultrapassa 2100 sequências catalogadas (BUSH K, 2016).

A crescente utilização de gerações sucessivas de  $\beta$ -lactâmicos vem selecionando  $\beta$ -lactamases cada vez mais potentes e de maior espectro (LIVERMOORE & WOODFORD, 2006). Atualmente encontramos uma imensa variedade destas enzimas (AmpCs, ESBLs, carbapenemases) que podem ser classificadas de acordo com as suas características funcionais e moleculares (AMBLER *et al.*, 1991; BUSHY & JACOBY, 2010).

As AmpCs (cefalosporinases) são  $\beta$ -lactamases cromossomais ou plasmidiais e são enquadradas na classe C de Ambler. Possuem atividade contra os  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, mas pouco atuam sobre as cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos. Sua detecção fenotípica *in vitro* pode ser realizada utilizando cloxacilina (JACOBY, 2009), sendo a redução da susceptibilidade a cefoxitina o mais sensível marcador para *screening* de sua expressão em enterobactérias (POULSFUSS *et al.*, 2011).

As AmpCs cromossomais são encontradas em representantes de diversos gêneros da ordem *Enterobacterales*, mais frequentemente em *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* e *Providencia spp.*, e a exposição a  $\beta$ -lactâmicos induz a desrepressão e hiperexpressão do gene que codifica estas enzimas, podendo levar a resistência no curso do tratamento (JACOBY, 2009; CLSI, 2018).

As AmpCs plasmidiais vem sendo relatadas desde os anos 90, sendo as mais frequentes pertencentes as famílias CMY (cefamicinase) (BAUERNFEIND

*et al.*, 1989), FOX (cefoxitinase) (GONZALEZ *et al.*, 1994) e DHA (Dhahran cefalosporinase) (GAILLOT *et al.*, 1997). Já foram descritas em praticamente todas as espécies da ordem *Enterobacterales* e são menos frequentes que as ESBLs (JACOBY, 2009; THOMSON, 2010).

As ESBLs são enzimas da classe A de Ambler, com atividade contra penicilinas, cefalosporinas e aztreonam e inibidas pelos clássicos inibidores de  $\beta$ -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (BRADFORD, 2001). As famílias de ESBL mais frequentemente encontradas são TEM (Temoneira) (DATTA, N., KONTOMICHALOU, P., 1965), SHV (*Sulphydryl reagent variable*) (MATTHEW *et al.*, 1979) e CTX-M (cefotaximase – primeiramente isolada em Munich) (BAUERNFEIND *et al.*, 1990) (CHONG *et al.*, 2011; THOMSON, 2010).

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem) são os agentes de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por cepas produtoras de ESBL e AmpC e, com frequência, são a única opção terapêutica, visto que os microrganismos que apresentam estes mecanismos geralmente possuem genes de resistência contra outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclinas, cloranfenicol e quinolonas (LIVERMORE *et al.*, 2008; MAMMERI *et al.*, 2005; PATERSON, 2000).



### 3.4 Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos

*Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) vem sendo reportadas a mais de 10 anos em todo o mundo (AKOVA *et al.*, 2012; PATEL & BONOMO, 2013). Seu arsenal de elementos genéticos móveis continua a crescer em quantidade e complexidade, reunindo cada vez mais genes de resistência e virulência (LOGAN & WEINSTEIN, 2017). Em 2015 a OMS divulgou que *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (KpRC) já foi encontrada em todas as regiões do mundo (WHO, 2015). A extensa disseminação das ERC vem causando sérios problemas terapêuticos que se equiparam àqueles causados pelos *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes e produtores de ESBLs duas décadas atrás (DE KRAKER, DAVEY, GRUNDMANN, 2011).

A resistência a carbapenêmicos pode ser mediada por diversos mecanismos, dentre eles redução da permeabilidade da membrana externa, perda de porinas ou produção de enzimas  $\beta$ -lactamases (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC, metalo- $\beta$ -lactamase - MBL,  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado – ESBLs e cefalosporinase - AmpCs (quando associadas a outro mecanismo) e oxacilinasas - OXAs), sendo a produção de carbapenemases ( $\beta$ -lactamases) o principal mecanismo de resistência, tanto do ponto de vista clínico-epidemiológico quanto de saúde pública (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; ROBERT *et al.*, 2014).

Os fatores de risco associados a infecção por ERC são inespecíficos. São eles: internação em unidade de terapia intensiva (UTI), tempo prolongado de internação, altos graus de comorbidade, uso prévio de antimicrobianos, alta pressão de colonização e uso prolongado de dispositivos invasivos (WOORDFORD *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2016; OKAMOTO *et al.*, 2017; VAN-DUIN *et al.*, 2014).

Contaminação ambiental também parece ser um importante mecanismo de transmissão de ERC. Um surto prolongado envolvendo *K. oxytoca* produtora de KPC foi identificado em uma ala hematológica na Áustria. Clones idênticos aos que causaram o surto nos pacientes foram recuperados das pias da sala de admissão e das pias da sala de medicação. A limpeza do ambiente controlou o surto (LEITNER *et al.*, 2015).

Os chamados *bundles*, que são um conjunto de medidas que incluem banhos de clorexidina 2%, precauções de contato, aprimoramento da desinfecção do ambiente, culturas de vigilância, estudos de prevalência e treinamento de equipe, vem sendo reportados como atenuadores da transmissão de ERC entre os pacientes (MUÑOS-PRICE *et al.*, 2010; LEITNER *et al.*, 2015; HAYDEN *et al.*, 2015;) O uso de transplante fecal de microbiota também vem sendo investigado e utilizado com sucesso como uma alternativa para a descolonização de pacientes portadores de ERC (CRUM-CIANFLONE, 2015).

Uma característica desses microrganismos é adquirir e manter diversos mecanismos de resistência, tornando-se reservatórios desses mecanismos e facilitando a disseminação dos mesmos (MIRIAGOU *ET AL.*, 2010). Portanto, as ERCs são invariavelmente multirresistentes, acumulando outros mecanismos de resistência além das carbapenemases, como resistência a aminoglicosídeos, cotrimoxazol, cloranfenicol, nitrofurantoína, quinolonas e fluorquinolonas (CARMELI *et al.*, 2010). Dentre as ERC, a mais preocupante é *Klebsiella pneumoniae* (Kp). Nos Estados Unidos, 8 a 13% das KP causando infecções hospitalares são resistentes a carbapenêmicos (SIEVERT *et al.*, 2013).

Microrganismos resistentes aos carbapenêmicos tem levado ao uso cada vez maior de antimicrobianos em alguns hospitais. Um estudo de 10 anos em um hospital brasileiro demonstrou um aumento no uso de antibióticos de 18,5% entre 2007 e 2016. O consumo médio de carbapenêmicos foi de 18,4%, representando 16,2% do total de antimicrobianos consumidos com um aumento de 152%. Um aumento significativo do consumo também foi observado em outras classes de antimicrobianos, como piperacilina-tazobactam (856%), polimixinas (463%), aminoglicosídeos (151%) e fluoroquinolonas (14,5%). Co-resistência a polimixinas, consideradas como último recurso terapêutico, foi encontrada em 41,6% das KpRC (FEDERICO & FURTADO, 2018).

O surgimento de clones de alto risco (*High-risk clones*) ou clones epidêmicos (*epidemic clones*), principalmente de *K. pneumoniae*, tem acelerado o processo de colonização, disseminação e persistência nos mais variados nichos (BAQUERO; TEDIM; COQUE, 2013). Estes clones são cepas que adquiriram certas capacidades adaptativas que aumentam sua patogenicidade e habilidades de sobrevivência, acompanhado da aquisição de mecanismos de

resistência a antimicrobianos. Estes clones tem a tenacidade e flexibilidade de acumular e compartilhar genes de resistência e virulência, e desempenham um importante papel na disseminação destes genes entre as enterobactérias. (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011).

Com o aumento da resistência aos carbapenêmicos, restam poucas alternativas para o tratamento das infecções causadas por ERC. Pacientes com infecções causadas por ERC tendem a ter seu tempo de internação prolongado, são admitidos em UTIs e apresentam aumento das taxas de mortalidade, taxas que podem ser de até três vezes maior (MARTIN, 2018), mesmo quando comparados com pacientes portadores de infecções multirresistentes causadas por produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). (MONACO *et al.*, 2014; BEN-DAVID *et al.*, 2012; GALLAGHER *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2018) Um dos principais fatores que contribuem para este aumento de mortalidade é o atraso no uso de antimicrobianos microbiologicamente ativos (BEN-DAVID *et al.*, 2012; BRIZENDINE, 2015; DAIKOS *et al.*, 2009; PATEL, 2008; TRECARCHI *et al.*, 2015; HUSSEIN *et al.*, 2013). O tempo necessário para determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos é crucial para o ajuste da terapia antimicrobiana e tem impacto direto no desfecho dos pacientes. Tempo este que hoje, mesmo com a integração das tecnologias mais modernas existentes, fica entre 18-24 horas, após a obtenção do isolado bacteriano (CARVALHAES *et al.*, 2014).

### **3.5 Carbapenemases em Enterobactérias**

As carbapenemases são enzimas que possuem atividade hidrolítica frente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos. (QUEENAN & BUSH, 2007)

Vale ressaltar que o termo 'carbapenemase' reflete mais o impacto clínico da hidrólise dos carbapenêmicos do que uma preferência superior dessas enzimas por esta classe de antimicrobianos, em comparação a outros  $\beta$ -lactâmicos. (CARMELI *et al.*, 2010)

Um grande número de carbapenemases já foi identificado e classificado de acordo com suas propriedades funcionais e moleculares, conforme descrito por Ambler (1980) e Bush & Jacoby (2010) (Tabela 1). As carbapenemases

envolvidas na resistência adquirida são constituídas por uma combinação heterogênea de beta-lactamases de classe A (penicilinases), classe B (metalo enzimas) e classe D (oxacilinases ou OXAs). Aquelas que pertencem às classes A e D são serino beta-lactamases pois possuem o aminoácido serina no sítio ativo, e aquelas pertencentes a classe B são metalo beta-lactamases, pois possuem um ou dois íons metálicos (geralmente zinco) no sítio ativo (BUSH & JACOBY, 2010).

Tabela 1: Classificação das principais carbapenemases em *Enterobacterales*

Classe estrutural <sup>1</sup>	Classe funcional <sup>2</sup>	Sítio ativo	Inibidores	Principais representantes	Elementos genéticos móveis
A	2f	Serina	Inibidores de $\beta$ -lactamase disponíveis comercialmente	KPC	IncFIIK <sub>2</sub> , IncF1A, IncI2; TN4401
				GES	Integrans de classe I
B	3	Zinco	Agentes quelantes (Ex. EDTA)	NDM	IncA/C; ISAb <sub>a</sub> 125
				IMP	IncL/M, IncA/C, Integrans de classe I
				VIM	IncN, IncI1, Integrans de classe I
D	2d	Serina	NaCl ( <i>in vitro</i> )	OXA-48	IncL/M, Tn1999, IS1999
				OXA-181	Plasmídeos ColE, Tn2013, ISEcp1

Legenda: 1: Ambler, 1980; 2: Bush & Jacoby, 2010; Dados adaptados de: Patel & Bonomo, 2013; Carattoli A, 2009; Poirel *et al.*, 2012; Queenan & Bush, 2007; Logan LK, 2012; Pitout JDD, 2015; Chen *et al.*, 2014;

Os diferentes genes que codificam as carbapenemases circulantes são frequentemente carregados por estruturas genéticas móveis, incluindo plasmídeos e transposons, e desta forma se disseminam entre os membros da ordem *Enterobacterales* e também bacilos gram-negativos não fermentadores. Além disso, o crescente aumento das viagens internacionais também contribui para essa disseminação (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015) e a

transferência de pacientes de instituições endêmicas para outras instituições foi identificado como um importante mecanismo de transmissão entre hospitais (PRABAKER *et al.*, 2012).

### 3.5.1 Carbapenemases de classe A

As carbapenemases de classe A possuem um aminoácido serina na posição 70 do seu sítio ativo, hidrolisam uma ampla variedade de  $\beta$ -lactâmicos e caracterizam-se pela inibição por ácido fenilborônico, ácido clavulânico e tazobactam. Podem ser tanto cromossomais (IMI/NMC, SME) quando plasmidiais (KPC, GES). As enzimas cromossomais possuem baixa prevalência devido a sua dificuldade de disseminação, enquanto as plasmidiais são mais preocupantes devido ao seu alto potencial de disseminação. (QUEENAN & BUSH, 2007)

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é considerada a mais importante carbapenemase na ordem *Enterobacterales* e tem sido extensivamente reportada em todo mundo. Atualmente, mais de 20 variantes de KPC já foram descritas (LAHEY CLINIC, 2018), sendo as variantes KPC-2 e KPC-3 aparentemente as mais prevalentes. (STOESSER *et al.*, 2017)

Suas variantes possuem de 265 a 269 aminoácidos e o nome *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase vem do fato desta enzima ter sido descrita pela primeira vez neste microrganismo. (YIGIT *et al.*, 2003)

Produtores de KPC possuem altos níveis de resistência contra  $\beta$ -lactâmicos como penicilinas e cefalosporinas, e níveis variáveis contra carbapenêmicos. Entretanto, diferentemente de outras  $\beta$ -lactamases de classe A, as KPCs são insuficientemente inibidas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases clavulanato, sulbactam e tazobactam (PASTERAN, 2008). Além disso, são multirresistentes, visto que *bla*<sub>KPC</sub> é carregado por grandes plasmídeos que com frequência possuem genes de resistência contra outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclina. (DESHPANDE *et al.*, 2006; ENDIMIANI *et al.*, 2009)

O primeiro isolado portando *bla*<sub>KPC</sub> foi uma *K. pneumoniae* (KpKPC) isolado de um paciente em 1996, na Carolina do Norte nos Estados Unidos da América (EUA) (YIGIT, 2001). Em 1998, *bla*<sub>KPC</sub> foi detectada em *Salmonella cubana* em

Maryland (MIRIAGOU *et al.*, 2003), 4 isolados de Kp em Baltimore e um isolado de *Klebsiella oxytoca* em Nova Iorque (MIRIAGOU *et al.*, 2003; MOLAND *et al.*, 2003) Entre 2000-2001, foi reportado o primeiro surto de KPC em um hospital de Nova Iorque, envolvendo 14 pacientes, sendo que 8 foram a óbito em decorrência da infecção (WOODFORD, 2004). Mais recentemente, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) reportou que todos os estados americanos já notificaram infecções por microrganismos produtores de KPC (CDC, 2018). Apesar disso, epidemiologistas de Nova Iorque recentemente reportaram um declínio na prevalência de KpRC, inclusive produtores de KPC e sugeriram que a diminuição do uso de dispositivo invasivos fixos, melhoria nas técnicas de esterilização e a adequada utilização das estratégias de controle de infecção podem ter contribuído para este declínio (PARK *et al.*, 2016) Lübert *et al.* demonstraram que a maioria dos pacientes descoloniza dentro de 6 meses após a aquisição do microrganismo. Alguns pacientes tiveram resultados positivos para colonização após 3 resultados negativos consecutivos e alguns pacientes permaneceram colonizados por KPC por um tempo superior a 3 anos. Esses resultados reforçam a ideia da necessidade de medidas de controle de infecção apropriadas para pacientes previamente infectados/colonizados por ERC, independente do tempo decorrido desde a aquisição. (LÜBERT *et al.*, 2014)

Surtos de KPC foram descritos primariamente em estabelecimentos de saúde (CAMPOS *et al.*, 2016). A primeira detecção de KPC fora dos EUA foi em Paris, em fevereiro de 2005. Um paciente com carcinoma prostático que havia sido submetido a nefrostomia bilateral em dezembro de 2004 em um hospital de Nova Iorque. KpKPC foi isolada em culturas de urina e sangue (NAAS & NORDMANN, 2005). Casos subsequentes foram reportados no Brasil, Reino Unido, França e China. Rapidamente as KPCs se disseminaram pelo mundo, sendo detectadas em praticamente todas as espécies clinicamente relevantes da ordem *Enterobacterales* (MUNOS-PRICE *et al.*, 2013) e também em alguns não-fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (NORDMANN *et al.*, 2009; 2011)

Hoje a disseminação global de *bla*<sub>KPC</sub> está diretamente associada ao clone epidêmico *K. pneumoniae* ST258. As razões pelas quais este clone se sobressai com relação aos outros ainda não estão claras, mas sua marcante habilidade de

se disseminar sugere uma possível capacidade superior de sobrevivência (*fitness advantage*) com relação aos demais clones (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Além disso, esses genes estão diretamente ligados a um único elemento genético, o transposon Tn4401, indicando que este elemento possa ter contribuído para sua ampla disseminação (NAAS *et al.*, 2016).

No ano de 2009 ocorreram os primeiros relatos de KPC no Brasil. Isolados produtores de KPC foram reportados no Recife (MONTEIRO *et al.*, 2009), Rio de Janeiro (PEIRANO *et al.*, 2009), Santa Catarina (ZAVASCKI *et al.*, 2010) e Rio Grande do Sul. (ZAVASCKI *et al.*, 2009, 2010).

A co-ocorrência de KPC com outros mecanismos de resistência clinicamente relevantes é outro fato preocupante, visto que a capacidade superior de sobrevivência (*fitness advantage*) destes isolados aliada a facilidade de disseminação destes genes contribui para um cenário onde não existem mais opções terapêuticas para estes pacientes (ROZALES *et al.*, 2017; AIRES *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2017; ANTOCHEVIS *et al.*, 2018). É urgente a necessidade de novos antimicrobianos microbiologicamente ativos contra estes isolados (ANTOCHEVIS *et al.*, 2018).

Atualmente a enzima GES possui 27 variantes descritas (LAHEY CLINIC, 2018). Em sua maioria classificadas como ESBLs, algumas variantes possuem modificações em seu sítio ativo, ampliando sua atividade hidrolítica, inclusive contra carbapenêmicos (QUEENAN & BUSH, 2007). Apenas 11 das variantes conhecidas de GES são consideradas carbapenemases (NAAS *et al.*, 2016)

Apesar de pouco frequentes, as carbapenemases GES tem ampla distribuição global (WALSH, 2010) e alguns surtos já foram identificados (DE VRIES *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2003; JEONG *et al.*, 2005; POIREL *et al.*, 2002). No Brasil foram relatados casos isolados (PICÃO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2014a, 2014b).

### **3.5.2 Carbapenemases de classe B**

As enzimas de classe B são metalo- $\beta$ -lactamases (MBL). Estas enzimas possuem dois íons de zinco em seu sítio ativo e, portanto, susceptíveis a ação de agentes quelantes como o EDTA. Possuem ação hidrolítica sobre todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto monobactâmicos (aztreonam). Diversas variantes já foram

descritas (IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, DIM, AIM, NDM, KHM, TMB, SMB, FIM) (QUEENAN & BUSH, 2007; KHAN *et al.*, 2017).

Mais frequentes em bactérias gram-negativas não-fermentadoras da glicose, como *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. (NORDMANN & POIREL, 2002), a primeira MBL relatada em enterobactérias foi uma IMP-1, encontrada em *Serratia marcescens*, em 1991, no Japão (ITO *et al.*, 1995), e desde então vem sendo reportadas com uma certa regularidade ao redor do mundo (NORDMANN *et al.*, 2011b).

Atualmente, a mais frequente e preocupante MBL em enterobactérias é a Nova-Dheli metalo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1). O primeiro caso documentado de infecção causada por bactérias produtoras de NDM ocorreu em 2008, na Índia (YONG *et al.*, 2009), e, logo após, em 2010 já havia relatos da disseminação mundial dessa enzima. Mais da metade dos casos reportados no Reino Unido tinham histórico de viagens a Índia ou Paquistão (JOHNSON & WOODFORD, 2013; MOLTON *et al.*, 2013). A rápida disseminação desta enzima foi inicialmente associada ao “turismo médico” (JOHNSON & WOODFORD, 2013).

Na América Latina, os primeiros relatos de NDM-1 foram em 2012, na Guatemala (PASTERAN *et al.*, 2012), Colômbia (ESCOBAR *et al.*, 2013), Paraguai e no Uruguai (PAHO, 2012). O primeiro relato de sua ocorrência no Brasil foi em 2013, na cidade de Porto Alegre, em *Providencia rettgeri* e em *Enterobacter cloacae* (ANVISA, 2013). Atualmente já existem 16 variantes descritas para NDM (LAHEY CLINIC, 2018).

Apesar de não hidrolisarem o aztreonam, 80% dos microrganismos produtores de MBL são resistentes a este agente pela co-ocorrência de ESBLs e AmpCs (LIVERMORE *et al.*, 2011).



### 3.5.3 Carbapenemases de classe D

As carbapenemases de classe D, também chamadas de oxacilinasas (OXAs) possuem baixo poder hidrolítico contra os carbapenêmicos e apresentam uma ampla variabilidade no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). Altos níveis de resistência são encontrados quando da associação deste com outros mecanismos (NORDMANN & POIREL, 2002; QUEENAN & BUSH, 2007). Sua atividade não é bloqueada por inibidores enzimáticos (EDTA, ácido clavulânico, ácido fenilborônico, cloxacilina), o que torna sua detecção fenotípica um desafio e contribui para subnotificação desta classe de enzimas (CASTANHEIRA *et al.*, 2011).

Estas enzimas são muito frequentes em *Acinetobacter baumannii* (OXA-51, OXA-23), mas sua prevalência vem aumentando nos isolados de enterobactérias (NORDMANN & POIREL, 2002; POIREL *et al.*, 2007; POIREL *et al.*, 2011).

OXA-48, variante mais relevante em enterobactérias, foi primeiro reportada em 2004, em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia e desde então tem sido uma fonte importante de surtos (POIREL *et al.*, 2004; 2011)

No Brasil, temos a ocorrência de *bla*<sub>OXA-370</sub> em enterobactérias, uma OXA semelhante a OXA-48 (OXA-48-like) que se difere desta em apenas 3 nucleotídeos, que resultam na substituição de um único aminoácido em sua cadeia (SAMPAIO *et al.*, 2014).

Recentemente um estudo relatou a disseminação de OXA-370 em diversas espécies de enterobactérias no Brasil, demonstrando o alto potencial de disseminação deste gene (MAGAGNIN *et al.*, 2017). A distribuição global das principais carbapenemases em *Enterobacterales* está demonstrada abaixo na figura 1.

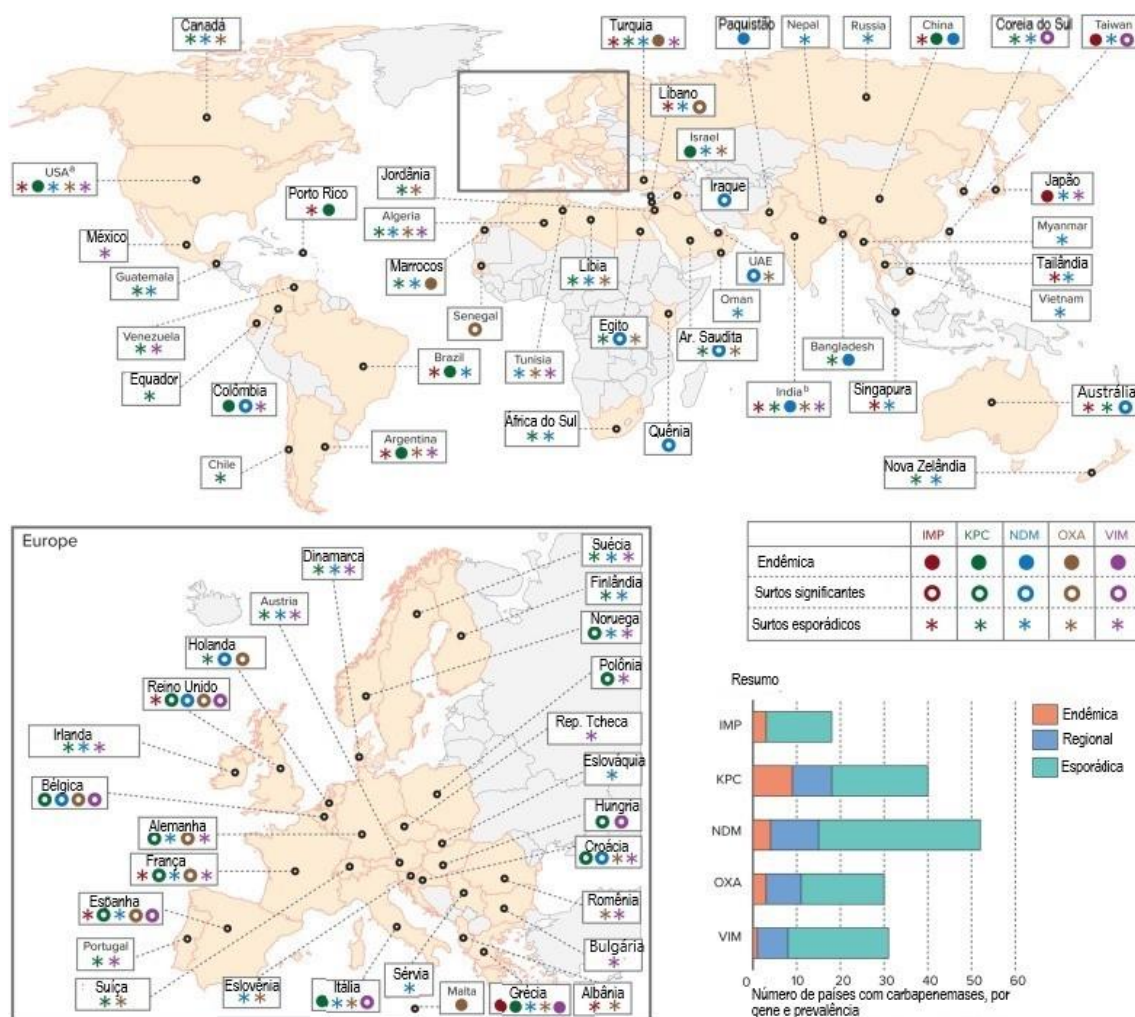


Figura 1: Distribuição global das principais carbapenemases em *Enterobacteriales*, por país e região. Obtida de Logan & Weinstein, 2017. <sup>a</sup>KPC é endêmica em alguns estados dos Estados Unidos da América. <sup>b</sup>OXA refere-se principalmente a OXA-48, exceto na Índia, que se refere a OXA-181. Abreviações: IMP – imipenem metalo- $\beta$ -lactamase; KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM – New-Dheli metalo- $\beta$ -lactamase; OXA – oxacilinas; VIM – Verona *integron-encoded* metalo- $\beta$ -lactamase;

Epidemias de doenças infecciosas estão crescendo em frequência e severidade (SANDS *et al.*, 2016; HEYMANN *et al.*, 2015). Os laboratórios clínicos sofrem pressão constante para a liberação de resultados cada vez mais rápidos. As taxas de mortalidade em infecções causadas por produtores de carbapenemase pode ser até 3 vezes mais alta que a mortalidade causada por microrganismos sensíveis aos carbapenêmicos, mesmo que estes sejam multirresistentes. Um dos fatores que mais contribui para isso é justamente o atraso no uso de agentes microbiologicamente ativos no tratamento dessas infecções. Como produtores de carbapenemase podem se apresentar sensíveis aos carbapenêmicos pelos métodos tradicionais, inclusive os automatizados, existe uma demanda urgente para que sejam desenvolvidos e implementados

novos métodos rápidos de diagnóstico e detecção de carbapenemases para minimizar a morbidade e mortalidade destas infecções (CARVALHAES, 2014; MONACO *et al.*, 2014; BEN-DAVID *et al.*, 2012; GALLAGHER *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2018; BRIZENDINE, 2015; DAIKOS *et al.*, 2009; PATEL, 2008; TRECARICHI *et al.*, 2015; HUSSEIN *et al.*, 2013; PERKINS *et al.*, 2017; PORRECA *et al.*, 2018). Métodos rápidos para detecção de carbapenemases que eliminem períodos de incubação prolongado, como, por exemplo, diretamente de hemoculturas, constituem uma importante ferramenta para redução desta mortalidade (CARVALHAES *et al.*, 2014).

### **3.6 Métodos para detecção de carbapenemases**

#### **3.6.1 Métodos de triagem**

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de carbapenêmicos em enterobactérias produtoras de carbapenemase podem estar dentro dos pontos de corte para sensível/intermediário (S/I) (NORDMANN *et al.*, 2012; EUCAST, 2012; TATO *et al.*, 2007). Por isso, existem pontos de corte diferentes dos usados no antibiograma para a triagem de produtores de carbapenemase (ANVISA, 2013; EUCAST, 2012). Por exemplo, se um microrganismo apresenta CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  ou halo de inibição  $\geq 22$  mm para meropenem, ele é categorizado como sensível no antibiograma, mas ainda pode ser produtor de carbapenemase. Segundo o EUCAST, os pontos de corte para esta triagem com meropenem são  $> 1,2$   $\mu\text{g/mL}$  ou  $< 25$  mm. Mesmo assim, em alguns casos, produtores de OXA-48 podem apresentar diâmetro de halo de até 26 mm. Em países onde esta enzima é endêmica, recomenda-se o ponto de corte  $< 27$  mm para meropenem (EUCAST, 2012).

Meropenem oferece a melhor combinação entre sensibilidade e especificidade, enquanto ertapenem apresenta excelente sensibilidade, mas pouca especificidade, por ser instável frente a ESBLs e AmpCs quando associadas com perda de porinas (NORDMANN *et al.*, 2012; VADING *et al.*, 2011). Já com imipenem, a diferenciação entre fenótipo selvagem e produtor de carbapenemase é pouco confiável, portanto, não deve ser utilizado isoladamente

como teste de triagem (EUCAST, 2012). Os pontos de corte apropriados para detecção de produtores de carbapenemase são mostrados na tabela 2.

Uma vez detectada a sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos no teste de triagem, os métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases devem ser empregados (EUCAST, 2012).

Tabela 2: Pontos de corte para triagem de enterobactérias produtoras de carbapenemases (adaptado de EUCAST, 2012)

Carbapenêmico	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		Diâmetro do halo de inibição (mm) com discos de 10 $\mu\text{g}$	
	Ponto de corte (S/I)	Ponto de corte para triagem	Ponto de corte (S/I)	Pontos de corte para triagem
Meropenem	$\leq 2$	$> 0,12$	$\geq 22$	$< 25$
Imipenem	$\leq 2$	$> 1,0$	$\geq 22$	$< 23$
Ertapenem	$\leq 0,5$	$> 0,12$	$\geq 25$	$< 25$

Legenda: CIM – concentração inibitória mínima; S – sensível; I – intermediário;

### 3.6.2 Métodos fenotípicos para produção de carbapenemase

#### 3.6.2.1 Teste de Hodge Modificado (MHT)

O MHT (figura 2) foi preconizado por muitos anos pelo CLSI como teste fenotípico para pesquisa de carbapenemases. Apesar de resultados relativamente bons para KPC, é difícil de interpretar, pode apresentar falsos-positivos em isolados com altos níveis de AmpC e altas taxas de falsos-negativo (> 50%) para isolados produtores de NDM e, por isso, não é mais indicado como teste para detecção de carbapenemases (CASTANHEIRA *et al.*, 2011; MIRIAGOU *et al.*, 2010; NORDMANN *et al.*, 2012; ANVISA, 2013).

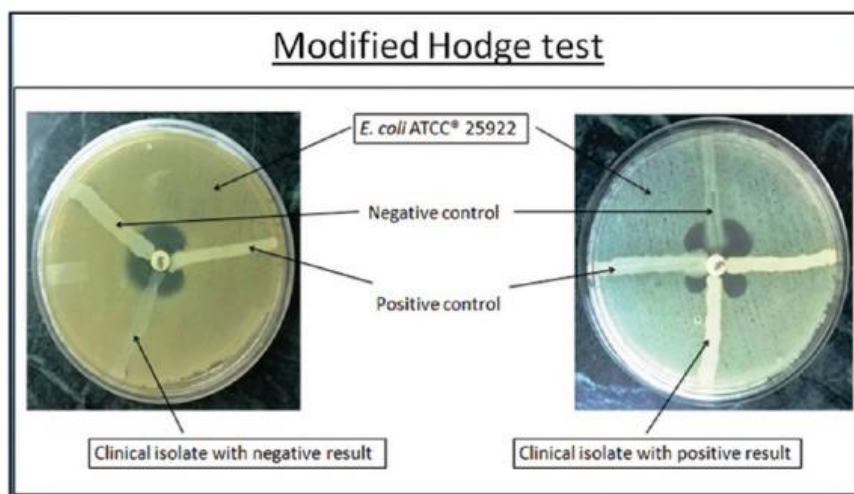


Figura 2: Teste de Hodge Modificado – obtido de Datta *et al.*, 2017

#### 3.6.2.2 Teste de disco combinado com inibidores

O teste de discos combinados com inibidores (figura 3), que consiste na utilização de discos de carbapenêmicos com e sem inibidores de  $\beta$ -lactamases, tem como principais vantagens sua fácil execução, disponibilidade comercial e ampla validação por estudos (GISKE *et al.*, 2011; ANVISA, 2013; VAN DIJK *et al.*, 2013). Os inibidores recomendados são o ácido borônico/fenilborônico para as carbapenemases de classe A (figura 4), o ácido dipicolínico ou EDTA para as carbapenemases de classe B e a cloxacilina, que inibe as  $\beta$ -lactamases de classe C, para diferenciar entre hiperprodução de AmpC com perda de porinas de produção de carbapenemase. Isolados com diferença  $\geq 5$  mm na presença do inibidor indicam um teste positivo para a respectiva classe de carbapenemase. Não há até o momento nenhum inibidor disponível para

carbapenemases de classe D, o que, juntamente com a necessidade de um período de incubação prolongado (18-24 horas), constituem as principais desvantagens deste método (ANVISA, 2013; EUCAST, 2012).

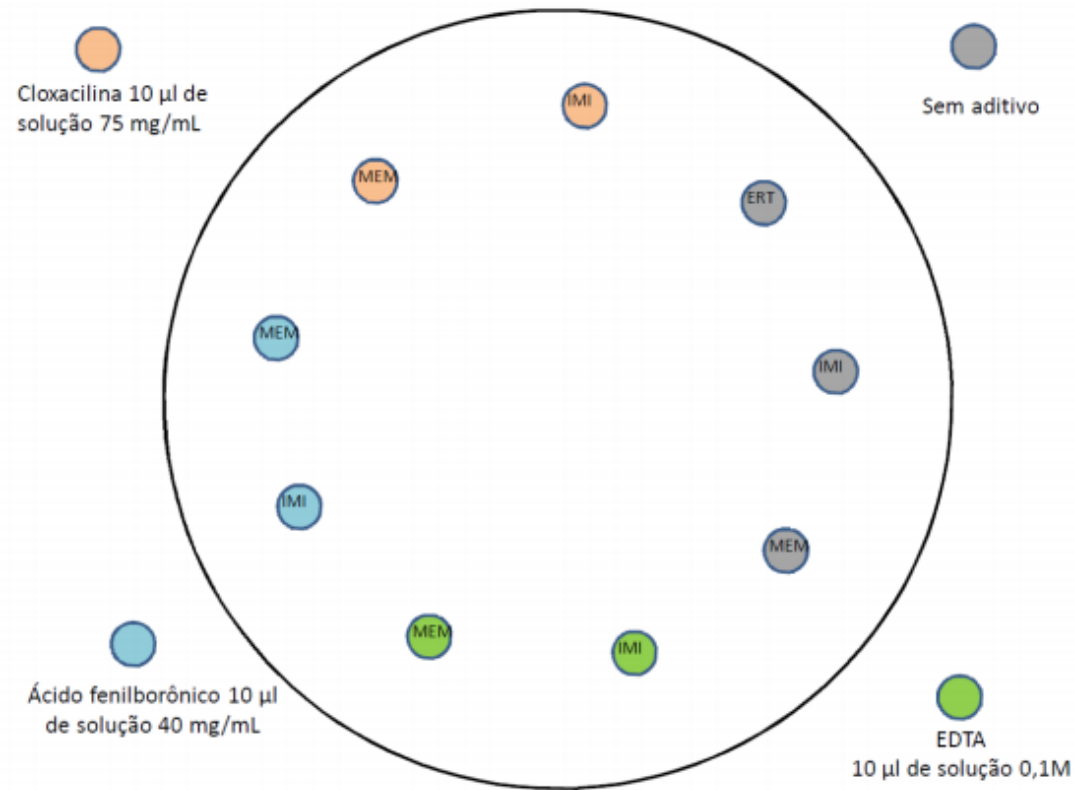


Figura 3: Esquema para aplicação dos discos no teste de discos combinados. MEM – meropenem; IMI – imipenem; ERT – ertapenem. Obtido de ANVISA, 2013.

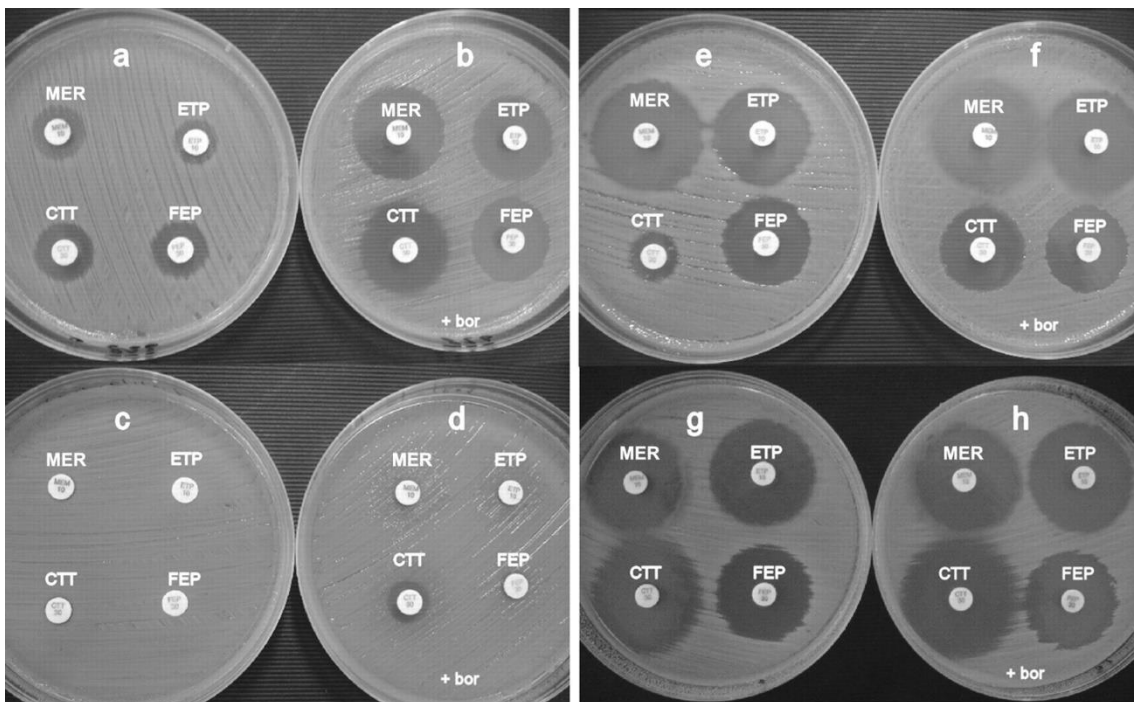


Figura 4: Resultados representativos do teste com e sem ácido fenilborônico (bor) para isolados produtores de KPC/ESBL (a e b), VIM (c e d), AmpC/ESBL (e e f) ou ESBL (g e h). MER – meropenem, ETP – ertapenem, CTT – cefotetan, FEP – cefepime. Obtido de Tsakris *et al.*, 2009.

### 3.6.2.3 Método modificado de inativação de carbapenêmicos (Modified Carbapenem Inactivation Method – mCIM)

Este teste consiste em incubar um disco de meropenem em uma suspensão bacteriana do isolado a ser testado por 4 horas. Após este período, deve-se transferir este disco para uma placa de mueller-hinton recém inoculada com *E. coli* ATCC® 25922, que é sensível ao meropenem. A leitura é realizada após incubação *overnight*. Quando o isolado testado for produtor de carbapenemase, o meropenem do disco terá sofrido hidrólise e conseqüentemente não terá a capacidade de inibir o crescimento da cepa ATCC®. Isto é observado pela ausência ou diminuição do tamanho do halo de inibição do meropenem. Halos de inibição  $\geq 19$  mm representam um teste negativo, enquanto halos entre 6 e 15 mm, ou crescimento de colônias dentro de um halo de 16 a 18 mm representam um teste positivo para produção de carbapenemase (figura 5). Halos entre 16 e 18 mm sem o crescimento de colônias dentro do halo representam um teste indeterminado (CLSI, 2017). Apesar de não ser um teste rápido e de não ter a capacidade de diferenciar as carbapenemases, possui baixo custo, é de fácil execução e apresenta uma ótima sensibilidade, inclusive para OXA-48like (PIERCE *et al.*, 2017; TAMMA *et al.*, 2017)



Figura 5: resultado positivo – produtor de carbapenemase (à esquerda) e negativo – não-produtor de carbapenemase (à direita) para o teste mCIM. MEM – meropenem. Obtido de CLSI, 2017.



### 3.6.2.4 Meios cromogênicos

A utilização de meios cromogênicos é uma realidade na maioria dos laboratórios de microbiologia. Já existem diversos meios comercialmente disponíveis para detecção da produção de carbapenemases. Dentre estes, devemos citar os meios chromID CARBA, SUPERCARBA, chromID OXA-48 e o CHROMID® CARBA SMART (figura 6). O meio SUPERCARBA demonstrou maior sensibilidade e especificidade para as carbapenemases de classe A e B, enquanto o chromID OXA-48 demonstrou maior especificidade para OXA-48, embora tenha apresentado uma sensibilidade um pouco menor. Como a especificidade do SUPERCARBA é baixa para OXA-48, o ideal é que estes meios sejam usados complementarmente para detecção de enterobactérias produtoras de carbapenemase (VRIONI *et al.*, 2012; WILKINSON *et al.*, 2012; GIRLICH, 2013).

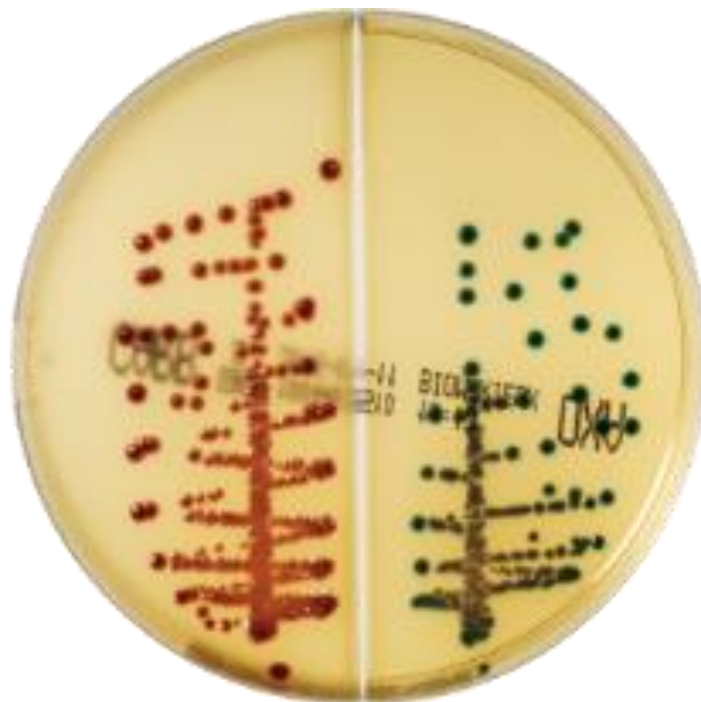


Figura 6: CHROMID® CARBA SMART. *Screening* para NDM, KPC (à esquerda) e OXA-48 (à direita). Obtido de Biomeriêu<sup>TM</sup>.

### 3.6.2.5 Testes imunocromatográficos

Ensaio de fluxo lateral imunocromatográfico são amplamente utilizados no laboratório clínico. Para detecção de carbapenemases, estes ensaios são desenvolvidos baseados em anticorpos monoclonais induzidos em

camundongos (GLUPCZYNSKI *et al.*, 2016). Diversos estudos têm demonstrado sua elevada sensibilidade e especificidade (WAREHAM *et al.*, 2016; DORTET *et al.*, 2016; MEUNIER *et al.*, 2016; PASTERAN *et al.*, 2016). O mais recente destes testes, chamado de O.K.N (OXA/KPC/NDM), demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para as carbapenemases pesquisadas em apenas 15 minutos de teste, inclusive detectando isolados coprodutores (figura 7). Uma das limitações deste teste é não ser capaz de detectar outras carbapenemases além de OXA, KPC e NDM, necessitando de testes adicionais quando a triagem para carbapenemase der positiva. Mesmo com essa limitação, devido a baixa prevalência das demais carbapenemases, o teste O.K.N é uma ferramenta poderosa para detecção de isolados produtores de carbapenemases (GLUPCZYNSKI *et al.*, 2017).

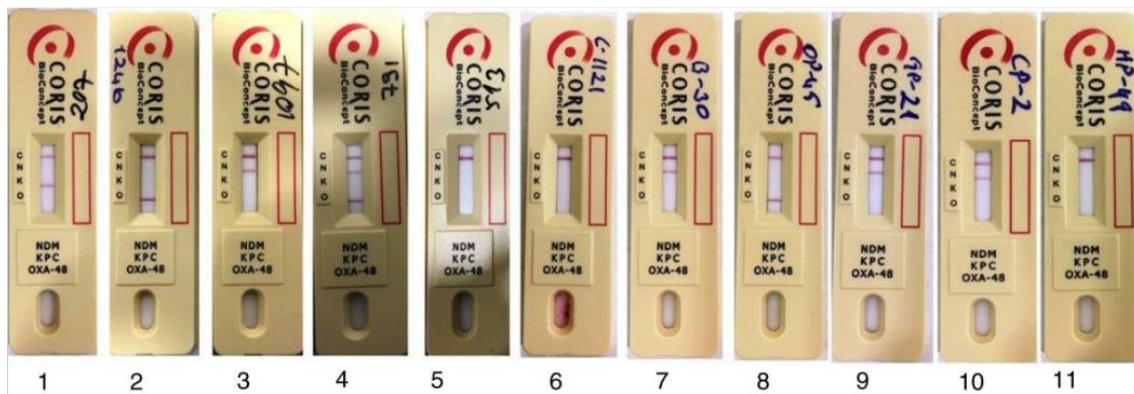


Figura 7: Resultados no Resist-3 O.K.N K-Set. 1 – *K. pneumoniae* produtora de KPC; 2 – *K. pneumoniae* produtora de OXA-48; 3 – *K. pneumoniae* produtora de NDM; 4 – *K. pneumoniae* coprodutora de OXA-48 e NDM; 5 – *K. pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos (controle negativo); 6 – *E. cloacae* produtor de IMP; 7; *E. cloacae* produtor de NDM; 8 – *S. marcescens* produtora de OXA-48; 9 – *E. coli* produtora de NDM; 10 – *C. freundii* produtor de NDM; 11 – *E. coli* sensível aos carbapenêmicos (controle negativo). Obtido de Sağıroğlu *et al.*, 2018.

### 3.6.2.6 Carba NP/Blue Carba

O Carba NP (figura 8) é um teste rápido que se baseia na detecção da alteração de pH causada pela hidrólise do imipenem através do uso de um indicador (vermelho de fenol). Este teste demonstrou elevada sensibilidade e especificidade para detecção de qualquer tipo de carbapenemase produzida por enterobactérias (DORTET *et al.*, 2014; VASOO *et al.*, 2013). Já disponível comercialmente (RAPIDEC®CARBA NP).

Visando a detecção de MBL, uma nova versão do Carba NP foi desenvolvida, baseada na inibição da enzima pelo EDTA, mas este teste requer padronização *in house* pois ainda não se encontra disponível comercialmente (DORTET *et al.*, 2012)

Similar ao Carba NP temos o teste chamado Blue Carba (figura 9). Este teste se diferencia do Carba NP por usar azul de bromotimol como indicador de pH e dispensar o uso do tampão extrator, tornando-o mais barato sem perda de sensibilidade e especificidade (PIRES *et al.*, 2013).

Mais recentemente, uma nova versão do Carba NP foi proposta, chamada de Carba NP Test Direct. Este teste dispensa o tampão extrator e o substitui por um protocolo com o detergente Triton, reduzindo o custo do teste (PASTERAN *et al.*, 2015). O Carba NP vem sendo recomendado pelo CLSI como teste para detectar a produção de carbapenemase desde 2016 (CLSI, 2016).

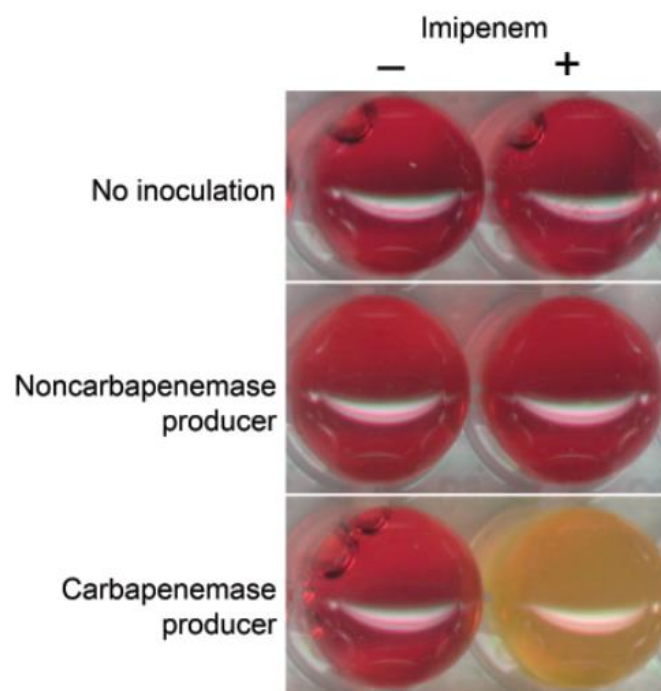


Figura 8: Resultados representativos do teste Carba NP realizado em placa de microdiluição – Obtido de Nordmann *et al.*, 2012b

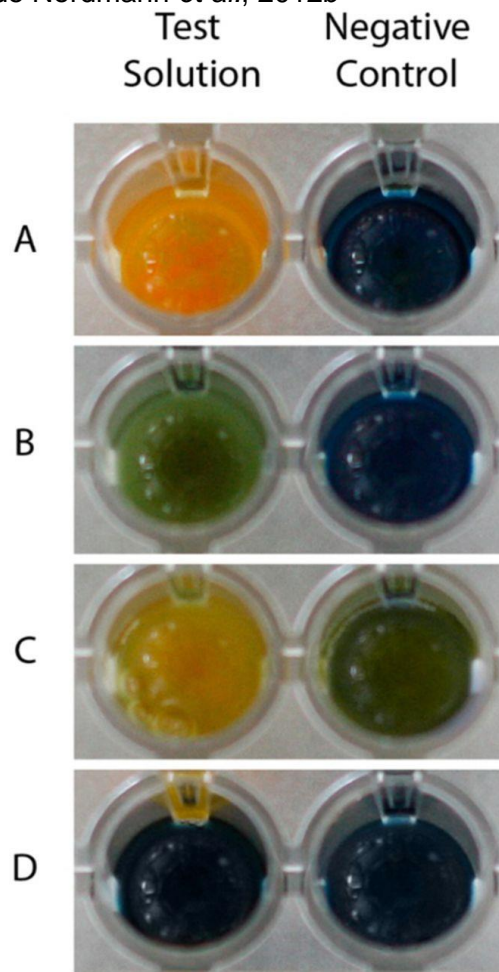


Figura 9: Resultados representativos do teste Blue Carba. A, B e C – produtores de carbapenemase. D – Não-produtor de carbapenemase. Obtido de Pires *et al.*, 2013.

### 3.6.2.7 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS)

A implementação do MALDI-TOF MS nos laboratórios de microbiologia vem reduzindo o tempo para liberação de exames culturais em aproximadamente 24 horas. (SENG *et al.*, 2010; WIESER *et al.*, 2012; PATEL, 2013; MITSUMA *et al.*, 2013; PATEL, 2015) Além deste enorme ganho no tempo de resposta, esta tecnologia tem se mostrado útil na epidemiologia clínica, na detecção de mecanismos de resistência e, mais recentemente, na realização de antibiograma rápido (EDWARD-JONES *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2002; MAJCHERCZYK *et al.*, 2006; SZABADOS *et al.*, 2012; HRABÁK *et al.*, 2013; CARVALHAES *et al.*, 2014; KOSTRZEWA *et al.*, 2013; LANGE *et al.*, 2014)

O MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- $\beta$ -Lactamase (MBT-STAR-BL) é um teste de hidrólise amplamente validado, que é ser utilizado para avaliar a ação de  $\beta$ -lactamases sobre agentes  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos. O ensaio consiste em detectar alterações na massa de determinados marcadores, que são os próprios antimicrobianos e seus subprodutos de degradação (figura 10). Este teste possui um custo relativamente baixo e um curto tempo de incubação (máximo de 180 minutos) (HRABÁK *et al.*, 2011; BURCKHARDT *et al.*, 2011; SPARBIER *et al.*, 2012; CARVALHAES *et al.*, 2014; TENOVER *et al.*, 2006).

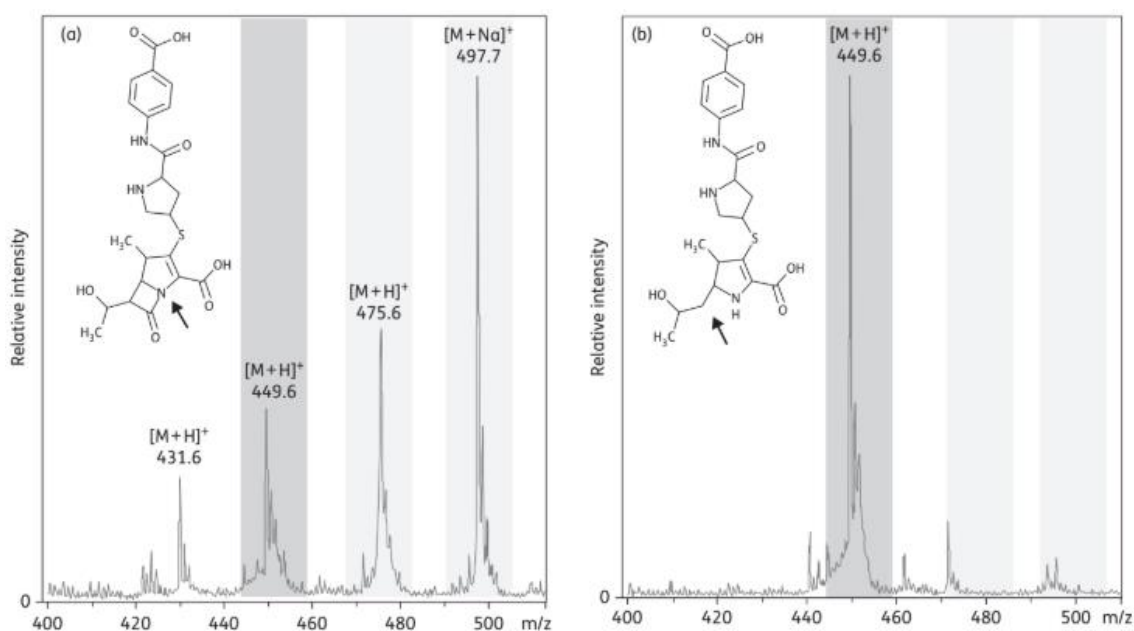


Figura 10: Análise da degradação de ertapenem (ERT) em MALDI-TOF MS pela metodologia MBT STAR-BL. (a) Resultado de um microrganismo não-produtor de

carbapenemase – o pico de ERT ionizado aparece em 475.6 m/z e seu sal monossódico aparece em 497.7 m/z, enquanto sua fração hidrolisada e descarboxilada (449.6 m/z) pode estar presente mesmo em não-produtores de carbapenemase. (b) Pico intenso em 449.6 m/z representativo da fração hidrolisada e descarboxilada do ERT, produto da degradação por carbapenemase. Observa-se que as frações ionizadas (475.6 m/z) e monossódica (497.7 m/z) desaparecem. Obtido de Carvalhaes *et al.*, 2014.

Dois estudos demonstraram ser possível associar a detecção de um único pico (~11.109 Da) no espectro de identificação gerado pelo MALDI-TOF MS com a presença do gene *bla<sub>KPC</sub>* em *K. pneumoniae* (LAU *et al.*, 2014; GAIBANI *et al.*, 2016). A presença deste pico está relacionada a proteína pKpQIL\_p019, codificada pelo gene p019, comumente associado a isoforma “a” do transposon Tn4401, estando ausente em plasmídeos portando outras isoformas (figura 11). (GAIBANI *et al.*, 2016). Devido ao alto valor preditivo positivo desta abordagem para *bla<sub>KPC</sub>* e dos benefícios clínicos e epidemiológicos que a sua aplicação pode trazer, mais estudos são necessários para determinação de picos que sirvam como marcadores das demais isoformas do transposon Tn4401 para rápida detecção deste importante mecanismo de resistência (LAU *et al.*, 2014; GAIBANI *et al.*, 2016).

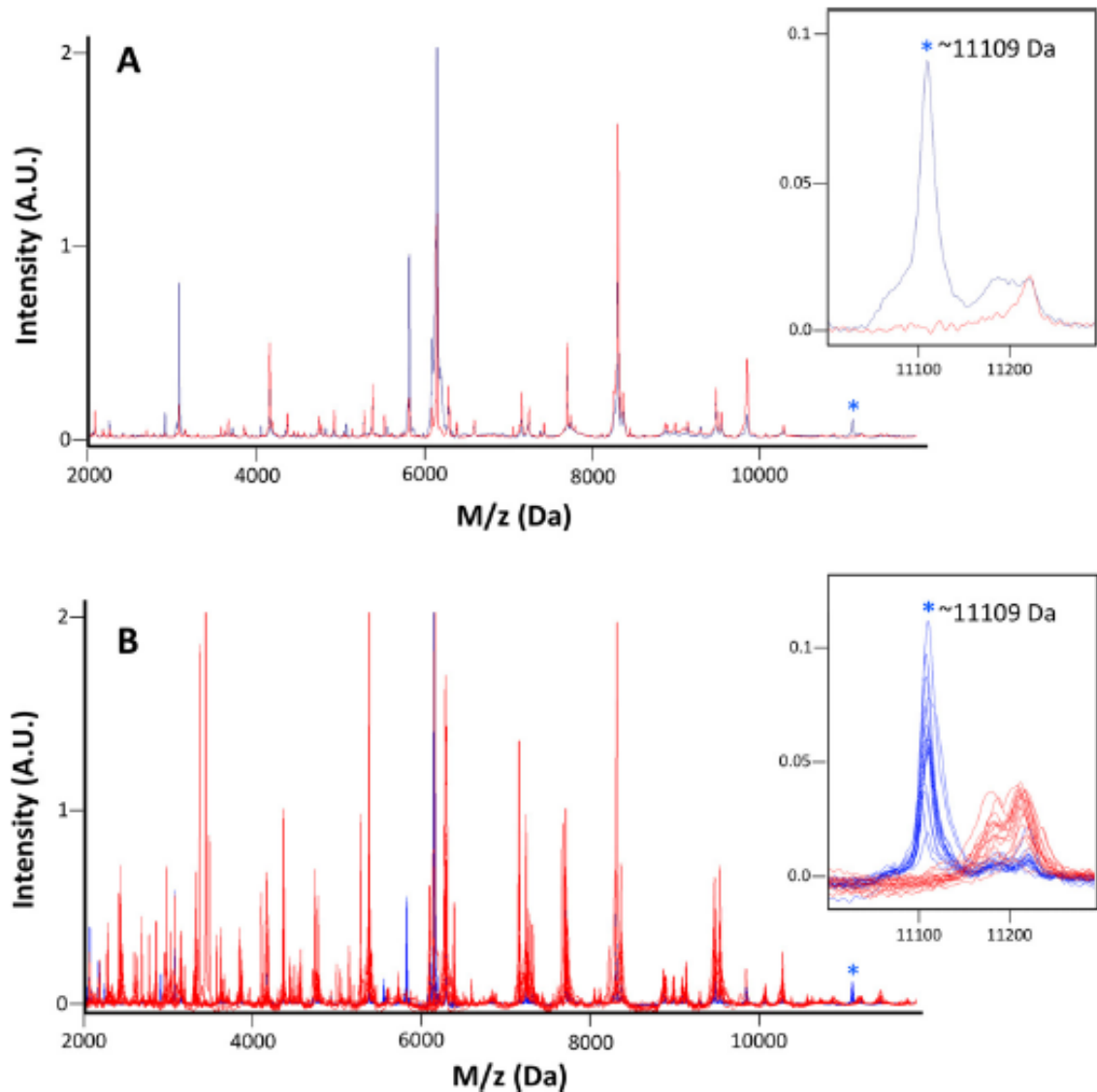


Figura 11: Pico associado a presença de  $bla_{KPC}$  em MALDI-TOF MS. (A) Espectros em MALDI-TOF MS de *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC positiva - azul) demonstrando um pico em 11.109 Da (\*) que está ausente nos espectros de *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (KPC negativa - vermelho). (B) Sobreposição de 18 espectros de isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC positivas (azul) e 18 espectros de isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC negativas (vermelho). Obtido de Lau *et al.*, 2014.

### 3.6.2.8 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

As análises de misturas complexas necessitam da combinação de técnicas de separação com MS (WILLIAMS & BURINSKY, 2001; MCLAFFERTY F.W., 2001; KONDRAT R.W., 2001). Estes métodos, chamados de hifenados (por causa do hífen utilizado para separar as siglas que denominam as técnicas de separação acopladas a MS) adicionam uma nova dimensão a medição

analítica. Na prática, acoplar técnicas de separação à espectrometria de massas avançada proporciona alta ou até ultra alta resolução mesmo em matrizes (amostras) complexas. Enquanto fornece alta sensibilidade e resolução, permite separar o padrão de fragmentação de um único componente dos demais componentes da mistura, fornecendo um resultado mais preciso e confiável (WILLIAMS & BURINSKY, 2001; KONDRAT R.W., 2001; HOOKE *et al.*, 2001; ROSSI & SINZ, 2002; SCHALLEY C.A., 2003).

O modo MS/MS confere mais uma dimensão em termos de isolamento, seletividade, ou informação estrutural a análise. Enquanto a cromatografia distingue substâncias pelo seu tempo de retenção, o modo MS/MS as diferencia pela massa (MCLAFFERTY F.W., 2001; KONDRAT R.W., 2001; HOOKE *et al.*, 2001).

Desde que o Prêmio Nobel foi concedido às propriedades de análise de massas e aprisionamento de íons dos espectrômetros de massa em quadrupolo, esta tecnologia vem ganhando importância e espaço nos laboratórios (PAUL W., 1990; 1993; PAUL & STEINWEDEL, 1953; PAUL & RAETHER, 1955; LAWSON & TODD, 1972; DAWSON P.H., 1976; 1986). As vantagens dos sistemas em quadrupolo em espectrometria de massas é que estes possuem alto potencial de transmissão, são leves, compactos e comparativamente de baixo custo, possuem baixa voltagem de aceleração de íons e permitem altas velocidades de escaneamento. Associado a cromatografia líquida, os sistemas em quadrupolo proporcionam alta sensibilidade e alto poder de resolução (GROSS J.H., 2004).

Um analisador de massas em quadrupolo consiste de 4 eletrodos em forma de bastão em paralelo, arranjados próximos, em pares opostos, formando um quadrado (figura 12). Quando um íon entra no quadrupolo, ele sofre atração por um dos eletrodos, aquele que possui a carga contrária ao íon. Estes eletrodos recebem voltagens de corrente contínua e alternada. A aplicação destas voltagens é o que altera a trajetória linear dos íons no centro do quadrupolo. Fazendo-se variar essas voltagens, somente íons com uma determinada razão massa/carga ( $m/z$ ) atravessarão o centro do quadrupolo. Desta forma, seleciona-se a faixa de  $m/z$  que se pretende analisar (GROSS J.H., 2004).





Figura 12: Triplo quadrupolo. Obtida de GROSS J. H., 2004. Cortesia de Waters Corp., MS Technologies, Manchester, UK.

Para as análises em LC-MS/MS, os espectrômetros de massa em triplo quadrupolo são as ferramentas mais utilizadas. Desde sua introdução no mercado, estes equipamentos vêm sendo melhorados em termos de amplitude da faixa de massa analisada, resolução e sensibilidade (YOST & ENKE, 1978; YOST *et al.*, 1979; 1979b; HUNT *et al.*, 1980; DAWSON *et al.*, 1982; 1982b).

Para operar no modo MS/MS, o primeiro quadrupolo (Q1) funciona como primeiro detector de massas, o segundo quadrupolo (Q2) atua como célula de colisão ou “zona livre de campo elétrico” para as dissociações metaestáveis, e o terceiro quadrupolo (Q3) serve como detector para analisar os íons saídos do Q2. Tipicamente, os íons selecionados no Q1 são acelerados através do Q2, onde, em condições ideais cuidadosamente otimizadas, os íons são separados e se obtêm ganhos em eficiência e resolução. Ao sair do Q2, os fragmentos são detectados e analisados no Q3 (figura 13) (YOST *et al.*, 1979). Mais detalhadamente, o íon molecular é selecionado no primeiro quadrupolo (SIM). No segundo quadrupolo (célula de colisão/*collision cell*), o íon molecular é ativado pela colisão com um gás, como o nitrogênio. Este processo é chamado de *collision induced dissociation* (CID – dissociação induzida por colisão), que produz uma série de fragmentos iônicos. Um ou mais destes fragmentos característicos são selecionados para passar pelo terceiro quadrupolo até o detector. Este monitoramento é chamado de *single reaction monitoring* (SRM). Os sistemas triplo quadrupolo conseguem alternar rapidamente entre diversas reações, que podem gerar um único íon molecular ou diversos fragmentos iônicos, e detectá-los com alta sensibilidade. Este processo é chamado de

*multiple reaction monitoring (MRM)*. Tanto SIM quanto MRM podem ser utilizados para quantificação de compostos. Geralmente, dois fragmentos são selecionados para detecção, o que garante grande confiabilidade nos resultados (GROSS J.H., 2004; SHAH & GHARBIA, 2017).

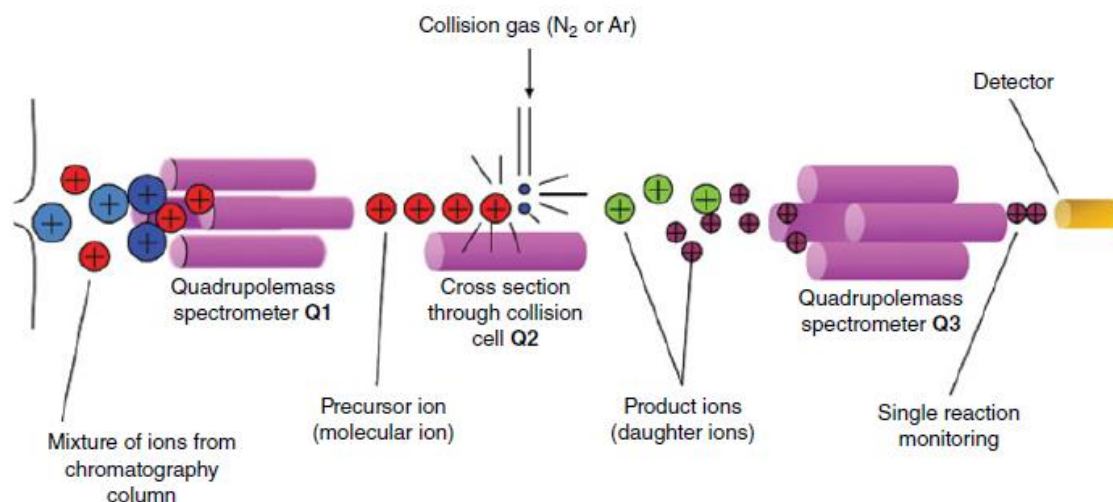


Figura 13: Funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo. Q1 – primeiro quadrupolo; Q2 – segundo quadrupolo (célula de colisão); Q3 – terceiro quadrupolo. Obtida de SHAH & GHARBIA, 2017.

Nos sistemas em quadrupolo um campo elétrico é utilizado para separar os íons de acordo com sua  $m/z$ . Este tipo de separação, chamada de *selected ion monitoring (SIM)* – monitoramento seletivo de íons) proporciona excelente sensibilidade. Além disso, estes sistemas podem ser utilizados para escanear uma determinada faixa de massa. Isto pode ser utilizado para ajustes no equipamento e para obter um cromatograma completo dos íons. Aqui a sensibilidade também pode ser aumentada monitorando a abundância de um ou mais íons em função do tempo (SHAH & GHARBIA, 2017).

### 3.6.2.8.1 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) em Microbiologia Clínica

No início dos anos 2000 as abordagens inicialmente exploradas no final dos anos 90 começaram a se consolidar (CLAYDON *et al.*, 1996; KEYS *et al.*, 2004; RAJENDRAM, 2003). Foi um período de considerável desenvolvimento em hardware, software e ferramentas de bioinformática. O sequenciamento total do genoma (*whole genome sequencing – wgs*) se tornou uma realidade nos laboratórios de pesquisa e, com o enorme volume de dados de sequenciamento acumulados, a identificação de proteínas por MS/MS, que é dependente de dados de sequenciamento, aumentou consideravelmente. Os campos da proteômica e genômica tornaram-se inseparáveis. Nascia a proteogenômica, ao ponto de as organizações reestruturarem seus laboratórios para otimizar esta interação (SHAH & GHARBIA, 2017). Novas abordagens em bioinformática permitiram a caracterização de biomarcadores microbianos e as análises de *bottom-up* em MS/MS aprofundaram os estudos dos proteomas microbianos, fornecendo novos *insights* em sua estrutura, metabolismo e patogenicidade (SHAH *et al.*, 2011; SHAH & GARBIA, 2010).

#### 3.6.2.8.1.1 Determinação de Resistência Antimicrobiana com LC-MS/MS

Diversos métodos foram reportados para detecção de carbapenemase utilizando LC-MS/MS. Um estudo avaliou a performance de MALDI-TOF MS e LC-MS para detecção da atividade de carbapenemase em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de SPM-1, GIM-1 e GES-5, *Acinetobacter baumannii* produtor de OXA-143, IMP-10 e OXA-58, e *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 e NDM-1/ESBL/ $\Delta$ OmpK36. Neste estudo, células bacterianas recentes eram incubadas com duas diferentes concentrações de ertapenem em um tampão (20 mM Tris-HCl, pH 6.8) por 2 a 4 horas. Isolados sensíveis ao ertapenem e não produtores de carbapenemase apresentaram picos na faixa de 475 m/z e 497 m/z, picos estes que representam a massa do ertapenem e seu respectivo sal, enquanto isolados produtores de carbapenemase não apresentavam estes picos, indicando a degradação do antibiótico pela enzima (CARVALHAES *et al.*, 2014)

Uma das vantagens do uso do LC-MS com relação ao MALDI-TOF é a possibilidade de quantificar o carbapenêmico e desta forma medir o nível de atividade enzimática. Como desvantagem nós temos o tempo de corrida cromatográfica, que acaba por deixar a análise mais lenta (SHAH & GHARBIA, 2017).

Um estudo utilizou LC-MS/MS para detectar a atividade de carbapenemases e quantificá-la. Neste estudo, o microrganismo foi cultivado em caldo LB contendo 50 µg/mL de meropenem. Após 2 horas de incubação a 37°C, o caldo foi centrifugado e uma alíquota do sobrenadante foi diluída, misturada com um padrão interno contendo meropenem marcado (*labelled*) e analisada. A concentração do meropenem hidrolisado foi calculada através da razão entre as áreas dos picos correspondentes aos íons do meropenem *versus* os íons do meropenem marcado (*labelled*). Os autores demonstraram que a concentração do meropenem pode ser diretamente correlacionada à atividade da carbapenemase (WANG *et al.*, 2013).

Outros métodos foram utilizados para avaliar a taxa de hidrólise de carbapenêmico utilizando LC-MS/MS. A taxa de hidrólise pôde ser calculada pela razão entre a concentração do carbapenêmico pré e pós-incubação (CARRICAJÓ *et al.*, 2014) ou pela razão entre a área do pico correspondente ao carbapenêmico *versus* a área do pico correspondente ao produto primário de hidrólise (KULKARNI *et al.*, 2014). Uma importante limitação destes métodos é que eles são indiretos (WANG *et al.*, 2017).

Uma abordagem para detecção direta de peptídeos de carbapenemases utilizando espectrometria de massas após digestão por tripsina foi patenteada e uma série de métodos relacionados foram testados (CHARRETIER *et al.*, 2012; CHARRETIER & SCHRENZEL, 2016).

Recentemente, Wang *et al.* padronizaram um método rápido para detecção de peptídeos específicos de KPC utilizando LC-MS/MS com um tempo para o resultado inferior a 90 minutos (WANG *et al.*, 2017). Inicialmente, uma abordagem genoproteômica *in silico* permitiu a determinação teórica de 11 peptídeos específicos. Esta abordagem consiste no alinhamento de variantes da enzima-alvo para obtenção de sequências de aminoácidos que sejam em comum entre estas variantes <<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>>. Após, estas sequencias são submetidas a digestão trípica *in silico* para obtenção dos

peptídeos. Estes peptídeos são submetidos a análise de especificidade através do BLASTP <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>> e selecionados para detecção por LC-MS/MS (WANG *et al.*, 2017).

Para este procedimento, foi obtido um lisado proteico bacteriano utilizando ácido fórmico 70% e acetonitrila, da mesma forma que a realizada para melhorar a sensibilidade e especificidade das análises em MALDI-TOF MS (LAU *et al.*, 2014). Este lisado foi centrifugado, aliquoteado e evaporado em *SpeedVac* sob altas temperaturas. As proteínas intactas foram ressuspensas em bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) e digeridas com tripsina em banho-maria ou utilizando um sistema de micro-ondas por 15-60 minutos a  $55^\circ\text{C}$ . As amostras digeridas foram centrifugadas e analisadas em LC-MS/MS. Dos 11 peptídeos inicialmente selecionados para análise, foi possível detectar 4 peptídeos específicos para KPC com sensibilidade e especificidade de 100% (figura 14). A abordagem utilizada neste estudo pode ser amplamente utilizada nos mais variados determinantes da resistência antimicrobiana (WANG *et al.*, 2017).

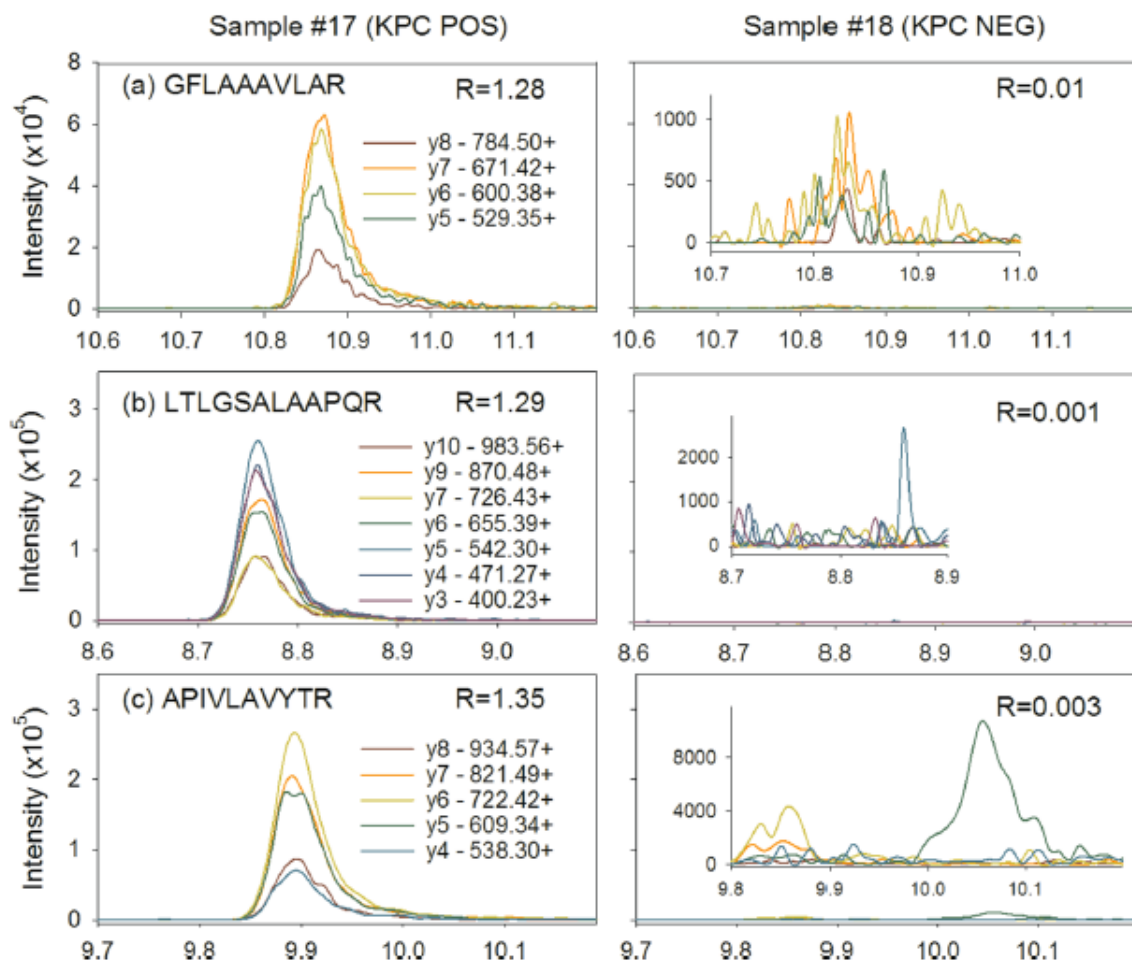


Figura 14: Cromatogramas em LC-MS/MS dos 3 peptídeos selecionados como marcadores de KPC. (a) é GFLAAAVLAR, (b) é LTLGSALAAPQR e (c) é APIVLAVYTR. Amostra #17 é KPC-positiva (esquerda) e amostra #18 (direita) é KPC-negativa. O eixo horizontal representa o tempo de retenção (TR) e o eixo vertical representa a intensidade dos picos.

### 3.6.2.9 Outras abordagens em MS

Sem sombra de dúvidas, dentre as ferramentas envolvendo espectrometria de massas (MS), a mais extensivamente explorada em microbiologia e, inclusive, para detecção de carbapenemases, é a tecnologia de MALDI-TOF MS (MONTEFERRANTE *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2016; GHEBREMEDIN *et al.*, 2016; MIRANDE *et al.*, 2015). Apesar disso, outras tecnologias envolvendo MS vem sendo exploradas para este fim.

Um método baseado em *shotgun proteomics* utilizando digestão trípica assistida por micro-ondas seguida de *liquid chromatography (LC)-nano-electrospray ionization trap MS* identificou OXA- $\beta$ -lactamases e resistência a carbapenêmicos associada a proteínas CarO em *Acinetobacter baumannii* (CHANG *et al.*, 2013). Outro método, baseado em *capillary electrophoresis-electrospray ionization(CE-ESI) MS/MS* foi capaz de identificar peptídeos de KPC e OXA-48 carbapenemases de isolados clínicos (FLEURBAAIJ *et al.*, 2014). Estes estudos demonstraram o potencial destas abordagens, mas seu tempo de resposta de aproximadamente 16 horas não satisfaz as necessidades de um laboratório de microbiologia clínica (WANG *et al.*, 2017).

Mais recentemente, um método baseado em *ESI-triple quadrupole MS (ESI QqQ MS) and rapid selected reaction monitoring (SRM)* foi capaz de detectar peptídeos de PBP2a e PBP2c em *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA) em 60-80 minutos, demonstrando a aplicabilidade dessa estratégia à realidade dos laboratórios de medicina diagnóstica (CHARRETIER *et al.*, 2015).

### 3.6.3 Métodos moleculares

Métodos fenotípicos podem detectar com bastante eficiência a produção de carbapenemases e, mais recentemente, até identificar especificamente qual enzima está sendo produzida (CHARRETIER *et al.*, 2016; GLUPCZYNSKI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Mas existem situações onde o fenótipo é pouco expresso ou há necessidade de identificar qual o(s) gene(s) envolvido(s) na produção de carbapenemase. Nestas situações, os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são considerados o padrão-ouro (CORNAGLIA *et al.*, 2007; NORDMANN *et al.*, 2011).

Diversos estudos abordaram a utilização de PCR para identificar genes codificadores de carbapenemases (MENDES *et al.*, 2007; SWYANE *et al.*, 2011; DALLENE *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2011b) mas sem dúvida, um dos testes que melhor representa os métodos moleculares na detecção de carbapenemases em termos de sensibilidade, especificidade e aplicabilidade foi desenvolvido por Monteiro *et al.*, utilizando a técnica de PCR em tempo real *High Resolution Melting (HRM)* (MONTEIRO *et al.*, 2012). Esta técnica utiliza a relação entre a temperatura e a desnaturação do fragmento amplificado. Após a conclusão do ciclo de PCR em tempo real, o equipamento inicia um processo de aumento de temperatura, que se inicia em torno dos 65°C e aumenta 0,1°C por segundo, monitorando a emissão de fluorescência a cada subida de temperatura, até atingir a faixa dos 95°C. Desta forma, consegue-se observar o ponto chamado Temperatura de *Melting* ( $T_m$ ), que é a temperatura em que 50% da dupla fita de DNA do fragmento amplificado sofre dissociação, tornando-se fita simples. A  $T_m$  é diretamente proporcional ao tamanho do fragmento amplificado e intimamente relacionada ao conteúdo GC da dupla fita. Utilizando-se um corante fluorescente que se intercala no DNA, detecta-se a emissão de fluorescência quando a  $T_m$  é atingida (TONG & GIFFARD, 2012). Esta técnica vem sendo amplamente utilizada em diversos estudos moleculares e epidemiológicos (figura 15) (MONTEIRO *et al.*, 2012; ROZALES *et al.*, 2017; MAGAGNIN *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2017; ANTOCHEVIS *et al.*, 2018).

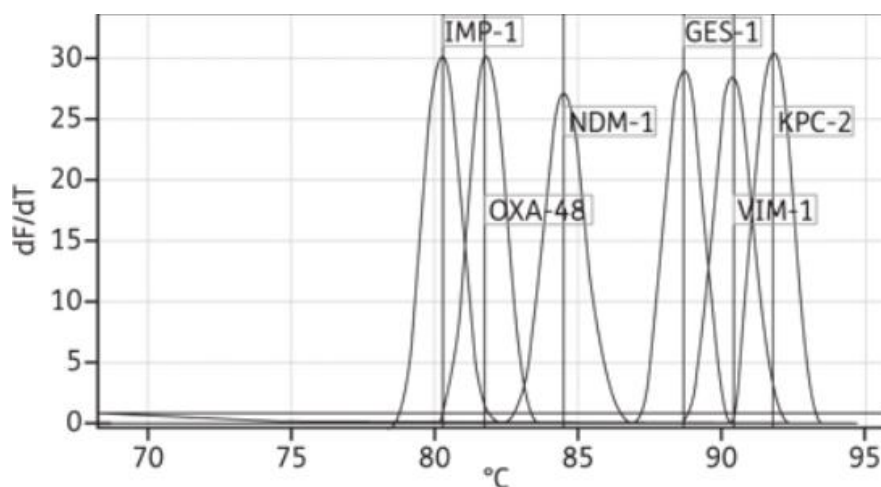


Figura 15: Resultados da técnica de PCR em tempo real *High Resolution Melting (HRM)*. Os genes-alvo, da esquerda para a direita, e suas respectivas temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) são:  $bla_{IMP}$  ( $T_m$  80.1°C),  $bla_{OXA-48}$  ( $T_m$  81.6°C),  $bla_{NDM-1}$  ( $T_m$  84°C),  $bla_{GES}$  ( $T_m$  88.4°C),  $bla_{VIM}$  ( $T_m$  90.3°C) and  $bla_{KPC}$  ( $T_m$  91.6°C).



### 3.7 Opções terapêuticas para infecções causadas por ERC

Diversos estudos demonstraram que a monoterapia em infecções causadas por ERC está associada a um risco aumentado de mortalidade quando comparada a terapia combinada de antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2015; DAIKOS *et al.*, 2014; TUMBARELLO *et al.*, 2015; KONTOPIDOU *et al.*, 2014; QUERESHI *et al.*, 2011; TUMBARELLO *et al.*, 2012; ZARKOTOU, *et al.*, 2011). Além disso, a resistência aos carbapenêmicos minimiza a utilidade da maioria dos  $\beta$ -lactâmicos disponíveis comercialmente, forçando os médicos a utilizarem combinações de antimicrobianos, muitas vezes ultrapassados e com maior toxicidade (AKOVA *et al.*, 2012)

Apesar do grande número de estudos, a abordagem terapêutica adequada contra as infecções causadas por ERC permanece indefinida (AKOVA *et al.*, 2012; LEE CS & DOI Y, 2014)

Dentre as abordagens terapêuticas em estudo estão a terapia de carbapenêmicos combinada com outros agentes antimicrobianos em infusão prolongada (TUMBARELLO *et al.*, 2015), combinação de dois carbapenêmicos (BULIK & NICOLAU, 2011; CPREK & GALLAGHER, 2015; OLIVA *et al.*, 2014; DE PASCALE *et al.*, 2017), combinação de carbapenêmicos com polimixinas (BERGEN *et al.*, 2012; BERGEN *et al.*, 2015), fosfomicina em monoterapia ou combinada com outros agentes (TUON *et al.*, 2013; ELLINGTON *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2017; ZAVASCKI *et al.*, 2017; ENDIMIANI *et al.*, 2009), aminoglicosídeos (ZAVASCKI *et al.*, 2017) em monoterapia (TZOUVELEKIS *et al.*, 2014; ALEXANDER *et al.*, 2012; SATLIN *et al.*, 2011) ou combinados com carbapenêmicos (TZOUVELEKIS *et al.*, 2014), tigeciclina (SADER *et al.*, 2015; VAN DUIN *et al.*, 2013; FREIRE *et al.*, 2010), ceftazidima-avibactam (ENDIMIANI, 2011; EHMANN *et al.*, 2012; CARMELI *et al.*, 2016; MACVANE *et al.*, 2014;) e meropenem-vaborbactam (LAPUEBLA, 2015; KAYE *et al.*, 2017). Em fase final de desenvolvimento ainda temos as opções: cefiderocol (KOHIRA *et al.*, 2016), plazomicina (ACHAOGEN, 2016), imipenem-relebactam (LAPUEBLA *et al.*, 2015; LIVERMORE *et al.*, 2013) e eravaciclina (ZHANEL *et al.*, 2016; SOLOMKIN *et al.*, 2017). Os prós e contras das opções terapêuticas para as infecções causadas por ERC estão resumidos na tabela 3 e as opções terapêuticas em fase final de desenvolvimento se encontram na tabela 4.

Tabela 3 – Prós e contras das opções terapêuticas para ERC

<b>Opção terapêutica</b>	<b>Prós</b>	<b>Contras</b>	<b>Referências</b>
<b>Combinação de carbapenêmicos</b>	- Baixo custo;	- Dificuldade no ajuste de doses; - Dificuldade no desenvolvimento de testes <i>in vitro</i> ; - Evidência clínica limitada;	- BULIK & NICOLAU, 2011; - CPREK & GALLAGHER, 2015; - OLIVA <i>et al.</i> , 2014; - DE PASCALE <i>et al.</i> , 2017)
<b>Polimixinas</b>	- Altas taxas de susceptibilidade; - Baixo custo;	- Farmacocinética imprevisível; - Nefrotoxicidade; - Protocolos com polimixinas apresentam maior mortalidade quando comparados com protocolos contendo inibidores de $\beta$ -lactamase; - Seleção de cepas resistentes quando usada em monoterapia;	- BERGEN <i>et al.</i> , 2012; - BERGEN <i>et al.</i> , 2015;
<b>Fosfomicina</b>	- Disponível para uso via oral; - Segurança; - Bom desempenho em terapias combinadas;	- Desenvolvimento de resistência quando usada em monoterapia; - Formulação IV disponível somente na Europa; - Formulação VO efetiva apenas para cistite; - Evidência clínica limitada para o tratamento de ERC; - Custo;	- TUON <i>et al.</i> , 2013; - ELLINGTON <i>et al.</i> , 2006; - YU <i>et al.</i> , 2017; - ZAVASCKI <i>et al.</i> , 2017; - ENDIMIANI <i>et al.</i> , 2009;
<b>Aminoglicosídeos</b>	- Podem ser usados em monoterapia para o tratamento de ITUs; - Apresentam bom desempenho em terapia combinada;	- Nefrotoxicidade; - Ototoxicidade; - Altas taxas de mortalidade quando usados em monoterapia (não ITUs); - Pode necessitar de doses mais	- ZAVASCKI <i>et al.</i> , 2017; - TZOUVELEKIS <i>et al.</i> , 2014; - ALEXANDER <i>et al.</i> , 2012; - SATLIN <i>et al.</i> , 2011;

		altas para MICs mais altas;	
<b>Tigeciclina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altas taxas de susceptibilidade;</li> <li>- Demonstrou benefício quando em terapia combinada;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altas taxas de mortalidade;</li> <li>- Baixa concentração sérica;</li> <li>- Necessidade de altas doses para pneumonias;</li> <li>- Toxicidade gastrointestinal;</li> <li>- Desenvolvimento de resistência ao longo do tratamento;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SADER <i>et al.</i>, 2015;</li> <li>- VAN DUIN <i>et al.</i>, 2013;</li> <li>- FREIRE <i>et al.</i>, 2010;</li> </ul>
<b>Ceftazidima-avibactam</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Benefício na mortalidade quando comparado com protocolos contendo polimixinas;</li> <li>- Contém um novo inibidor de <math>\beta</math>-lactamase não-<math>\beta</math>-lactâmico;</li> <li>- Protocolo baseado em <math>\beta</math>-lactâmico;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desenvolvimento de resistência ao longo do tratamento;</li> <li>- Custo;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ENDIMIANI, 2011;</li> <li>- EHMANN <i>et al.</i>, 2012;</li> <li>- CARMELI <i>et al.</i>, 2016;</li> <li>- MACVANE <i>et al.</i>, 2014;</li> </ul>
<b>Meropenem-vaborbactam</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Superior à melhor opção terapêutica em um estudo prospectivo de infecções causadas por ERC;</li> <li>- Contém um novo inibidor de <math>\beta</math>-lactamase;</li> <li>- Protocolo baseado em <math>\beta</math>-lactâmico;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Custo;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LAPUEBLA, 2015;</li> <li>- KAYE <i>et al.</i>, 2017;</li> </ul>

Legenda: IV – intravenosa; VO – via oral; ERC – enterobactéria resistente aos carbapenêmicos; ITU – infecção do trato urinário; MIC – concentração inibitória mínima;

Tabela 4 – Opções terapêuticas em estágio final de desenvolvimento

<b>Agente</b>	<b>Indicação estudada</b>	<b>Observações</b>	<b>Referências</b>
<b>Cefiderocol</b>	- ITU complicada; - Infecções graves causadas por ERC;	- Novo mecanismo de ação baseado no transporte de ferro; - Alta estabilidade contra ESBLs e carbapenemases; - Demonstrou superioridade no tratamento de ITU complicada quando comparado com imipenem;	- KOHIRA <i>et al.</i> , 2016;
<b>Plazomicina</b>	- ITU complicada; - Infecções graves causadas por ERC;	- Estratégias de dosagem incluem monitoramento do nível sérico; - Tem potencial para regimes de única dose diária; - Significante redução da mortalidade quando comparada com colistina no tratamento de ICS por ERC; - Superior ao meropenem para ITU complicada;	- ACHAOGEN, 2016;
<b>Eravaciclina</b>	- ICIA; - ITU complicada;	- Não afetada por bombas de efluxo e proteínas ribossomais protegidas; - Mesmo desempenho de ertapenem para o tratamento de ICIA;	- ZHANEL <i>et al.</i> , 2016; - SOLOMKIN <i>et al.</i> , 2017;
<b>Imipenem-relebactam</b>	- Infecções graves resistentes a imipenem; - Pneumonia nosocomial e associada a ventilação-mecânica;	- O inibidor de $\beta$ -lactamase não é $\beta$ -lactâmico;	- LAPUEBLA <i>et al.</i> , 2015; - LIVERMORE <i>et al.</i> , 2013;

Legenda: ITU – infecção do trato urinário; ERC – enterobactérias resistente aos carbapenêmicos; ESBL –  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado; ICS – infecção de corrente sanguínea; ICIA – infecção complicada intra-abdominal;

Os estudos sugerem que algumas destas novas opções terapêuticas são realmente superiores em comparação ao que vem sendo usado no combate as infecções causadas por ERC. Ainda assim, existe a necessidade do desenvolvimento e utilização de métodos rápidos de diagnóstico para a diminuição do atraso na utilização de agentes microbiologicamente ativos para minimizar a morbidade e mortalidade destas infecções (PORRECA *et al.*, 2018).



#### 4 MANUSCRITO

O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 69 – 90, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta da descrição do Desenvolvimento de um método rápido para Detecção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em LC-MS/MS, método esse que consiste na digestão trípica de um lisado proteico bacteriano para detecção de peptídeos marcados específicos de KPC em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

















































## 5 OUTROS RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Detecção de marcadores de KPC em MALDI-TOF MS

Foram realizadas tentativas de detecção de marcadores de KPC em MALDI-TOF MS. Seguindo a abordagem descrita anteriormente (LAU *et al.*, 2014), foram realizados *screenings* na busca pelo pico de 11.109 m/z e por outros possíveis marcadores de KPC na faixa de detecção de 2 a 20 Kd, usualmente utilizada pelo software Bruker MALDI Biotyper System (v3.1 Bruker Daltonics, Inc.) para realizar a identificação rotineira dos isolados. Ao todo, 378 isolados foram submetidos a esta avaliação. Após análises nos softwares ClinProTools (v3.0; Bruker Daltonics, Inc.) e FlexAnalysis (v.3.4 Bruker Daltonics, Inc.), nenhum dos isolados apresentou o pico marcador em 11.109 m/z. Isso pode ser explicado pelo fato deste pico estar associado a uma proteína chamada pKpQIL\_p019, codificada pelo gene *p19* presente em plasmídeos da família pKpQIL e outros plasmídeos relacionados a esta família. Nesses plasmídeos, o gene *bla<sub>KPC</sub>* se localiza dentro de um transposon Tn4401, e o gene *p19* é localizado adjacente a este transposon. A questão é que este gene é localizado adjacente a isoforma 'a' do Tn4401 (LAU *et al.*, 2014; GAIBANI *et al.*, 2016). Do pequeno volume de dados relacionados a isso no Brasil, observamos que os nossos plasmídeos relacionados a KPC não são da família pKpQIL, e os transposons Tn4401 circulantes não são da isoforma 'a'. Além disso, o gene *p19* não foi detectado nesses plasmídeos (PÉRES-CHAPARRO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2014).

Na busca de outros possíveis marcadores, foram desenvolvidos algoritmos no software ClinProTools (v3.0; Bruker Daltonics, Inc.). Esta ferramenta (*Create classification model*) realiza uma análise comparativa entre dois ou mais grupos de espectros gerados pelo MALDI-TOF MS, indicando quais picos do espectro tem maior poder de diferenciação dentre os grupos. Os isolados de uma única espécie (*K. pneumoniae*) foram divididos em dois grupos para a análise: KPC-positivas e KPC-negativas. Esta classificação foi insuficiente para prover o poder de diferenciação necessário ao software. Para que sejam aumentadas as chances de sucesso na criação destes algoritmos, deve-se inicialmente selecionar somente uma espécie e o grupo positivo (KPC-positivas)

deve ser clonal enquanto o grupo negativo deve apresentar uma ampla variabilidade dentre os isolados. Dessa forma, o espectro médio (*average spectra*) do grupo positivo será representativo de um grupo mais homogêneo, aumentando a probabilidade de detecção de eventuais marcadores diferenciais quando comparado com o espectro médio gerado a partir do amplamente variado grupo negativo (MATSUMURA *et al.*, 2014). Infelizmente nosso banco de amostras não possui a caracterização de grupos clonais.

## 5.2 Detecção de peptídeos marcadores de KPC em MALDI-TOF MS

Recentemente, Wang *et al.* padronizaram um método rápido para detecção de peptídeos específicos de KPC utilizando LC-MS/MS com um tempo para o resultado inferior a 90 minutos (WANG *et al.*, 2017). Após a reprodução deste método com as devidas adequações a nossa realidade, foram realizadas tentativas de detecção dos peptídeos marcadores de KPC em MALDI-TOF MS. Dezesesseis isolados foram submetidos às tentativas de detecção. Os espectros foram adquiridos no modo MS/MS utilizando o programa FlexControl (v3.4 Bruker Daltonics, Inc.), software que realiza o gerenciamento operacional da ferramenta de MALDI-TOF MS.

Na primeira tentativa, o processo foi seguido tal qual é utilizado para detecção dos peptídeos marcadores em LC-MS/MS. Foi observado uma grande quantidade de ruído nos espectros, geralmente causado por sais e outros interferentes (DAVE *et al.*, 2011). Então foi decidido realizar uma etapa de limpeza e dessalinização do extrato proteico e do produto da digestão por tripsina.

A primeira abordagem utilizada foi com ponteiras do tipo *ZipTip*, preparadas *in house*. Ponteiras de 200 µl foram preparadas utilizando lã de vidro e uma suspensão densa de C18 (sílica usualmente utilizada em colunas cromatográficas) em isopropanol. Após a ativação (aspirar 100 µl de metanol duas vezes) e a estabilização (aspirar 100 µl de ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% duas vezes) da ponteira, a amostra foi aspirada, lavada duas vezes com TFA 0,5% e eluída em 100 µl de acetonitrila (ACN) com 0,5% de TFA. Após a eluição, esta amostra foi concentrada em estufa a 55°C até 5-10 µl e pipetada em duplicada (2 µl) em uma placa para MALDI-TOF MS/MS adequada para análise de peptídeos (*MALDI AnchorChip Standard Target Plate*) (DAVE *et al.*, 2011; GEKENEDIS *et al.*, 2014). Foram realizadas 3 tentativas desta abordagem.

A segunda abordagem utilizada foi um protocolo de dessalinização e concentração de amostra realizado diretamente na *MALDI AnchorChip Standard Target Plate (on-plate)*. Após todo processo de extração/digestão realizado para a análise em LC-MS/MS, 2 µl do sobrenadante contendo os peptídeos foi pipetado em duplicata nos *spots* e deixado secar a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 1,5 µl do tampão de matriz (*matrix buffer* – anexo 1) sobre a

amostra, e novamente foi deixado secar a temperatura ambiente. Então foi adicionado 2 µl do tampão de bifosfato de amônio (*APT buffer* – anexo 1) gelado. Após 1 minuto, a gota de *APT buffer* foi aspirado do *spot* com uma micropipeta e a operação com o *APT buffer* foi repetida. Após a retirada da gota de *APT buffer*, foi pipetado 1 µl do tampão de recristalização (*recrystallization buffer* – anexo 1) e, após secar, as amostras foram submetidas à análise em MALDI-TOF MS/MS (DAVE *et al.*, 2011).

Ambas abordagens foram bem-sucedidas no intuito de eliminar o ruído causado pelos interferentes nos espectros, mas não foi possível detectar nenhum dos peptídeos anteriormente detectados em LC-MS/MS em MALDI-TOF MS/MS. Provavelmente falta sensibilidade ao MALDI-TOF MS/MS para detectar estes peptídeos devido a sua baixa concentração em comparação aos demais componentes proteicos/peptídicos na amostra.

Após alguns e-mails trocados com o grupo de pesquisa do *National Institutes of Health*, de Bethesda, Maryland/USA, grupo este responsável pelas publicações de Lau *et al.*, 2014 (*A Rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Method for Single-Plasmid Tracking in na Outbreak of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*) e de Wang *et al.*, 2017 (*Peptide Markers for Rapid Detection of KPC Carbapenemase by LC-MS/MS*) obtive o retorno de que eles haviam chegado as mesmas conclusões que nós: falta sensibilidade ao MALDI-TOF MS/MS para detectar estes peptídeos devido a sua baixa concentração em comparação aos demais componentes proteicos/peptídicos da amostra.



### 5.3 Detecção de um pico marcador da molécula de KPC intacta

Em uma primeira abordagem, foram realizadas tentativas de detecção de um pico marcador da molécula intacta de KPC-2 em 8 isolados KPC-positivos utilizando a técnica convencional de lise proteica para MALDI-TOF MS (AF + ACN) (DREVINEK, 2012), ajustando a faixa de aquisição do espectro entre 25 e 35 Kd. Oito isolados KPC-negativos foram utilizados como controle negativo. Nenhum dos isolados KPC-positivos demonstrou o pico marcador na faixa de massa esperada (31,115d) (UNIPROTKB, 2018).

Em abril de 2018, no ECCMID, foi apresentado um pôster demonstrando a detecção direta da molécula intacta de CTX-M (28,265d) e KPC-2 (28,487d) em MALDI-TOF MS, sem detalhamento de metodologia sob alegação de encaminhamento para patente. Até o presente momento não houve nenhuma publicação além desse pôster, a respeito dessa abordagem (FIGUEROA, R., *et al*, 2018).

A partir disso, foram realizadas diversas outras tentativas de detecção de picos marcadores de KPC na faixa de 25-35 Kd, utilizando estratégias de extração enzimática e/ou lise proteica, além dos mais variados *tunnings* do equipamento.

A estratégia de extração enzimática utilizada foi adaptada a partir de um protocolo para extração e análise de ESBLs (PATERSON *et al.*, 2001). Foi realizado o repique dos isolados previamente caracterizados em ágar mueller-hinton contendo 1 µg/ml de meropenem, e adicionado um disco contendo 10 µg de meropenem. Após incubação *overnight*, uma alça bacteriológica de 1 µl foi inoculada em um tubo falcon contendo 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) contendo 1 µg/ml de meropenem e incubado *overnight* a 37°C em *shaker* a uma velocidade de 250 rpm. Após o período de incubação, os tubos falcons foram centrifugados a 7.000 rpm/15 minutos. Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em TrisHCl 50mM (pH 7,4) e transferido para um *eppendorf*. Então, 2 µl de uma solução 40 mg/ml recém-preparada de lisozima foi adicionada ao *eppendorf*, homogeneizando-o gentilmente por 30 minutos. Após, foi adicionado 10 µl de EDTA 0,5M (pH 8,5), homogeneizando gentilmente por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, centrifugou-se os *eppendorfs* por 6 minutos a 14.000 rpm. As β-lactamases concentram-se no sobrenadante.

As abordagens utilizadas para lise proteica foram baseadas em estudos anteriores (WU, C. C & MACCROSS, 2002; DREVINEK, *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014; KEIBLINGER *et al.*, 2016). As extrações utilizadas foram: clorofórmio + metanol, ácido fórmico + acetonitrila, acetato/fosfato/sulfato de amônio, metanol + acetona, ácido tricloroacético + acetonitrila. Além dessas extrações em diferentes proporções e concentrações, foram realizadas tentativas de concentração do sobrenadante por evaporação.

As variações no *tunning* do equipamento foram realizadas arbitrariamente, ajustando a intensidade do *laser* e o número de disparos.

Nenhuma das abordagens realizadas permitiu a detecção de um pico marcador da molécula intacta de KPC.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Como conclusões gerais deste trabalho podemos destacar:

1. Os métodos hifenados, como LC-MS/MS, compõe uma importante ferramenta no estudo da resistência antimicrobiana e apresentam elevada sensibilidade e especificidade;
2. A estratégia de digestão tríptica de um extrato proteico seguida de análise por métodos hifenados possui um enorme potencial e deve ser amplamente explorada no estudo e detecção de determinantes da resistência e virulência microbiana;
3. A estratégia de utilizar os espectros adquiridos em MALDI-TOF utilizando o software *MALDI Biotyper* com subsequente avaliação com os softwares *ClinProTools* e *FlexAnalysis* na busca de marcadores de KPC não foi capaz de encontrar picos diferenciais específicos. Para o sucesso de experimentos de detecção direta de marcadores em MALDI-TOF MS se faz necessário a ampliação dos estudos de clonalidade;
4. O LC-MS/MS, após digestão tríptica, foi capaz de detectar os peptídeos APIVLAVYTR, GFLAAAVLAR, LTLGSALAAPQR e LALEGLGVNGQ, marcadores específicos de KPC, com sensibilidade de 96,07% e 100% de especificidade;
5. Quanto as limitações, é importante salientar que os métodos hifenados possuem custo elevado, estão restritos a poucos laboratórios e são de difícil operação e manutenção;

## 7 PERSPECTIVAS

Com relação a detecção de carbapenemases em LC-MS/MS, pretendemos repetir a abordagem genoproteômica realizada por Wang *et al.* para NDM-1 e OXA-48<sub>like</sub> e posteriormente padronizar e validar um método de detecção para estas enzimas.

Outra possível abordagem seria utilizar nosso método para detecção de KPC diretamente de hemoculturas positivas e, posteriormente, de material biológico.

Apesar da metodologia de LC-MS/MS ainda ser restrita a poucos laboratórios, é possível observar um crescente interesse por essa tecnologia nas mais variadas áreas das análises clínicas, sendo possível que, à médio prazo esta tecnologia se torne uma realidade na rotina laboratorial.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAOGEN. *Achaogen announces positive results in phase 3 cUTI and CRE clinical trials of plazomicin*. São Francisco/Califórnia, 2016. Disponível em: <<http://investors.achaogen.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=1003671>>.

Acesso em: 10/11/2018.

ADEOLU, M. *et al.* 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., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66:5575-5599, 01/12/2016 doi: 10.1099/ijsem.0.001485.

ADLER, A. *et al.* Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in post-acute-care hospitals in Israel, 2008–13. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 70:89–92, 2015.

AIRES, C. A. M. *et al.* Emergence of plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017.

AKOVA, M. *et al.* Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:439-48, 2012.

ALEXANDER, B. T. *et al.* Treatment and clinical outcomes of urinary tract infections caused by KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a retrospective cohort. *Clinical Therapy*, 34(6):1314–23, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.05.002>

AMBLER, R. P. *et al.* A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochemical Journal*, 276:269–70, 1991.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289:321–31, 1980.

ANTOCHEVIS, L. C. *et al.* KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from Brazilian hospitals: What (still) remains active? *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15:173-177, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.07.011>

ANVISA. *Nota Técnica N. 1/2013: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 17/04/2013.

BADAL, R. *et al.* Geographic distribution of carbapenemases found in *Enterobacteriaceae* — SMART 2012 [abstract C-799]. In: 54TH

INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Washington, DC, 5 - 9/09/2014.

BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4:15, 2013.

BAUERNFEIND, A.; CHONG, Y.; SCHWEIGHART, S. Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17:316–321, 1989.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18:294–298, 1990.

BEN-DAVID, D. *et al.* Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:54–60, 2012.

BERGEN, P. J. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of “old” polymyxins: what is new? *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 74(3):213–23, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.010>

BERGEN, P. J. *et al.* Optimizing polymyxin combinations against resistant Gram-negative bacteria. *Infectious Diseases Therapy*, 4(4):391–415, 2015.

BIOMERIEUX. <https://www.biomerieux-nordic.com/product/chromid-carba-smart> Acesso em: 07/01/2019.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Review*, 14:933–51, 2001.

BRATU, S. *et al.* Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:3018-20, 2005.

BRENNER D. J. & FARMER III J. J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: BRENNER D. J., KRIEG N. R., STALEY J. T., GARRITY G. M., BOONE D. R., VOS P., GOODFELLOW M., RAINEY F. A., SCHLEIFER K.-H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. vol. 2. New York, NY: Springer, 2005. p. 587–607

BRIZENDINE, K. D. *et al.* Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection following solid organ transplantation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:553–7, 2015.

BULIK, C. C.; NICOLAU, D. P. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6):3002–4, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.01420-10>

BURCKHARDT, I.; ZIMMERMANN, S., Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance

within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:3321–3324, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00287-11>>.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3):969-976, 2010. doi:10.1128/AAC.01009-09.

BUSH, K. Top 10 Beta-lactamase Papers for 2015. In: *ASM Microbe 2016*. Boston, MA, 18 June 2016.

CAMPOS, A. C. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: a systematic review. *American Journal of Infection Control*, 44(11):1374–80, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.022>

CANTÓN, R. *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:413–31, 2012.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:2227–38, 2009.

CARMELI, Y. *et al.* Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 102–111, 2010.

CARMELI, Y. *et al.* Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a randomized, pathogen-directed, phase 3 study. *Lancet Infectious Diseases*, 16(6):661–73, 2016. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30004-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30004-4)

CARRER, A. *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:1369–73, 2010.

CARRICAJO, A. *et al.* Detection of carbapenemase-producing bacteria by using an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2):1231–1234, 2014.

CARVALHAES, C. G. *et al.* Detection of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Class D  $\beta$ -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1):287-290, 2012. DOI:10.1128/JCM.02365-12

CARVALHAES, C. G. *et al.* Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69: 2132–2136, 2014.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY

Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:1668–9, 2012; author reply 1670–1.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase and metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:570-3, 2008.

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*, 55:1274-8, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. CDC, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Tracking CRE*. CDC. 2018; <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/trackingcre.html> Acesso em: 03/01/2019.

CHANG, C. J. *et al.* Diagnosis of beta-lactam resistance in *Acinetobacter baumannii* using shotgun proteomics and LC-nanoelectrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85, 2802–2808, 2013. doi:10.1021/ac303326a

CHARRETIER, Y. *et al.* Method of detecting at least one mechanism of resistance to carbapenems by mass spectrometry. Patent US 20150031063. 20/04/2012, 24/01/2017.

CHARRETIER, Y. *et al.* Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Scientific Reports*, 5:13944, 2015. doi:10.1038/srep13944

CHARRETIER, Y. & SCHRENZEL, J. Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance. *Proteomics Clinical Applications*, 10:964–981, 2016. doi:10.1002/prca.201600041

CHEN, L. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*, 22:686–96, 2014.

CHONG, Y., ITO, Y., KAMIMURA, T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11:1499-504, 2011.

CLAYDON, M. A. *et al.* The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 14:1584–1586, 1996.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *AST News Update*, 2(1), Junho, 2017.



CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S26*, Wayne, PA. 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S28*, Wayne, PA. 2018.

CORNAGLIA, G. *et al.* ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29:380-388, 2007.

CPREK, J. B.; GALLAGHER, J. C. Ertapenem-containing double-carbapenem therapy for treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(1):669–73, 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.01569-15>

CRUM-CIANFLONE, N. F.; SULLIVAN, E.; BALLON-LANDA, G. Fecal microbiota transplantation and successful resolution of multidrug-resistant organism colonization. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(6):1986–9, 2015. <https://doi.org/10.1128/JCM.00820-15>

DAIKOS, G. L. *et al.* Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5):1868-73, 2009.

DAIKOS, G. L. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4):2322-8, 2014.

DALMOLIN, T. V. *et al.* Co-occurrence of *mcr-1* and *bla<sub>KPC-2</sub>* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature (London)*, 208:239–241, 1965.

DATTA, S. *et al.* A comparative study of Modified Hodge Test and Carba NP test for detecting carbapenemase production in Gram-negative bacteria. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil Vidyapeeth*, 10:365-9, 2017.

DAVE, K. A. *et al.* Preparation and Analysis of Proteins and Peptides Using MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry. *Current Protocols in Protein Science*, 63:16.13.1-16.13.21, 2011. doi:10.1002/0471140864.ps1613s63

DAWSON, P.H. *et al.* The Use of Triple Quadrupoles for Sequential Mass Spectrometry: The Instrument Parameters. *Organic Mass Spectrometry*, 17:205-211, 1982.

DAWSON, P.H. *et al.* The Use of Triple Quadrupoles for Sequential Mass Spectrometry: A Detailed Case Study. *Organic Mass Spectrometry*, 17:212-219, 1982b.

DESHPANDE, L.M. *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). *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 56(4):367–72, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.004>

DE KRAKER, M. E. A., DAVEY, P. G., GRUNDMANN, H. on behalf of the BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLOS Medicine*, 8: e1001104, 2011.

DE PASCALE, G. *et al.* Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case–control study. *Critical Care*, 21(1):173, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1769-z>

DE VRIES, J. J. *et al.* Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27:1153-8, 2006.

DORTET, L. *et al.* Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. *Journal of Medical Microbiology*, 63:772-6, 2014.

DORTET, L. *et al.* Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71:1834–40, 2016.

DORTET, L., POIREL, L., NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:6437–40, 2012.

DREVINEK, M.; DRESLER, J.; KLIMENTOVA, J.; PISA, L.; HUBALEK, M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 55:40–46, 2012.

DU, Z. *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74:5487–5491, 2002.  
<http://dx.doi.org/10.1021/ac020109k>

DUARTE, A. *et al.* Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:1481-2, 2003.

EDWARDS-JONES, V. *et al.* Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*, 49:295–300, 2000.

- EE, R. *et al.* *Chania multitudinisentens* gen. nov., sp. nov., an N-acyl-homoserine-lactone-producing bacterium in the family *Enterobacteriaceae* isolated from landfill site soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66:2297–2304, 2016.
- EHMANN, D. E. *et al.* Avibactam is a covalent, reversible, non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29):11663–8, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205073109>
- ELLINGTON, M. J. *et al.* Mutators among CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and risk for the emergence of fosfomycin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(4):848–52, 2006. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl315>
- ENDIMIANI, A., CHOUDHARY, Y., BONOMO, R. A. In vitro activity of NXL104 in combination with beta-lactams against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing KPC carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8):3599–601, 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.00641-09>
- ENDIMIANI, A. *et al.* ACHN-490, a neoglycoside with potent in vitro activity against multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:4504–7, 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.00641-09>
- ESCOBAR PÉREZ, J. A. *et al.* Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57:1957-60, 2013.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (EARS-NET). [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/table\\_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/table_reports.aspx). Acesso em: 12/04/2016.
- EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). Website with MIC distributions. <http://mic.eucast.org/>. Acesso em: 24/11/2018.
- FEDERICO, M.P.; FURTADO, G.H. Immediate and later impacts of antimicrobial consumption carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella spp.* in a teaching hospital in Brazil: a 10-year trend study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37:2153, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3352-1>
- FIGUEROA, R., *et al.* Direct detection of CTX-M-2 and KPC-2 in *Serratia marcescens* using MALDI-TOF. ECCMID 2018 – *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Madrid, Espanha. Sessão: MALDI-TOF MS: a multi-purpose tool, Abstract P2253, apresentado em: 24/04/2018.
- FLEURBAAIJ, F. *et al.* Capillary-electrophoresis mass spectrometry for the detection of carbapenemases in (multi-) drug-resistant Gram-negative bacteria. *Analytical Chemistry*, 86, 9154–9161, 2014. doi:10.1021/ac502049p

FORSYTHE, S., ABBOTT, S., PITOUT, J. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., Richter, S., Warnock D editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Eleventh edition. ASM Press, Washington, 2015. p. 714-37.

FREIRE, A. T. *et al.* Comparison of tigecycline with imipenem/cilastatin for the treatment of hospital-acquired pneumonia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(2):140–51, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.012>

GAIBANI, P. *et al.* Evaluation of Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54:2609 –2613, 2016.  
 doi:10.1128/JCM.01242-16.

GALLAGHER, J. C. *et al.* Case-case control study of patients with carbapenem-resistant and third generation cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10):5732–5, 2014. <https://doi.org/10.1128/AAC.03564-14>

GAILLOT, O.; CLEMENT, C.; SIMONET, M.; PHILIPPON, A. Novel transferable  $\beta$ -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39:85–87, 1997.

GHEBREMEDHIN, B. *et al.* MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15:5, 2016. doi:10.1186/s12941-016-0120-x

GIAKKOUPIS, P. *et al.* An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:1510–3, 2011.

GEKENEDIS, M. T. *et al.* Beyond the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Biotyping Workflow: in Search of Microorganism-Specific Tryptic Peptides Enabling Discrimination of Subspecies. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(14):4234-4241, Junho, 2014. DOI: 10.1128/AEM.00740-14

GIRLICH, D. *et al.* Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 77, Issue 4, p. 296-300, 2013. ISSN 0732-8893. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.015>

GISKE, C. G. *et al.* A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:552-6, 2011.

GLASNER, C. *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveillance*, 18:20525, 2013.

GLUPCZYNSKI, Y. *et al.* Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71:1217–22, 2016.

GONZALEZ LEIZA, M.; PEREZ-DIAZ J. C.; AYALA, J.; CASELLAS, J. M.; MARTINEZ-BELTRAN, J.; BUSH, K.; BAQUERO, F. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase with two molecular variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38:2150–2157, 1994.

GROSS, J. H. *Mass Spectrometry. A Textbook*. 1st ed. 2004. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. v. 4 p. 152

GUPTA, R. S. *Identification of conserved indels that are useful for classification and evolutionary studies*. In: *Methods in Microbiology*, 2014. Oxford, UK: Academic Press. v. 41 p. 153–182

GUPTA, R. S. Impact of genomics on the understanding of microbial evolution and classification: the importance of Darwin's views on classification. *FEMS Microbiology Reviews* 40:520–553, 2016.

GLUPCZYNSKI, Y. *et al.* Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, Issue 7, p1955–1960, 01/07/2017. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx089>

HATA, H. *et al.* Phylogenetics of family *Enterobacteriaceae* and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 60:303–311, 2016.

HAYDEN, M. K. *et al.* Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in long-term acute-care hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, 60(8):1154–61, 2015. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu1173>

HEYMANN, D.L. *et al.* Global health security: the wider lessons from the west African Ebola virus disease epidemic. *Lancet*, 385:1884–901, 2015.

HIDRON, A. I. *et al.* National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare associated-infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29:996-1011, 2008.

HOKE, S. H. I. *et al.* Transformations in Pharmaceutical Research and Development, Driven by Innovations in Multidimensional Mass Spectrometry-Based Technologies. *International Journal of Mass Spectrometry*, 12:135-196, 2001.

HRABÁK, J.; CHUDÁCKOVÁ, E.; WALKOVÁ, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDITOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1):103-114, 2013.  
doi:10.1128/CMR.00058-12

HUANG, H.; CHEN, W.; WU, J. Total Protein Extraction for Metaproteomics Analysis of Methane Producing Biofilm: The Effects of Detergents. *International Journal of Molecular Sciences*, 15:10169-10184, 2014.

HUNT, D. F.; SHABANOWITZ, J.; GIORDANI, A. B. Collision Activated Decompositions in Mixture Analysis with a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 52:386-390, 1980.

HUSSEIN, K. *et al.* Impact of carbapenem resistance on the outcome of patients' hospital-acquired bacteraemia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Hospital Infection*, 83:307–13, 2013.

ITO, H. *et al.* Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:824–9, 1995.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:161-82, 2009.

JEONG, S. H. *et al.* First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:4809-10, 2005.

JOHNSON, A. P. & WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 62:499–513, 2013.

KAYE, K. *et al.* Clinical outcomes of serious infections due to carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in TANGO-II (a phase 3 study of the treatment of CRE infections). Poster Presentation at ID Week San Diego, CA, 2017.

KEIBLINGER, K. M., *et al.* Soil and leaf litter metaproteomics—a brief guideline from sampling to understanding. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11)1-18, 2016.

KEYS, C. J. *et al.* Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterization of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 4: 221–242, 2004.

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

KOHIRA, N. *et al.* In vitro antimicrobial activity of a siderophore cephalosporin, S-649266, against *Enterobacteriaceae* clinical isolates, including carbapenem-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2):729–34, 2016. <https://doi.org/10.1128/AAC.01695-15>

KONDRAT, R.W. Mixture Analysis by Mass Spectrometry: Now's the Time. *International Journal of Mass Spectrometry*, 212, 89-95, 2001.

KONTOPIDOU, F. *et al.* on behalf of the Group for the Study of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in intensive care units\*. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clinical Microbiology and Infection*, 20: O117–23, 2014.

KOSTRZEWA, M. *et al.* MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms, *Proteomics Clinical Applications*, 7:767–778, 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201300042>

KULKARNI, M. V. *et al.* Use of imipenem to detect KPC, NDM, OXA, IMP, and VIM carbapenemase activity from gram-negative rods in 75 minutes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7):2500–2505, 2014.

LAHEY CLINIC. *B-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes*. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1> Acesso em: 24/11/2018

LANGE, C. *et al.* Quantitative matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection, *Journal of Clinical Microbiology*, 52:4155–4162, 2014. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01872-14>

LAPUEBLA, A. *et al.* Activity of imipenem with relebactam against gram-negative pathogens from New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8):5029–31, 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.00830-15>

LAPUEBLA, A. *et al.* Activity of meropenem combined with RPX7009, a novel beta-lactamase inhibitor, against Gram-negative clinical isolates in New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8):4856–60, 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.00843-15>

LAU, A. F. *et al.*; A Rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Method for Single-Plasmid Tracking in an Outbreak of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8):2804–2812, 2014.

LEE, C.S.; DOI, Y. Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Infection Chemotherapy*, 46(3):149-164, 2014.

<https://doi.org/10.3947/ic.2014.46.3.149>

LEITNER, E. *et al.* Contaminated handwashing sinks as the source of a clonal outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* on a hematology ward.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1):714–6, 2015.

<https://doi.org/10.1128/AAC.04306-14>

LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14:413-20, 2006.

LIVERMORE, D.M. *et al.* BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Enterobacteriaceae* from bacteraemias in UK and Ireland 2001-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:41-54, 2008.

LIVERMORE, D. M. *et al.* What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37:415-9, 2011.

LIVERMORE, D. M., WARNER, M., MUSHTAQ, S. Activity of MK-7655 combined with imipenem against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10):2286–90, 2013.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkt178>

LOGAN, L. K. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging problem in children. *Clinical Infectious Diseases*, 55:852–9, 2012.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl\_1): S28-S36, 2017.

LÜBBERT, C. *et al.* Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K pneumoniae* after a large single center outbreak in Germany. *American Journal of Infection Control*, 42(4):376–80, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.12.001>

MACVANE, S. H. *et al.* In vivo efficacy of humanized exposures of ceftazidime-avibactam in comparison with ceftazidime against contemporary

*Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

58:6913–9, 2014. <https://doi.org/10.1128/AAC.01198-10>

MAGAGNIN, C.M. *et al.* Dissemination of blaOXA-370 gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2017. DOI: 10.1007/s10096-017-3012-x

MAJCHERCZYK, P. A. *et al.* The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.



*FEMS Microbiology, Lett.* 255:233–239, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00060.x>

MAMMERI, H. *et al.* Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:71-6, 2005.

MARTIN, A. *et al.* Association Between Carbapenem Resistance and Mortality Among Adult, Hospitalized Patients with Serious Infections Due to *Enterobacteriaceae*: Results of a Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7), 01/07/2018. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy150>

MATSUMURA, Y. *et al.* Detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4):1034-40, 2014.

MATTHEW, M.; HEDGES, R. W.; SMITH, J. T. Types of  $\beta$ -lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 138:657–662, 1979.

MCLAFFERTY, F. W. Tandem MS Analysis of Complex Biological Mixtures. *International Journal of Mass Spectrometry*, 212:81-87, 2001.

MEUNIER, D. *et al.* Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71:2357–9, 2016.

MIRANDE, C. *et al.* Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34:2225–2234, 2015. doi:10.1007/s10096-015-2473-z

MIRIAGOU, V. *et al.* Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4):1297–300, 2003. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1297-1300.2003>

MIRIAGOU, V. *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection*, 16:112–122, 2010.

MITSUMA, S. F. *et al.* Promising New Assays and Technologies for the Diagnosis and Management of Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 56(7):996-1002, 2013. doi:10.1093/cid/cis1014

MOLAND, E.S. *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3):711–4, 2003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg124>

- MOLTON, J. S. *et al.* The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: A perspective from Asia. *Clinical Infectious Diseases*, 56:1310-8, 2013.
- MONACO, M. *et al.* Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill*, 19(42):20939, 2014.
- MONTEFERRANTE, C. G. *et al.* Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71:2856–2867, 2016. doi:10.1093/jac/dkw208
- MONTEIRO, J. *et al.* First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53:333-4, 2009.
- MONTEIRO, J. *et al.* Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4):906–909, 01/04/2012. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
- MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase—producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(4):341–7, 2010. <https://doi.org/10.1086/651097>
- MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(9):785-96, 2013.
- NAAS, T.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10):4423–4, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4423>
- NAAS, T.; DORTET, L.; IORGA, B. I. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17:1006–28, 2016.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome> Acesso em: 15/12/2018.
- NAUM, M.; BROWN, E. W.; MASON-GAMER, R. J. Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the *Enterobacteriaceae*? *Journal of Molecular Evolution*, 66:630–642, 2008.
- NAUSHAD, H. S.; LEE, B.; GUPTA, R. S. Conserved signature indels and signature proteins as novel tools for understanding microbial phylogeny and systematics: identification of molecular signatures that are specific for the phytopathogenic genera *Dickeya*, *Pectobacterium* and *Brenneria*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 64:366–383, 2014.
- NIKAIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67:593-656, 2003.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 9:228-36, 2009.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8:321-31, 2002.

NORDMANN, P. *et al.* Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:432-8, 2012a.

NORDMANN P.; NAAS T.; POIREL L. *Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17:10, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9):1503-1507, 2012b. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1809.120355>

NORDMANN, P. *et al.* Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:689-92, 2011b.

OCTAVIA, S.; LAN, R. *The Family Enterobacteriaceae. The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. p. 225–286, 2014.

OKAMOTO, K. *et al.* Modifiable risk factors for the spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among long-term acute-care hospital patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 38(6):670–7, 2017. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.62>

OLIVA, A. *et al.* Synergistic activity and effectiveness of a double carbapenem regimen in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(6):1718–20, 2014. <https://doi.org/10.1093/jac/dku027>

OLIVEIRA, M. S. *et al.* Treatment of KPC-producing *Enterobacteriaceae*: suboptimal efficacy of polymyxins. *Clinical Microbiology and Infection*, 21: 179.e1–7, 2015.

PAHO/WHO. Nosocomial transmission of NDM-type multiresistant bacteria. *Pan American Health Organization / World Health Organization*, 2012.

Disponível em:

[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=19623&Itemid=](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19623&Itemid=)

PARTE A. C. LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42: D613–D616, 2014.

PASTERAN, F. *et al.* Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamilies in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli with a novel

immunochromatographic lateral flow assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 54: 2832–6, 2016.

PASTERAN, F. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–2, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7):1178-1180, 2008. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1407.070826>.

PASTERAN, F. *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:1795-7, 2012.

PASTERAN, F. *et al.* Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 53:3908-11, 2015.

PATEL, G.; BONOMO, R. A. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 4:1–17, 2013.

PATEL, G. *et al.* Outcomes of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and the Impact of Antimicrobial and Adjunctive Therapies. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(12):1099-1106, 2008. doi:10.1086/592412

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, 61:100–11, 2015.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 57:564–72, 2013.

PATERSON, D. L. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection*, 6:460–3, 2000.

PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Rapid method of extraction and analysis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(12):709-711, 2001.

PARK, S. O. *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in three New York City hospitals trended downwards from 2006 to 2014. *Open Forum of Infectious Diseases*, 3(4): ofw222, 2016. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw222>.

PARTRIDGE, S. R. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:820–55, 2011.

PEIRANO, G. *et al.* Carbapenem-hydrolysis  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:265-8, 2009.

PENA, I. *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43:460-4, 2014.

- PETTY, N. K. *et al.* Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:5694–5699, 2014.
- PÉREZ-CHAPARRO, P. J. *et al.* Complete nucleotide sequences of two *bla*<sub>KPC-2</sub>-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains four years apart. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58:2958–2960, 2014. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02341-13>.
- PERKINS, M. D. *et al.* Diagnostic preparedness for infectious disease outbreaks. *Lancet*, 390: 2211–14, 2017.
- PICÃO, R. C. *et al.* Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:796-7, 2010.
- PIERCE, V. M. *et al.* Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8):2321-2333, 2017. DOI: 10.1128/JCM.00193-17
- PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 51:4281-3, 2013.
- PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Diseases*, 8:159-66, 2008.
- PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance. *American Society for Microbiology*, 2015.
- PITOUT, J. D. D. *Worldwide spread of carbapenemases: update 2015 and future prospects*. In: ICAAC/ICC, San Diego, California, 17-21/09/2015.
- POIREL, L. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:15-22, 2004.
- POIREL, L. *et al.* A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum-lactamase GES-2 in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 561-5, 2002.
- POIREL, L.; PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology*, 2:501–12, 2007.
- POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:1597–1606, 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks121>.
- POIREL, L. *et al.* Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:1181-2, 2011.

- POIREL, L. *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70:119-23, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- POLSFUSS, S. *et al.* Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 49(8):2798-803, 2011.
- PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J.C. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Current Infectious Diseases Reports*, 20:13, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0617-x>
- PRABAKER, K. *et al.* Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a multihospital study. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 33(12):1193–9, 2012. <https://doi.org/10.1086/668435>.
- QUEENAN, A. M; & BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20:440–58, 2007. doi:10.1128/CMR.00001-07
- QURESHI, Z. A. *et al.* Clinical characteristics of bacteraemia caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the era of CTX-M-type and KPC-type  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(9), 887-93, 2011.
- RAJENDRAM, D. *PhD Thesis: Dissecting the Diversity of the Genus Peptostreptococcus using Genomics and Proteomic Analyses*. University of East London. Orientadores: SHAH, H. N.; & GHARBIA, S. E., 2003.
- RAMOS, A. C. *et al.* Influence of Culture Media on Detection of Carbapenem Hydrolysis by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 54:1896–1898, 2016. doi:10.1128/JCM.00749-16
- RAMOS, P. I. *et al.* Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics* 15:54, 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-54>.
- RIBEIRO, V. B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18:231-2, 2014a.
- RIBEIRO, V. B. *et al.* Detection of blaGES-5 in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58:622-3, 2014b.
- ROBERT, J. *et al.* Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2706-2712, 2014.

ROSSI, D. T.; SINZ, M. W. (Ed.); *Marcel Dekker: Mass Spectrometry in Drug Discovery*. New York, 2002.

ROZALES, F. P. *et al.* Characteristics of *Enterobacteriaceae* Isolates Coharboring Distinct Carbapenemase Genes. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 38(9):1123-1126, 2017. doi: 10.1017/ice.2017.146.

SADER, H. S. *et al.* Tigecycline activity tested against carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* from 18 European nations: results from the SENTRY surveillance program (2010–2013). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(2):183–186, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.011>.

SAĞIROĞLU, P. *et al.* Performance of "RESIST-3 O.K.N. K-SeT" immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4):885-890, 2018.

SAMPAIO, J. L. *et al.* Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58:3566-7, 2014.

SANDS, P.; MUNDACA-SHAH, C.; DZAU, V. J. The neglected dimension of global security - a framework for countering infectious-disease crises. *New England Journal of Medicine*, 374:1281–87, 2016.

SATLIN, M. J. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* as causes of bloodstream infections in patients with hematologic malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 54:799-806, 2013.

SATLIN, M. J. *et al.* Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12):5893–9, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.00387-11>.

SCHALLEY, C. A. *Modern Mass Spectrometry*. Springer: New York, 2003.

SENG, P. *et al.* MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, 5:1733–1754, 2010.

SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. A century of systematics of the genus *Bacteroides*: From a single genus up to the 1980s to an explosion of assemblages and the dawn of MALDI-TOF-Mass Spectrometry. *The Bulletin of BISMIS*, 2: 87–106, 2011.

SHAH, H. N.; GHARBIA, S. (Ed.) E. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Paradigm Shift from Research to Front-Line Microbial Diagnostics in MALDI-TOF and LC-MS/MS: A Laboratory's Vision and Relentless Resolve to Help Develop and Implement This New Technology amidst Formidable Obstacles. MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology, 1<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons Ltd., 2017.

SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. (Ed.) *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*, Wiley, Chichester, 2010.

SIEVERT, D. M. *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 and Hospital Epidemiology*, 34:1-14, 2013.

SOLOMKIN, J. *et al.* Assessing the efficacy and safety of eravacycline vs ertapenem in complicated intra-abdominal infections in the investigating Gram negative infections treated with Eravacycline (IGNITE 1) trial. *JAMA Surgery*, 152(3):224, 2017. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.4237>.

SPARBIER, K. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against b-lactam antibiotics, *Journal of Clinical Microbiology*, 50:927–937, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05737-11>.

STOESSER, N. *et al.* Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 7(1):5917, 2017. doi:10.1038/s41598-017-06256-2

STROCKBINE, N. A. *et al.* *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: JORGENSEN, J.; PFALLER, M.; CARROLL, K.; FUNKE, G.; LANDRY, M.; RICHTER, S.; WARNOCK, D. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology*, 11<sup>a</sup> Ed. ASM Press, Washington, 2015. p. 685-705

SZABADOS, F. *et al.* Identical MALDI-TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic Sccmec-harboring and Sccmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection*, 65:400–405, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.06.010>.

TAMMA, P. D. *et al.* Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(4):1046-1055, 2017. DOI: 10.1128/JCM.02338-16

TATO, M. *et al.* Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-βlactamase in Spain: toward endemicity? *Clinical Infectious Diseases*, 45(9):1171-8, 2007.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *American Journal of Medicine*, 119: S3-10, S62-70, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:1019-25, 2010.

TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:912-35, 2011.



TONG, S. Y.; GIFFARD, P. M. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50:3418-21, 2012.

TRECARICHI, E. M. *et al.* for the HeMABIS Registry - SEIFEM Group, Italy. Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: an Italian multicenter prospective survey. *Clinical Microbiology and Infection*, 21:337–43, 2015.

TSAKRIS, A. *et al.* Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2):362-367, 2009. DOI: 10.1128/JCM.01922-08

TUMBARELLO, M. *et al.* Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase - Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 55(7):943–950, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cis588>

TUMBARELLO, M. *et al.* on behalf of ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva); Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(7):2133–2143, 2015. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv086>

TUON, F. F. *et al.* Fosfomycin susceptibility of isolates with *bla*<sub>KPC-2</sub> from Brazil. *Journal of Information Security*, 67(3):247–9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.04.017>.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20:862–72, 2014. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12697>.

UNIPROTKB. *Universal Protein Resource*. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q93LQ9> Acesso em: 05/03/2018

VADING, M. *et al.* Comparison of disk diffusion, E-test and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:668-74, 2011.

VAN DIJK, K. *et al.* A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013.

VAN DUIN, D. *et al.* Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75(2):115–20, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.009>.

VAN DUIN, D. *et al.* Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7):4035–41, 2014. <https://doi.org/10.1128/AAC.02636-14>.

VASOO, S. *et al.* Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 51:3097-101, 2013.

VINCENTI, M. Host-Guest Chemistry in the Mass Spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 30:925-939, 1995.

VRIONI, G. *et al.* Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 50:1841–6, 2012.

WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: A global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36:8-14, 2010.

WANG, H. *et al.* Peptide Markers for Rapid Detection of KPC Carbapenemase by LC-MS/MS. *Scientific reports*, 7(1):2531, 2017. doi:10.1038/s41598-017-02749-2

WANG, M. *et al.* Determining carbapenemase activity with 18O labelling and targeted mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85:11014-11019, 2013.

WAREHAM, D. H. *et al.* Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48 like carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54:471-3, 2016.

WHO (World Health Organization). *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Manual for Early Implementation*. WHO, 2015. p. 1–44. [http://www.who.int/drugresistance/en/%5Cnwww.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400\\_eng.pdf?ua=1](http://www.who.int/drugresistance/en/%5Cnwww.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400_eng.pdf?ua=1).

WIESER, A. *et al.* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics - identification of microorganisms and beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:965–974, 2012.

WILKINSON, K. M. *et al.* Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50:3102–4, 2012.

WILLIAMS, J.D.; BURINSKY, D.J. Mass Spectrometric Analysis of Complex Mixtures Then and Now: the Impact of Linking Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 212:111-133, 2001.

WOODFORD, N. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(12):4793-9, 2004.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic

resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:736–755, 2011.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.

WU, C. C.; MACCROSS, M. J. Shotgun proteomics: Tools for the analysis of complex biological systems. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 4(3):242-250, 2002.

YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4):1151-61, 2001.

YIGIT, H. *et al.* Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12):3881-9, 2003.

YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:5046-54, 2009.

YOST, R.A.; ENKE, C.G. Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. *Journal of the American Chemical Society*, 100:2274-2275, 1978.

YOST, R.A.; ENKE, C.G. Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation. *Analytical Chemistry*, 51:1251A-1262A, 1979b.

YOST, R. A. *et al.* High Efficiency Collision-Induced Dissociation in an Rf-Only Quadrupole. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 30:127-136, 1979.

YU, W. *et al.* In vitro antibacterial activity of fosfomicin combined with other antimicrobials against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 50(2):237–41, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.011>.

ZARKOTOU, O. *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:1798–803, 2011.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34:286-8, 2009.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *International Journal of Infectious Diseases*, 14:539-40, 2010.

ZAVASCKI, A. P.; KLEE, B. O.; BULITTA, J. B. Aminoglycosides against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the critically ill: the pitfalls of

aminoglycoside susceptibility. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 15(6):519–26, 2017. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1316193>.

ZHANEL, G. G. *et al.* Review of eravacycline, a novel fluorocycline antibacterial agent. *Drugs*, 76(5):567–88, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0545-8>.

## 8 ANEXOS

Anexo 1 – Composição dos reagentes utilizados no protocolo de dessalinização e concentração (*on-plate*)

### **APT buffer 10 mM**

- 1,15 mg APT;
- 1 ml de 0,1% TFA;
- Sempre preparar no dia de uso;

### **Solução saturada de HCCA**

- HCCA matriz;
- 970 µl de acetona 100%;
- 30 µl de 10 mM de APT preparado em 0,1% TFA;

Preparo:

- Adicionar uma pequena quantidade de matriz o suficiente para que se dissolva em 1 mL da solução de 97:3 acetona/APT;
- Vortex por 3 a 4 minutos e sonicar por 5 minutos;
- Se toda matriz dissolver, adicione mais matriz – é interessante que fique um pequeno depósito de matriz no fundo do eppendorf;
- A solução deve ficar turva após a sonicação;
- Centrifugue por 5 minutos a 20.000g e use o sobrenadante;
- Estável por 7 dias refrigerado, mas a cada 2 dias do preparo, deve-se vortexar, sonicar e centrifugar novamente para garantir a homogeneidade da preparação;

### **Tampão de matriz (Matrix Buffer)**

- 600 µl etanol 100%;
- 300 µl acetona 100%;
- 100 µl 0,1% TFA;
- Vortex;
- Adicionar 100 µl da solução saturada de HCCA;
- Vortex;
- Sempre preparar novo;

### **Tampão de recristalização (Recrystallization buffer)**

- 600 µl etanol 100%;
- 300 µl acetona 100%;
- 100 µl 0,1% TFA;

- Vortex;
- Sempre preparar novo;

**Tripsina**

- 1  $\mu\text{g}$  de tripsina/ $\mu\text{l}$  em 1 mM de HCl;