



ANA CAROLINA RAMOS DA SILVA

Otimização e Aplicação de Testes Rápidos para a Detecção de Carbapenemases em Bactérias Gram-Negativas

São Paulo

2019

ANA CAROLINA RAMOS DA SILVA

Otimização e Aplicação de Testes Rápidos para a Detecção de Carbapenemases em Bactérias Gram-Negativas

Orientador: Prof. Dr^a Ana Cristina Gales

Co-Orientador: Dr^a Cecília Carvalhaes

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

RAMOS, Ana Carolina

Otimização e Aplicação de Testes Rápidos para a Detecção de Carbapenemases em Bactérias Gram-Negativas

Ana Carolina Ramos da Siva - São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Optimization and Application of Rapid Tests for Carbapenemases Detection in Gram-Negative Bacteria

Key-words: 1. Gram-negativo; 2. carbapenemases; 3. carbapenêmicos; 4. K-SeT; 5. MALDI-TOF MS; 6. KPC; 7. EasyQ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Álvaro Pacheco e Silva Filho

Coordenador do curso de Pós-graduação:

Prof^a. Dr^a. Dulce Elena Casarini

São Paulo

2019

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Demanda Social (DS-CAPES).

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King Jr.

Agradeço à Deus, meu Paizinho querido que na sua infinita graça, amor e sabedoria nos abençoa todos os dias com sua vontade que é infinitamente boa, perfeita e agradável.

*Aos meus pais **Donísete Ramos** e **María Efigênia** que não mediram esforços para sorrir, batalhar, apoiar e chorar ao meu lado. Obrigada por me ensinar verdadeiros e preciosos valores. Vocês são os meus influenciadores de vida.*

Amo muito vocês!

*Ao meu irmão **Thiago Ramos** que foi e sempre será o meu exemplo de dedicação e carinho. À **Nathália Fabri** pelos grandiosos gestos de carinho em nossa família.*

*Ao vovô **Jesus Bento** (in memoriam) e vovó **María** que mesmo sem entender, já sabiam de tudo.*

*Ao vovô **Francisco** (in memoriam), vovó **Iraci** e tia **Severina** pelo carinho e amor. Obrigada pelos ensinamentos de persistência e educação transmitidos ao meu pai que guardarei sempre em meu coração.*

*Aos meus tios **Neusa** e **Paulo** e primos **Hugo** e **Michael** pela alegria, amor e parceria.*

*Agradeço de todo o meu coração pela referência de pesquisadora, mulher, professora e humana que tive o privilégio de conviver e compartilhar tantos momentos de aprendizado, desafios, alegrias e tristezas. Agradeço por acreditar que a “Carolsinha” poderia crescer. Agradeço porque mesmo com tantos compromissos, reuniões, pacientes, alunos, conferências etc., sempre se esforçou ao máximo para extrair o melhor em nossa vida profissional e pessoal. Não tenho palavras suficientes para agradecer à Professora **Ana Cristina Gales** por permitir e ser um canal de caminhos extraordinários em minha vida.*

À minha querida amiga e co-orientadora Cecília Carvalhaes. Agradeço a Deus pela honra de trabalhar em tantos projetos ao seu lado. Obrigada por investir tanto tempo e enxergar algo em mim que nunca pensei ou sonhei que fosse capaz. Obrigada pelo seu enorme coração e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Antonio Carlos Pignatari** pelo exemplo de persistência e zelo pelo grupo LEMC/ALERTA. Obrigada por cada aconselhamento, apoio e carinho durante tantos anos.

Aos meus queridos amigos e pesquisadores **Willames Brasileiro** e **Dandara Cassu-Corsi**. Agradeço a parceria, ensinamentos e cada experiência compartilhada. Obrigada por sempre me ouvir e contribuir significativamente para dias leves e divertidos. Agradeço a Deus pela vida de vocês na minha vida. Obrigada por cada gesto de carinho durante tantos anos.

Ao **Rodrigo Cayô** por investir tantos anos na supervisão do laboratório ALERTA. Obrigada por todas as conversas, orientações, risadas e “sons reproduzidos (rs)” durante nossos dias no laboratório.

À **Lorena Fehlberg** pela amizade e preciosos ensinamentos. Agradeço também à **Adriana Nicoletti** e **Raquel Girardello** pela disponibilidade em sempre ajudar e compartilhar cada experiência acadêmica. À **Fernanda Inoe** e ao Dr. **André Doi** pelo acolhimento e confiança.

À **Ana Clara Narciso** pela amizade, companheirismo e carinho. À **Ana Paula Streling** pela parceria, carinho e momentos de descontração. Agradeço à **Adriana Matos, Marina Visconde, Juliana Provasi, Thais Teles, Talita Rocketti, Juliana Paulino, Larissa Akie, Gerlan da Rocha** e **André Valêncio** pelo carinho, aprendizado e histórias de vida compartilhada.

Agradeço à todos os alunos (**Aline Amaral, Amanda de Alencar, Arthur Franco, Beatriz Portugal, Bianca Trassi, Bruna Barros, Bruno Cruz, Carolina Silva, Daiane Pereira, Ezequiel André, Felipe Alberto, Francisco Osório, Gabriel Trova, Ingrid Nayara, Juliana Nicole, Larissa Araújo, Mariana Felix, Mariana Kurlhara, Mariane dos Santos, Michael Lenzi, Milena Fajani, Paulo Passos, Rafael Affini, Ramon Giovanni, Renata Akemi, Ruanita Veiga**), professores (**Carlos Kiffer** e **Mauro Salles**) e ex-alunos do grupo LEMC/ALERTA pela paciência e companheirismo durante estes 8 anos. Juntos somos mais fortes!

À **Lilian Oliveira** pela amizade e por aceitar cada desafio científico com alegria e dedicação.

À professora **Maria Juliano** pelo apoio em nossas pesquisas com o MALDI TOF MS.

Aos **alunos externos** e **visitantes** do grupo LEMC/ALERTA por permitir a nossa colaboração em seus estudos e então contribuirmos juntos para o crescimento da pesquisa científica brasileira.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Hospital São Paulo (UNIFESP), em especial ao **Thomas Chagas, Mirella, Clarice, Karen, Viviane, Flavia, Ademir** e **Elsa** pela paciência, suporte e companheirismo diário. Obrigada por contribuir fortemente para o crescimento do nosso Banco de microrganismos.

Aos meus **amigos** e **pastores** da Comunidade Cristã El Shaddai pelas orações e palavras de amor e incentivo.

Ao **João Roberto, Rosana Capece**, e **Andrea Ramos** pela pró-atividade e disponibilidade em auxiliar na resolução de cada dúvida acadêmica. À Dra. **Dulce Elena** pela organização e acolhimento na Disciplina de Medicina Translacional da UNIFESP.

To **Dilma** and **Cammy Mackenzie** for friendship, affection and hospitality.

To **Pujitha Raja, Juan Castellanos, Charlie Metcalf, Aishwarya Saxena, Oliver Coombs, Tom Stanton** and all students for assistance, welcome and patience. Thank you very much for the support. Thank you Dr Thamarai Schneiders for welcoming me and allowing me great experiences in my research career at the University of Edinburgh.

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos disponibilizada durante os 4 anos do doutorado.

E por fim, aos **bacilos gram-negativos**, particularmente à *Klebsiella pneumoniae* por intensificar a minha curiosidade e dedicação na pesquisa do seu comportamento na resistência aos antimicrobianos.

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública. Os carbapenêmicos caracterizam uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de bactérias gram-negativas multiressistentes (MDR), entretanto a frequência de isolamento de bactérias produtoras de carbapenemases, adicionado à co-produção de outros mecanismos de resistência tem aumentado significativamente no Brasil e no mundo. A detecção rápida destes patógenos pode proporcionar um alto impacto na diminuição dos índices de mortalidade e morbidade, bem como na diminuição dos custos hospitalares. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi otimizar e avaliar testes rápidos para a detecção de carbapenemases em bactérias gram-negativas. Em nosso primeiro estudo (artigo científico 1) avaliamos a influência de diferentes meios de cultura para a detecção da capacidade hidrolítica das carbapenemases pela técnica de MALDI TOF MS. Observamos que três isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-25, OXA-26 e OXA-72 demonstraram resultados falso-negativos após crescimento no agar MacConkey, enquanto que todos os isolados avaliados após crescimento em CPS, Agar Sangue e Mueller-Hinton foram detectados em no máximo 4 horas de incubação. O nosso segundo estudo (artigo científico 2) avaliou o teste imunocromatográfico KPC K-SeT para a detecção de diferentes variantes de KPC, bem como a influência de diferentes meios de cultura. O teste demonstrou-se uma ferramenta rápida e sensível para a detecção de diferentes variantes de KPC no período máximo de 15 minutos. No entanto, o inóculo bacteriano de duas enterobactérias produtoras de KPC-6 e KPC-8 foi aumentado para possibilitar a detecção pelo KPC K-SeT. Além disso, o teste molecular EasyQ KPC foi avaliado para a detecção de *bla*_{KPC} diretamente de swabs retais no qual resultou no artigo científico 3. O teste demonstrou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 87,7%, contudo a detecção de *bla*_{KPC} foi detectada diretamente do swab retal sem a necessidade prévia de incubação. E por fim, o nosso último estudo (artigo científico 4) que avaliou a capacidade da técnica de MALDI TOF MS para detectar a resistência à ceftazidima-avibactam em isolados produtores de carbapenemases. Este estudo demonstrou uma elevada concordância com o método molecular (97%) e com o teste de sensibilidade (94%). Nossos resultados demonstraram que a maioria das metodologias avaliadas demonstraram rapidez na liberação dos resultados e altos índices de sensibilidade e especificidade. Entretanto, a dinâmica de cada laboratório clínico deve ser levada em consideração para optar pelo teste fenotípico e/ou molecular que melhor se adapte às características específicas de cada centro hospitalar.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has become one of the most important public health concerns. Carbapenems characterize one of the last therapeutic options for the treatment of multidrug resistant (MDR) gram-negative bacteria; however, the frequency of pathogens with ability of hydrolysing carbapenems, as well as co-producing other resistance mechanisms has increased significantly worldwide. Rapid diagnosis for detection of carbapenemase producers have a high impact on decreasing mortality and morbidity rates, as well as reducing hospital costs. Thus, the aim of this study was to optimize and evaluate rapid tests for detecting carbapenemases in gram-negative bacteria. Our scientific article 1 evaluated the influence of different culture media for the detection of carbapenemases hydrolytic capacity by the MALDI TOF MS technique. We observed that three isolates of *A. baumannii* producing OXA-25, OXA-26 and OXA-72 showed false negative results after growth on MacConkey agar, while all isolates evaluated after growth on CPS, Blood and Mueller-Hinton agar were detected within 4 hours of incubation. Our second study (scientific article 2) evaluated the KPC K-SeT immunochromatographic device for detecting different KPC variants, as well as the influence of distinct culture media on this assay. The test proved to be a fast and sensitive tool for detecting different KPC variants within a maximum of 15 minutes. However, the bacterial inoculum of two KPC-6 and KPC-8 producing *Enterobacteriaceae* was increased to enable detection by KPC K-SeT. In addition, the EasyQ KPC molecular test was evaluated for the detection of *bla*_{KPC} directly from rectal swabs, resulting in the third scientific manuscript. The test demonstrated 100% sensitivity and 87.7% specificity and the *bla*_{KPC} detection was performed directly from the rectal swab without prior incubation. Finally, our last study (scientific article 4) evaluated the ability of the MALDI TOF MS to detect ceftazidime-avibactam (CAZ/AVI) hydrolysis among carbapenemase producing isolates. This study demonstrated high agreement with the molecular method (97%) and the sensitivity test (94%). Our results demonstrated that most of the evaluated methodologies demonstrated fast turn around time and high sensitivity and specificity rates. However, the workflow of each clinical laboratory should be evaluated to determine the phenotypic and/or molecular test that best suits the specific characteristics of each medical center.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Classificação molecular e funcional das β -lactamases	13
FIGURA 2. Figura esquemática da análise de moléculas pela técnica de espectrometria de massa MALDI TOF	19
FIGURA 3. Fluxograma para realização e leitura do teste imunocromatográfico K-SeT	20
FIGURA 4. Resultados representativos do teste Blue-Carba obtidos de produtores de carbapenemases (A, B e C) e produtores de não carbapenemases (D) após 2 horas de incubação	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espectro de atividade da combinação de agentes inibidores de β -lactamases com β -lactâmicos.....	11
TABELA 2. Interpretação dos principais testes fenotípicos por disco-difusão com inibidores de β -lactamases.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BKC** - *Brazilian Klebsiella carbapenemase*
- BrCAST** – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- CAZ/AVI** – Ceftazidima/avibactam
- CC** – Complexo Clonal
- CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CHDL** - *Carbapenem-Hydrolysing Class D β -lactamases*
- CRE** - *Carbapenem-resistant Enterobacteriales*
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ECOFF** - *Epidemiologic cutoff values*
- ES β LS** - β -lactamases de Espectro Estendido
- IMP** – Imipenemase
- KPC** - *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
- MALDI TOF MS** - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*
- MDR** – *Multidrug Resistant*
- M β L** - Metalo- β -lactamase
- NASBA** - *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*
- NDM** - *New Delhi metalo- β -lactamase*
- OXA**- Oxacilinase
- ST** – *Sequence Type*
- SPM** - São Paulo metalo- β -lactamase
- WHO** – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Antimicrobianos β -lactâmicos	9
2.2. Resistência aos Carbapenêmicos.....	11
2.3. Produção de β -lactamases.....	12
2.4. Metodologias para a detecção de carbapenemases.....	17
2.4.1. Espectrometria de massa MALDI TOF.....	17
2.4.2. Testes imunocromatográficos	19
2.4.3. Método de Inativação do Carbapenêmico.....	21
2.4.4. Teste do disco combinado.....	22
2.4.5. Testes bioquímicos colorimétricos	23
2.4.6. Métodos moleculares para a detecção de genes codificadores de carbapenemases	24
3. OBJETIVOS	26
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	27
4.1. Artigo Científico 1	28
4.2. Artigo Científico 2	37
4.3. Artigo Científico 3	46
4.4. Artigo Científico 4	54
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXO.....	88

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as bactérias gram-negativas resistentes a múltiplos fármacos (MDR), incluindo as enterobactérias resistentes às cefalosporinas de terceira geração, enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE), *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são patógenos considerados alvos prioritários para pesquisas e desenvolvimento de novos antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018). A resistência aos antimicrobianos tem se tornado um dos problemas de saúde pública mais urgentes do mundo, principalmente pela rápida disseminação de clones multirresistentes (WHO, 2014). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimou que pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias multirresistentes nos Estados Unidos, ocasionando a morte de no mínimo 23.000 pessoas por ano (CDC, 2013). As opções terapêuticas para o tratamento de pacientes infectados por bactérias gram-negativas MDR são limitadas, principalmente devido à produção de carbapenemases capazes de hidrolisar a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, bem como a coexistência de mecanismos adicionais que podem conferir resistência a outras classes de antimicrobianos (van Duin *et al.*, 2013).

O desenvolvimento e aprimoramento de novas medidas de controle de infecção e testes rápidos para a triagem, bem como a aprovação de novos antimicrobianos, são ações urgentes a serem implantadas no Brasil e no mundo para a contenção da disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases, e diminuição dos índices de mortalidade em pacientes hospitalizados. O diagnóstico precoce de pacientes infectados por bactérias produtoras de carbapenemases pode proporcionar um significativo impacto, permitindo a administração rápida do antimicrobiano efetivo, prevenindo complicações, e diminuindo custos hospitalares pela diminuição do tempo de internação (Otter *et al.*, 2017). Recentemente, um estudo brasileiro observou que a rápida identificação bacteriana e detecção de genes de resistência diretamente de hemoculturas possibilitou a intervenção, incluindo escalonamento e descalonamento antimicrobiano em 26,2% dos episódios de infecção avaliados no estudo (Quiles *et al.*, 2019). Segundo as orientações do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST, 2017), uma vez detectada a sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos em enterobactérias nos laboratórios de rotina, a confirmação da produção de carbapenemases deve ser realizada por métodos fenotípicos, ou quando necessário, por métodos

moleculares. Contudo, a detecção de carbapenemases em isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* é geralmente recomendada por testes genotípicos, uma vez que os testes fenotípicos demonstrem limitações para a detecção de OXA carbapenemases. Os testes moleculares são considerados padrão ouro para a detecção de genes codificadores de carbapenemases, entretanto apresenta fatores limitantes, como o restrito número de genes alvos, variantes dos genes de resistência pesquisados, avaliação da expressão enzimática e alto custo. Embora os testes rápidos para a detecção de carbapenemases possam auxiliar na terapia clínica, uma vez que a hidrólise a um determinado carbapenêmico pode ser detectada previamente ao resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, a detecção dos mecanismos de resistência são importantes para o controle de infecção e saúde pública, sem a necessidade da categorização do perfil de sensibilidade (BrCast, 2017). A diversidade de enzimas carbapenemases e a combinação de diferentes mecanismos de resistência podem dificultar a detecção da produção de carbapenemases. Sendo assim, diversos testes fenotípicos foram desenvolvidos, objetivando a detecção rápida e eficaz destas enzimas, principalmente em enterobactérias. Os principais métodos fenotípicos descritos são: o teste do disco combinado (Giske *et al.*, 2011; Porres-Osante *et al.*, 2014); os testes colorimétricos, como por exemplo o Carba NP (Dortet *et al.*, 2015) e o Blue Carba (Pasteran *et al.*, 2015); o método de inativação do carbapenêmico (CIM) (van der Zwaluw *et al.*, 2015); a detecção da hidrólise do carbapenêmico pelo MALDI TOF MS (Burckhardt & Zimmermann, 2011); e o ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (Pasteran *et al.*, 2016). Apesar de recomendada anteriormente e utilizada por alguns anos nos laboratórios clínicos, a técnica de Hodge modificado, atualmente é controversa pela baixa acurácia e difícil interpretação do teste (Doumith *et al.*, 2009; Carvalhaes *et al.*, 2010). A otimização de metodologias já existentes para rápida detecção, assim como a ampliação da cobertura de detecção das enzimas é fundamental para superar o controle de disseminação desse importante fator de resistência bacteriana, uma vez que poderia auxiliar no melhor fluxo e rapidez na liberação dos resultados nos laboratórios para a detecção de carbapenemases; e consequente adequação da terapia antimicrobiana, bem como melhoria no controle da disseminação destas cepas MDR no ambiente hospitalar (Lee *et al.*, 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos que incluem além das penicilinas, as cefalosporinas, monobactâmicos e os carbapenêmicos, tem sido amplamente utilizado para o tratamento de infecções complicadas por quase 60 anos devido a sua eficácia e segurança clínica (Paterson & Bonomo, 2005; El Gamal *et al.*, 2017). Estes antimicrobianos possuem em sua estrutura o anel β -lactâmico e uma potente ação bactericida capaz de inibir a síntese da parede celular bacteriana devido a sua ligação às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e consequente inibição da transpeptidase que tem a função de formar a ligação entre as cadeias peptídicas acopladas ao peptidoglicano (Demain *et al.*, 1999; Suárez & Gudiol, 2009). Entretanto, com o passar dos anos, a resistência a estes antimicrobianos aumentou, principalmente devido à produção de β -lactamases em bacilos gram-negativos. A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos pode ocorrer através de três principais mecanismos: (i) pela produção de enzimas (β -lactamases) que são capazes de degradar os antimicrobianos; (ii) alteração das PBPs, o sítio alvo dos antimicrobianos; e (iii) alteração da permeabilidade da membrana externa pela alteração das porinas e/ou hiperexpressão dos sistemas de efluxo (Wilke *et al.*, 2005).

A combinação de β -lactâmicos com novos inibidores de β -lactamases representa uma estratégia eficaz para o tratamento de infecções causadas por bactérias MDR. Embora ainda existam limitações para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e bactérias produtoras de metalo- β -lactamases (M β LS), a combinação desses agentes tem demonstrado sucesso clínico principalmente para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC (Bush *et al.*, 2018). Na Tabela 1 podemos observar as combinações de β -lactâmicos e os mais recentes inibidores de β -lactamases desenvolvidos para o uso clínico (Bassetti *et al.*, 2018; Jean *et al.*, 2019).

No Brasil, a ceftazidima-avibactam (CAZ-AVI), foi aprovada pela ANVISA para comercialização no mercado nacional em 2018. A combinação desses agentes é indicada para adultos em tratamento de infecções intra-abdominal complicada (IIAc), trato urinário complicada, incluindo pielonefrite (ITUc) e pneumonia adquirida no hospital (PAH), incluindo casos associados à ventilação mecânica (ANVISA, 2018). O avibactam é capaz de inibir

reversivelmente as serino β -lactamase de classe A (principalmente KPC e ES β L), classe C e parcialmente as de classe D (incluindo OXA-1, OXA-10 e OXA-48-like) em enterobactérias e *P. aeruginosa*. Entretanto não apresenta atividade contra as enzimas da classe B de Ambler e *Acinetobacter* spp. produtores de OXA carbapenemases. Sader e colaboradores demonstraram elevada atividade de CAZ-AVI contra *P. aeruginosa* (96,6% de sensibilidade), incluindo isolados não sensíveis ao meropenem, à piperacilina-tazobactam ou à ceftazidima; e enterobactérias (99,9% de sensibilidade) incluindo aquelas resistentes aos carbapenêmicos, resistentes à múltiplas drogas (MDR) e com extrema resistência à drogas (XDR), provenientes de infecções de pacientes com pneumonia (Sader *et al.*, 2016). Além disso, a comparação da eficácia de meropenem contra CAZ-AVI foi avaliada por um estudo clínico de fase III no tratamento de 879 pacientes internados de 23 países. Dados do estudo demonstram índices de diferença (-4, 2%) que caracterizaram a não inferioridade para cura clínica com o tratamento com o CAZ-AVI em relação ao meropenem, principalmente em pacientes com pneumonia, incluindo pneumonia associada a ventilação causadas por *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Torres *et al.*, 2018). A resistência à CAZ-AVI tem sido reportada em isolados produtores de KPC-3, mutações em KPC-2 (Asp179Asn – aumento de ligação da ceftazidima e diminuição da ligação do avibactam), mutações em porinas, como por exemplo OmpK35 e OmpK36 em *K. pneumoniae*, e aumento da expressão de bombas de efluxo (Barnes *et al.*, 2017; Humphries *et al.*, 2017; Castanheira *et al.*, 2019; Hemarajata *et al.*, 2019).

Recentemente, a associação de novos inibidores de β -lactamases com β -lactâmicos, como por exemplo a CAZ-AVI e o meropenem/vaborbactam tem sido utilizados na prática clínica para o tratamento de pacientes infectados por bactérias gram- negativas produtoras de KPC, ES β Ls e AmpC β -lactamases (Zhanel *et al.*, 2013; Porreca *et al.*, 2018; Zhanel *et al.*, 2018). Embora a maioria dos inibidores, tais como o avibactam não sejam efetivos contra bactérias produtoras de M β Ls, antimicrobianos em fase de desenvolvimento, como: cefepimazidebactam e aztreonam-avibactam têm mostrado eficácia contra as enzimas de classe B (Jean *et al.*, 2019). Além disso, Barnes e colaboradores (2017) demonstraram que aztreonam-avibactam representa uma combinação eficaz para o tratamento de infecções por bactérias resistentes a CAZ-AVI por mutações em KPC-2.

Tabela 1. Espectro de atividade da combinação de agentes inibidores de β -lactamases com β -lactâmicos (adaptado Bassetti *et al.*, 2018; Jean *et al.*, 2019)

Agentes	Atividade contra enzimas ou isolados MDR							Indústria	Fase do estudo
	ES β L	KPC	M β L	AmpC	OXA	PSA	Ac		
Ceftazidima-avibactam	+	+		+	+	+		Pfizer	Aprovado Brasil
Aztreonam-avibactam	+	+	+	+	+	+-		Pfizer	Fase III
Ceftarolina-avibactam	+	+		+	+	+		Pfizer	Fase II
Meropenem-vaborbactam	+	+		+				Melinta	Aprovado FDA
Imipinem-relebactam	+	+		+		+		Merck	Aprovado FDA
Meropenem-nacubatom	+	+		+	+			Roche	Fase I
Cefepima-zidebactam	+	+	+	+	+	+-	+	Wockhardt	Fase I
Cefepima-VNRX-5133	+	+	+	+	+	+		VenatoRx	Fase I
Cefepima-AAI101	+	+		+	+	+	+	Allegra	Fase II

+-, atividade variável; PSA, *P. aeruginosa*; Ac, *Acinetobacter* spp.

2.2. Resistência aos Carbapenêmicos

Em geral, os carbapenêmicos possuem um melhor espectro de ação contra as enzimas β -lactamases quando comparado a outros β -lactâmicos, e tem sido a terapia de escolha principalmente para enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro ampliado (ES β L). O imipenem foi o primeiro carbapenêmico a ser desenvolvido, e então foi utilizado como modelo para os outros antimicrobianos desta classe (Nunez *et al.*, 2003). Entretanto, os carbapenêmicos podem demonstrar um espectro de ação diferenciado entre eles. O ertapenem, por exemplo não é ativo contra *P. aeruginosa* como o imipenem e o meropenem. Já o meropenem é menos potente que o imipenem e o doripenem contra *A. baumannii* (Oliver *et al.*, 2004; Papp Wallace *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que as taxas de resistência aos carbapenêmicos aumentaram em muitos países e tornaram-se um dos maiores desafios para o controle de bactérias MDR (Papp-Wallace *et al.*, 2011; El Gamal *et al.*, 2017; Bonomo *et al.*, 2017). Estudos realizados pelo programa SENTRY em 42 países entre 1997 e 2016, demonstraram um aumento de 1,5%, 1,9%, 2,8% e 5,6% na resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias nos Estados Unidos, Asia-Pacífico, Europa e America Latina, respectivamente (Castanheira *et al.*, 2019). Contudo,

índices superiores a esse foram observados em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil. Bartoletti e colaboradores demonstraram um aumento de resistência aos carbapenêmicos de 6,8% (2011) para 35,5% (2015) (Bartoletti *et al.*, 2016).

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em bactérias gram-negativas é a produção de carbapenemases que são enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos. A degradação dos carbapenêmicos por essas enzimas levam à redução ou perda da eficácia dessa classe de antimicrobianos, a qual é frequentemente utilizada no tratamento de pacientes com infecções por bactérias gram-negativas. Antimicrobianos com perfis farmacocinéticos desfavoráveis e/ou maior toxicidade passaram a ser considerados para o tratamento dessas infecções, como por exemplo as polimixinas, aminoglicosídeos, fosfomicina e tigeciclina (Porreca *et al.*, 2018). A redução da sensibilidade aos carbapenêmicos também pode ser associada com a produção de ES β L ou cefalosporinases (AmpC) associadas com a diminuição de permeabilidade da membrana externa ocasionada pela ausência ou alteração de porinas (Jacoby, 2009; Doumith *et al.*, 2009). Além disso, sistemas de bomba de efluxo capazes de ejetar o antimicrobiano para o exterior da célula bacteriana também podem ocasionar resistência aos carbapenêmicos (Padilla *et al.*, 2010).

2.3 Produção de β -lactamases

Em bacilos gram-negativos, a produção de β -lactamases é o principal e mais estudado mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. Entretanto, fatores como a quantidade de enzima produzida, a sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade com que o antibiótico penetra na célula bacteriana através das porinas, são condições que podem influenciar na resistência a esta classe terapêutica (Bush, 2010, Babic *et al.*, 2006). De acordo com a Figura 1, as β -lactamases podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com sua estrutura molecular: A) ESBLs, penicilinas e carbenicilinas; B) metalo- β -lactamases (MBLs); C) cefalosporinas; e D) oxacilinas (Ambler, 1980). Contudo, a classificação de Bush (1989) foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e as propriedades inibitórias, com a estrutura molecular da enzima (Busk K. 1989). Em 1995, uma atualização a esta classificação foi proposta, combinando características estruturais e funcionais das β -lactamases (Bush *et al.*,

1995; Bush K. 2018; figura 1). Com a finalidade de incluir novas β -lactamases a partir de 1995, essa mesma classificação foi atualizada em 2010 (Bush & Jacoby, 2010).

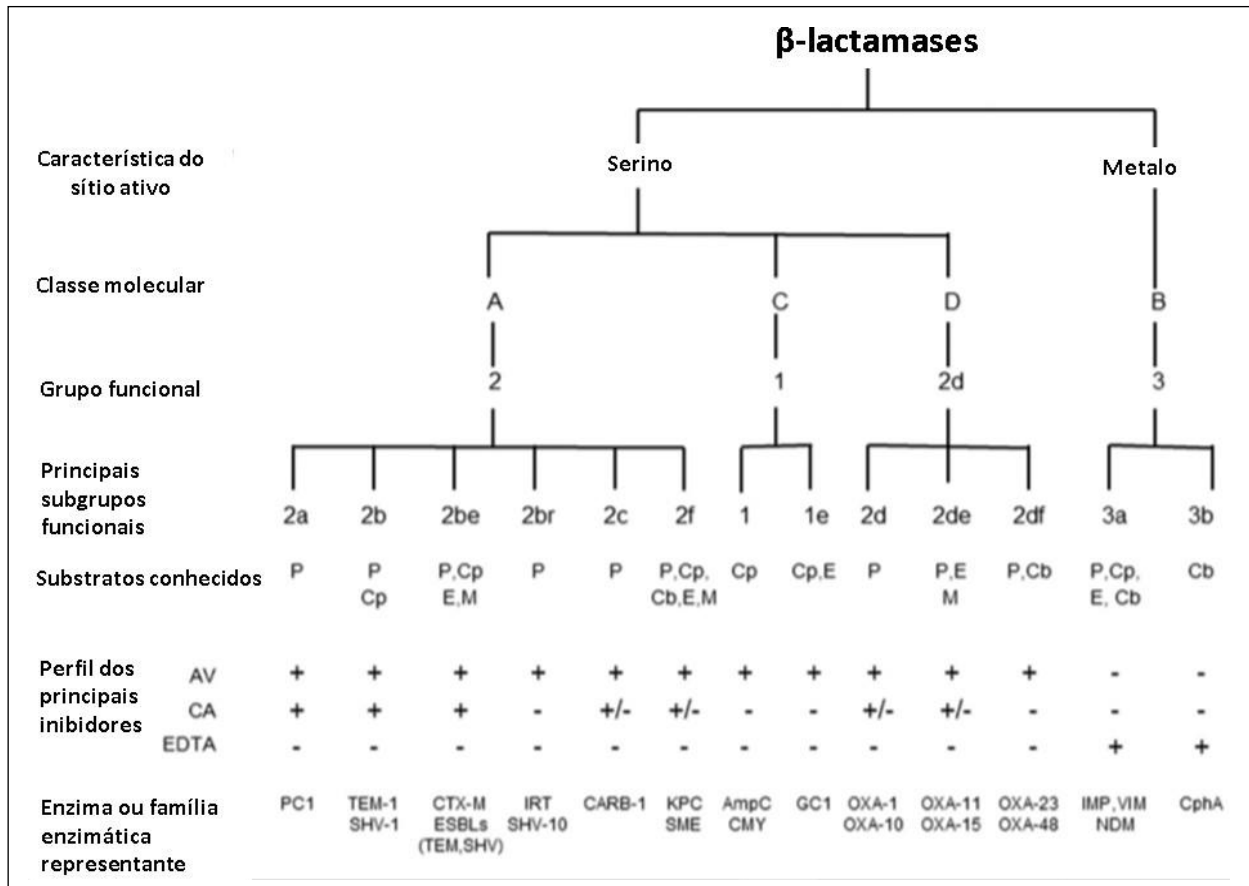


Figura 1. Classificação molecular e funcional das β -lactamases. AV, avibactam; CA, ácido clavulânico; Cb, carbapenêmico; Cp, cefalosporina; E, cefalosporina de amplo espectro; M, monobactâmico; P, penicilina (Adaptado de Bush, 2018).

A produção de carbapenemases, principalmente em enterobactérias é caracterizada como um problema de saúde mundial, particularmente pelo alto índice de morbidade e mortalidade. O aumento da disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases tem sido relacionada principalmente com elementos genéticos móveis, o qual possui a capacidade de carrear outros genes de resistência (Logan *et al.*, 2017). As carbapenemases estão distribuídas em três classes moleculares estruturais pela classificação de Ambler: A, B e D (Ambler, 1980). Carbapenemases de classe A e D são serino- β -lactamases, enquanto as de classe B são M β LS (atividade hidrolítica dependente de zinco). Além disso, as carbapenemases são capazes de hidrolisar outros β -lactâmicos além dos carbapenêmicos, como as cefalosporinas e as

penicilinas (Martínez-Martínez *et al.*, 2014). Dentre as carbapenemases de classe A, as enzimas do tipo KPC são consideradas mundialmente as de maior relevância clínica e epidemiológica, principalmente pela rápida disseminação do clone epidêmico de *K. pneumoniae* pertencente ao Complexo Clonal 258 (CC258) e mais especificamente ao *Sequence Type* (ST 258) carreando o gene *bla*_{KPC-2} localizado no transposon 4401 (Cuzon *et al.*, 2011; Munoz-Price *et al.*, 2013; Martínez-Martínez *et al.*, 2014). O ST11 e o ST437 também frequentemente têm sido detectados entre isolados brasileiros de *K. pneumoniae* (Sampaio & Gales, 2016).

A primeira descrição mundial da serino- β -lactamase KPC ocorreu em 1996 na Carolina do Norte, Estados Unidos da América em um isolado urinário de *K. pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001). Infecções por microrganismos produtores de KPC são associadas com altos índices de mortalidade (Munoz-Price *et al.*, 2014). Desde a sua primeira descrição em 2001, a disseminação de plasmídeos carreadores do gene *bla*_{KPC} têm sido observada mundialmente, principalmente em enterobactérias (Bush *et al.*, 2018), embora seja cada vez mais descrita em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Walsh, 2010; Girlich *et al.*, 2017). Até o momento, 44 variantes de KPC foram descritas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/KPC>), entretanto as variantes KPC-2 e KPC-3 são as mais prevalentes no mundo. Interessantemente, algumas variantes de KPC não possuem espectro hidrolítico contra os carbapenêmicos, como por exemplo a KPC-14 e a KPC-28 (Oueslati *et al.*, 2019). No Brasil, a KPC-2 foi inicialmente reportada em Recife no ano de 2006 em isolados de *K. pneumoniae*, e rapidamente detectada em diversos estados, como, por exemplo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e João Pessoa (Monteiro *et al.*, 2009, Peirano *et al.*, 2009, Pavez *et al.*, 2009, Zavascki *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011, Beirão *et al.*, 2011, Fehlberg *et al.*, 2012). Em um estudo realizado em 10 hospitais privados no estado de São Paulo, Bartolleti e colaboradores, 2016 observaram a produção de KPC-2 em 96,2% dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos no ano de 2015 (Bartolleti *et al.*, 2016). Até o momento, apenas bactérias gram-negativas produtores de KPC-2 foram descritas no Brasil (Sampaio & Gales, 2016).

Apesar da ampla disseminação de KPC-2 no Brasil, recentemente uma nova serino carbapenemase chamada Brazilian *Klebsiella* carbapenemase (BKC) foi reportada em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (Nicoletti *et al.*, 2015). A maioria das enzimas GES-like são consideradas ES β L, entretanto estudos observaram que as variantes GES-2, GES-4, GES-5,

GES-6, GES-14, GES-16 e GES-18 demonstraram atividade carbapenemase (Walther-Rasmussen and Høiby, 2007; Bae *et al.*, 2007; Delbruck *et al.*, 2012; Bebrone *et al.*, 2013; Streling *et al.*, 2018).

Dentre a classe B de Ambler, as MβLs mais prevalentes são a Verona imipenemase (VIM), Imipenemase (IMP) e a New Delhi metalo-β-lactamase (NDM). Entretanto em isolados de *P. aeruginosa*, a MβL São Paulo metalo-β-lactamase (SPM) é frequentemente detectada no Brasil (Martins *et al.*, 2007). Isolada de uma cepa de *K. pneumoniae*, em 2008, a partir de uma infecção no trato urinário de um paciente sueco, a enzima NDM foi reportada pela primeira vez na cidade de Nova Delhi, Índia, e desde então tem sido amplamente descrita em todo o mundo, principalmente no subcontinente indiano (Yong *et al.*, 2009). Essa carbapenemase de classe B tornou-se uma preocupação clínica mundial, principalmente pela rápida disseminação no sul da Ásia, norte da África e no Oriente Médio (Wu *et al.*, 2019). Entretanto a disseminação de *bla*_{NDM} não está relacionada com um clone predominante, mas pode ser mediada por diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial (Logan *et al.*, 2017). Estudos demonstraram a presença de NDM-like em diversos clones epidêmicos carregando outros determinantes de resistência, como por exemplo, *K. pneumoniae* ST11 e ST147, e *E. coli* ST 131 e ST 101. No Brasil, a NDM foi reportada pela primeira vez em 2013 em uma cepa de *Providência rettgeri* isolada de uma infecção de pele, no Rio Grande do Sul (Carvalho-Assef *et al.*, 2013). Recentemente, um surto de *K. pneumoniae* produtoras de NDM-1 e pertencentes ao ST 340 e ST 2570 foi descrito em hospitais brasileiros, demonstrando um aumento da disseminação de plasmídeos carregando esta MβL (Monteiro *et al.*, 2019).

Watanabe e colaboradores (1991) descreveram a carbapenemase de classe B, IMP em um isolado de *P. aeruginosa* no Japão em 1988. Entretanto, somente após sequenciamento a partir de um isolado de *Serratia marcescens* é que esta foi nomeada IMP-1 (Livermore, Woodford, 2000). Essa enzima tem a capacidade de hidrolisar todos os β-lactâmicos, exceto aztreonam e pode ser inibida pelo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Nordmann *et al.*, 2011). Em 2003, a produção dessa enzima foi detectada em um isolado de *K. pneumoniae* proveniente de uma infecção de corrente sanguínea na América Latina, mais especificamente em São Paulo (Lincopan *et al.*, 2005). A enzima VIM é um importante MβL reportada pela primeira vez em Verona, Itália em um isolado de *P. aeruginosa* (Lauretti *et al.*, 1999). Da mesma forma que a IMP, esta MβL tem a capacidade de hidrolisar todos os β-lactâmicos, exceto

aztreonam e pode ser inibida por EDTA (Walsh *et al.*, 2005; Babic *et al.*, 2006). Disseminada inicialmente em bacilos gram-negativos não fermentadores, a VIM passou a ser detectada em enterobactérias como *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella spp.* e *S. marcescens* (Bush, 2010). Outras enzimas do grupo das MβLs são as GIMs (German imipenemases) e as SIMs (Seoul imipenemases), que assim como IMP e VIM, estão localizadas em uma variedade de integrons, onde foram incorporados como genes cassetes (Queenan & Bush, 2007).

As carbapenemases da classe D, também conhecidas como OXA-carbapenemases por sua capacidade de hidrolisar fracamente os carbapenêmicos (CDHL) são frequentemente descritas em *Acinetobacter spp.* O primeiro grupo de CDHL identificado em isolados de *Acinetobacter spp.* foi a OXA-23 no Reino Unido, em 1985 (Paton *et al.*, 1993). A mobilização de sequências de inserção pelo seu cromossomo, como por exemplo a *ISAbA-1* e a *ISAbA-3* associados aos genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-51}*, e *bla_{OXA-58}*, respectivamente, é uma importante característica dos isolados de *Acinetobacter spp.* (Segal *et al.*, 2007; Corvec *et al.*, 2007; Mugnier *et al.*, 2009). Entretanto enzimas do grupo da OXA-48 são as principais representantes em *Enterobacteriales*, no qual a sua disseminação está comumente associada com a aquisição do transposon composto *Tn1999* (Poirel *et al.*, 2010). Estudos demonstraram um aumento de 4,3% (2007-2009) para 12,6% (2014-2016) da produção desse grupo de carbapenemases em enterobactérias, principalmente em países europeus (Castanheira *et al.*, 2019). Inicialmente, a OXA-48 foi isolada em *K. pneumoniae* na Turquia; porém, estudos evidenciaram a sua disseminação no território turco em isolados de *E. coli* e *C. freundii*. A maioria das cepas produtoras deste grupo enzimático não possui atividade hidrolítica significativa contra cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, no entanto, além das penicilinas, estas enzimas podem hidrolisar fracamente o imipenem e meropenem (Queenan, Bush, 2007; Poirel *et al.*, 2012). A OXA-163, apresenta fraca atividade carbapenemase, assemelhando-se a um perfil de ESβL com atividade contra ceftazidima e aztreonam (Poirel *et al.*, 2011). No Brasil, uma variante da OXA-48, a OXA-370 foi descrita inicialmente em um isolado de *E. hormaechei* em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Sampaio *et al.*, 2014), e, posteriormente, descrita em um isolado de *K. pneumoniae* no Rio de Janeiro (Pereira *et al.*, 2015). Entretanto descrições de *bla_{OXA-48-like}* no Rio Grande do Sul também foram reportados em isolados de *Escherichia coli*,

Morganella morganii, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* e *Serratia* spp. (Magagnin *et al.*, 2017).

A diversidade de genes de resistência e sua capacidade de disseminação são fatores importantes para serem contemplados pelos laboratórios clínicos e grupos de controle de infecção. A detecção e a comunicação rápida da produção de carbapenemases é sem dúvida uma medida indispensável, pois permite iniciar o tratamento antimicrobiano adequado, além de possibilitar o controle da disseminação dos genes codificadores destas enzimas através da implantação de medidas específicas de prevenção e controle.

2.4. Metodologias para a detecção de carbapenemases

Os valores do *epidemiological cut-off* (ECOFF) definidos pelo EUCAST são sugeridos para detecção de carbapenemases nos laboratórios clínicos. Quando detectada a sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos (meropenem e ertapenem com CIM >0,12 mg/L ou diâmetro do halo de inibição com discos de 10 µg <28 mm e <25 mm, respectivamente) os testes de triagem ou moleculares devem ser aplicados nos laboratórios clínicos (BrCast, 2017).

2.4.1. Espectrometria de massa MALDI TOF

A espectrometria de massa por dessorção e ionização a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI TOF MS) é fortemente empregada no laboratório de microbiologia para a identificação de microrganismos patogênicos (Fenselau *et al.*, 2001). Entretanto, sua utilização para a detecção da resistência aos antimicrobianos mediada por enzimas em isolados bacterianos ainda não é rotineiramente empregada nos laboratórios clínicos (Carvalhoes *et al.*, 2015). Recentemente, a técnica de espectrometria de massa MALDI TOF também foi descrita para a detecção de plasmídeos carreadores do gene *bla_{KPC}* (Lau *et al.*, 2014; Gaibani *et al.*, 2016; Youn *et al.*, 2016); ensaio semi-quantitativo para avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos (Lange *et al.*, 2014; Sparbier *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2016); assim como, para a detecção da resistência à polimixina pela análise da modificação do lipídio A (Leung *et al.*, 2017); análise da ausência de proteínas de membrana externa (Ramos *et al.*, 2019);

discriminação de CCs (Cameoz *et al.*, 2016); e detecção de diferentes *Sequence types* (STs) (Novais *et al.*, 2014).

A padronização desse ensaio fenotípico para a detecção de bactérias produtoras de carbapenemases foi descrita inicialmente em 2011 (Hrabák *et al.*, 2011; Burckhardt & Zimmermann, 2011). Diferentemente do método de identificação bacteriana no qual as proteínas ribossomais compõem o espectro de massa, nesse ensaio, as moléculas dos carbapenêmicos são avaliadas. A modificação no perfil de massa do carbapenêmico é detectada após a exposição deste antimicrobiano às bactérias produtoras de carbapenemases (Hrabák *et al.*, 2014). Após adição de uma matriz que confere carga positiva às moléculas do antimicrobiano em uma placa sólida, estas são submetidas à incidência de um laser, sofrem um processo de dessorção e atingem um detector em um tubo a vácuo com uma extremidade elétrica negativa no interior do equipamento. A velocidade com que as moléculas atingem o detector é inversamente proporcional a sua massa, gerando assim o espectro de massa presente na amostra (Figura 2). O espectro obtido representa o número de íons que atingem o detector através do tempo. A modificação do perfil de massa dos carbapenêmicos é consequência da capacidade hidrolítica de cada carbapenemase. O resultado negativo do teste pode ser liberado em até 4 horas de incubação do isolado bacteriano com o antimicrobiano; entretanto, enzimas com potente atividade hidrolítica, como por exemplo, a KPC-2 e a IMP-1, podem ser detectadas em apenas 15 minutos (Carvalhoes *et al.*, 2015). Por outro lado, algumas enzimas, como as OXA-carbapenemases e a serino- β -lactamase BKC possuem fraca atividade hidrolítica aos carbapenêmicos, e requerem incubação prolongada para a detecção da hidrólise do antimicrobiano (Carvalhoes *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2016). Além disso, o meio de crescimento bacteriano e a presença de proteínas exógenas são fatores que poderiam interferir na análise do espectro de massa (Anderson *et al.*, 2012). Além da hidrólise do antimicrobiano a partir de uma suspensão de colônias bacterianas que requerem o crescimento/isolamento da bactéria em meio de cultura, esse ensaio também foi padronizado diretamente de frascos de hemoculturas positivas (Carvalhoes *et al.*, 2014), e diretamente de amostras clínicas de urina (Oviaño *et al.*, 2017). No entanto, esse ensaio fenotípico não é limitado apenas à detecção da hidrólise dos carbapenêmicos. Estudos evidenciaram sucesso na detecção da hidrólise de outros antimicrobianos, tais como ampicilina, piperacilina, cefotaxima e ceftazidima (Sparbier *et al.*, 2012). Inicialmente, a avaliação dos espectros dos antimicrobianos exigia habilidade do

analista para detectar a ausência e presença de determinados picos de massa, entretanto, recentemente foram desenvolvidas plataformas automatizadas para a detecção do perfil de massa associado a hidrólise de cada antimicrobiano (Papagiannitsis *et al.*, 2015; Rapp *et al.*, 2018).

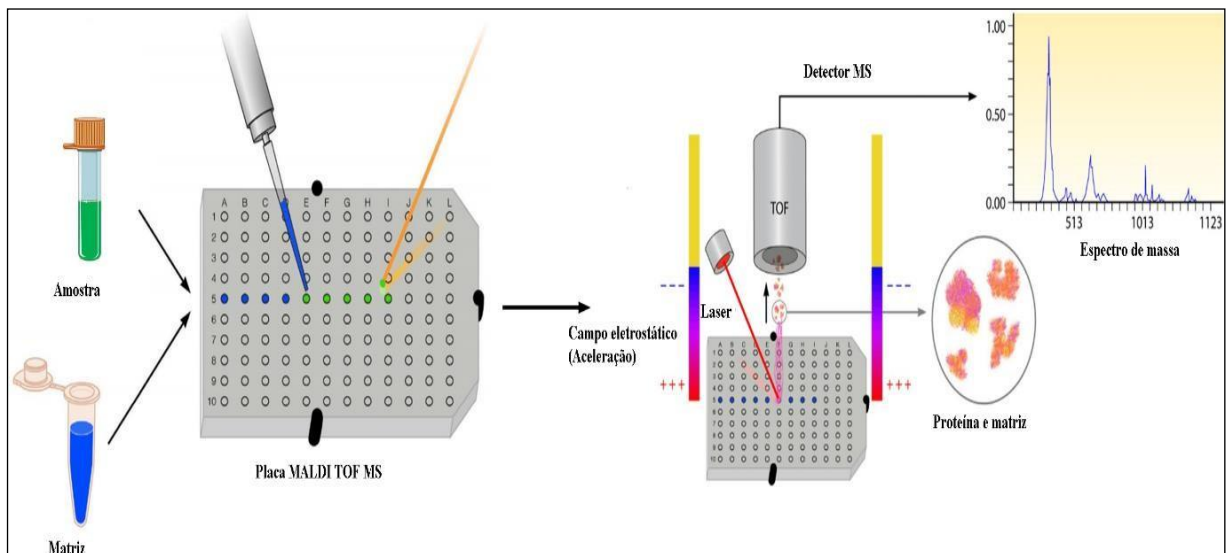


Figura 2. Figura esquemática da análise de moléculas pela técnica de espectrometria de massa MALDI TOF (Adaptado Clark *et al.*, 2013).

2.4.2. Testes Imunocromatográficos

KPC K-SeT (Coris BioConcept, Belgica) é um teste imunocromatográfico baseado na utilização de nanopartículas de ouro coloidais ligadas à membrana de nitrocelulose sensibilizada com anticorpos monoclonais, para a detecção de KPC diretamente de uma única colônia bacteriana (Glupczynski *et al.*, 2016). Esse ensaio é rápido e de fácil execução, demonstrando resultados em no máximo 15 minutos. Na figura 3 podemos observar uma representação do fluxograma para a realização e leitura do teste. Além da detecção de KPC, esse teste foi desenvolvido para a detecção de outras enzimas, tais como OXA-48 (OXA-48 K-SeT); OXA-23 (OXA-23 K-SeT) OXA-48, OXA-163 e KPC (RESIST-3 O.O.K. K-SeT); e OXA-48, KPC e NDM (RESIST-3 O.K.N. K-SeT). Recentemente, um novo multiplex imunocromatográfico foi descrito (RESIST-4 K-SeT) para a detecção de OXA-48 (OXA-48, -162, 181, -204, -232, e -244); KPC (KPC-2, -3, e -4); VIM (VIM-1, -2, -4, -5, -19, -27, -30, -

31, e -52); e NDM (NDM-1, -4, -5 e -7) em enterobactérias e bactérias não fermentadoras (Kolenda *et al.*, 2018; Glupczynski *et al.*, 2019). O teste demonstrou 99% de sensibilidade para a detecção de VIM-like, e 100% para a detecção de OXA-48-like, KPC-like e NDM-like (Glupczynski *et al.*, 2019). Recentemente, Riccobono e colaboradores (2018) reportaram uma excelente sensibilidade (100%) e especificidade (98,9%) para a detecção de KPC diretamente de amostras positivas de hemocultura (Riccobono *et al.*, 2018). Além disso, a detecção direta de swabs retais utilizando OKN K-SeT foi possível após 2,5 horas de incubação com meio de cultura contendo meropenem (0,25 mg/L). Embora o teste tenha demonstrado uma alta especificidade (100%), sensibilidade (96%), rapidez e baixa complexidade para a detecção de carbapenemases (Fauconnier *et al.*, 2019), este ainda é uma ferramenta de alto custo para os laboratórios clínicos do Brasil (€ 6-±R\$ 25,32/teste; KPC K-Set; €15-±R\$ 64,80/teste-RESIST-4 K-SeT;) (Riccobono *et al.*, 2018; Glupczynski *et al.*, 2019).

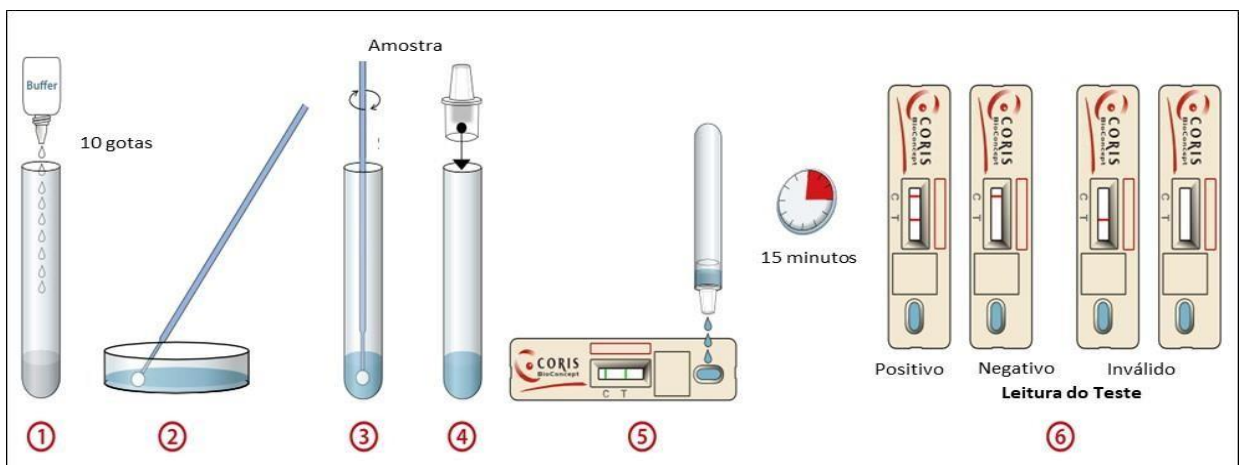


Figura 3. Fluxograma para realização e leitura do teste imunocromatográfico K-SeT (Adaptado de Coris BioConcept; <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/KPC.php>)

O imunocromatográfico multiplex NG-Test CARBA 5 (NG Biotech, França) foi avaliado recentemente para a detecção das carbapenemases KPC, OXA-48-like, NDM, VIM e IMP. Da mesma forma que o K-SeT, a detecção das carbapenemases pode ser observada em até 15 minutos a partir de uma colônia bacteriana por este teste. Entretanto o NG-Test CARBA 5 não foi capaz de detectar as variantes da IMP-13 e IMP-14, demonstrando uma sensibilidade e especificidade de 97,3% e 99,7%, respectivamente (Hopkins *et al.*, 2018). Giordano e colaboradores (2019) ainda demonstraram a capacidade do teste para a detecção de

carbapenemases diretamente de 310 hemoculturas positivas para *K. pneumoniae*. A sensibilidade e especificidade do teste foi de 98,4% e 100%, respectivamente (Giordano *et al.*, 2019). Entratanto, dois isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-3 e VIM-1 que formaram um fenótipo de hipermucoviscosidade na cultura não foram detectadas pelo teste (Giordano *et al.*, 2019).

2.4.3. Método de Inativação do Carbapenêmico

O princípio do Método de Inativação do Carbapenêmico (CIM) é detectar a hidrólise de um carbapenêmico após a incubação com uma suspensão bacteriana. Um disco de meropenem (10- μ g) é incubado durante 2 horas a 35°C em água com uma alça de 10 μ l de uma suspensão bacteriana. Após esse período de incubação o disco é removido da suspensão e aplicado em um ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com a *E. coli* ATCC 25922. A atividade da carbapenemase no inóculo bacteriano inicial será demonstrado na ausência da produção de um halo, demonstrando que o meropenem do disco foi hidrolisado. Entretanto a presença de um halo ou zona de inibição indica a ausência da produção ou atividade de carbapenemases no isolado bacteriano (van der Zwaluw *et al.*, 2015). O teste demonstrou uma sensibilidade e especificidade de 91% a 94% e 99% a 100% respectivamente (Tamma *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Entretanto Tamma e colaboradores (2017) demonstraram um menor índice de sensibilidade para detecção das carbapenemases OXA-48 (80%) e IMP (83%) em enterobactérias. Pierce e colaboradores (2017) demonstraram um CIM modificado (mCIM) que modifica a primeira fase do teste (inativação do carbapenem), substituindo água pelo *tryptic soy broth* (TSB) e aumentando o tempo de incubação para 4 horas. Essa modificação atribuiu ao mCIM uma sensibilidade e especificidade de 99% e 100%, respectivamente para detecção de carbapenemases de classe A, B e D, incluindo isolados não produtores de carbapenemases e sensíveis aos carbapenêmicos durante a etapa de validação do teste (Pierce *et al.*, 2017). Embora o CIM e o mCIM sejam de fácil execução, interpretação e de baixo custo (\$1 por teste), estes ainda requerem entre 18 e 24 horas para a leitura do resultado após o crescimento e isolamento bacteriano (Pierce *et al.*, 2017; Tamma *et al.*, 2017).

2.4.4. Testes com inibidores de carbapenemases

Esse teste fenotípico compara a atividade de um disco de carbapenêmico com e sem a presença de um inibidor. Resumidamente, o ácido borônico inibe as carbapenemases de classe A (KPC principalmente), o ácido dipicolínico e o EDTA inibem carbapenemases de classe B. Além disso a cloxacilina foi adicionada para a diferenciação entre a hiperprodução da β -lactamase AmpC com alteração de porinas e a produção de carbapenemases (van Dijk *et al.*, 2014). Os testes são comumente realizados seguindo as orientações do EUCAST para disco-difusão, entretanto as metodologias comerciais são realizadas seguindo as orientações do fabricante. Além disso fitas de gradiente com um β -lactâmico e um inibidor β -lactamase também são uma opção para a detecção de carbapenemases. Estudos observaram uma sensibilidade de 92% e 94% e especificidade de 100% e 95% na fita de gradiente para a detecção de KPC e M β L, respectivamente (Walsh *et al.*, 2002; Girlich *et al.*, 2013). Embora alguns estudos tenham sugerido que a temocilina poderia ser utilizada como um indicador da produção de OXA-48 devido aos altos níveis de resistência (>128 μ g/ml), esse marcador não é específico, uma vez que outros mecanismos de resistência podem conferir o mesmo fenótipo (Hartl *et al.*, 2013; van Dijk *et al.*, 2014).

Tabela 2. Interpretação dos principais testes fenotípicos por disco-difusão com inibidores de lactamases (Adaptado de BrCast., 2017).

β -lactamase	Sinergismo/aumento do halo(\geq 5mm) com disco de meropenem (10 μ g)				CIM de temocilina >128 μ g/mL ou diâmetro de halo de inibição <11 mm
	ADP/EDTA	AAFB/AFB	ADP+AAFB	CLX	
Classe B (M β L)	+	-	-	-	Variável
Classe A (KPC)	-	+	-	-	Variável
M β L + KPC	Variável	Variável	+	-	Variável
OXA-48-like	-	-	-	-	Sim
Hiperexpressão de AmpC + perda/alteração de porinas	-	+	-	+	Variável
ES β L + perda/alteração de porinas	-	-	-	-	Não

ADP, ácido dipicolínico; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, AAFB, ácido aminofenilborônico; AFB, ácido fenilborônico; CLX, cloxacilina.

2.4.5. Testes bioquímicos colorimétricos

O Carba NP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) e o Blue Carba são testes colorimétricos rápidos (<2 horas) desenvolvidos para detecção da hidrólise do anel β -lactâmico dos carbapenêmicos. Esse processo ocasiona a diminuição do pH e consequente mudança de cor do meio ocasionada inicialmente pela produção de carbapenemases. A primeira versão do teste Carba NP, publicada em 2012 (Nordmann *et al.*, 2012), demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para a detecção de enterobactérias provenientes de crescimento bacteriano em placas de Mueller-Hinton. A detecção de carbapenemases em isolados de *Pseudomonas* spp. demonstrou uma sensibilidade de 94,4% (Dortet *et al.*, 2012). Entretanto, para a detecção de carbapenemases em isolados de *Acinetobacter* spp., uma modificação nas condições de lise e aumento do inóculo bacteriano foi realizada no teste Carba NP. Este teste, o CarbAcineto NP, demonstrou uma sensibilidade e especificidade de 94,7% e 100%, respectivamente (Dortet *et al.*, 2014). Diferentemente do Blue Carba, o Carba NP requer uma etapa de lise bacteriana prévia e então a positividade do teste é observada pela mudança de coloração avermelhada (vermelho de fenol) para alaranjada ou amarelada (Nordmann *et al.*, 2012). O teste também está disponível na versão comercial (Rapidec Carba NP, bioMérieux) e demonstrou uma sensibilidade e especificidade de 96% para detecção de carbapenemases em enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *A. baumannii* (Dortet *et al.*, 2015). Entretanto o custo de cada teste comercial é de aproximadamente \$7 (Gauthier *et al.*, 2017).

Pires e colaboradores (2013) desenvolveram uma modificação do teste do Carba NP no qual o azul de bromotimol foi selecionado com indicador de cor. Quando há a produção de carbapenemases o teste demonstrará a mudança de coloração do meio que poderá variar de amarelado a esverdeado (Figure 4). O teste demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para a detecção de carbapenemases em enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (Pires *et al.*, 2013).

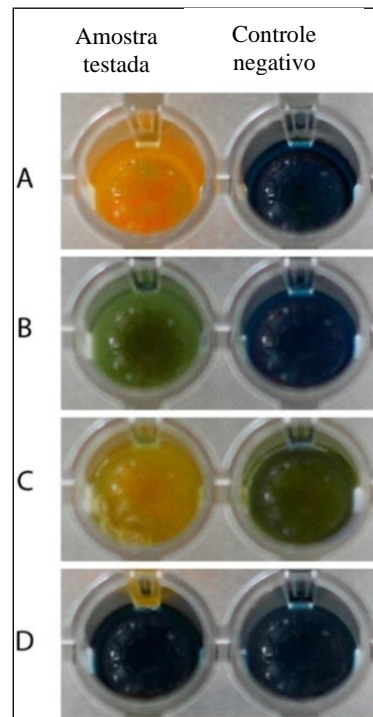


Figura 4. Resultados representativos do teste Blue-Carba obtidos de produtores de carbapenemase (A, B e C) e produtores de não carbapenemase (D) após 2 horas de incubação. *E. coli* produtora de NDM-1 (A). *A. baumannii* produtor de OXA-23 (B). *K. pneumoniae* produtor de OXA-48 (C). *E. coli* ATCC 25922 (D) (Adaptado de Pires *et al.*, 2013).

2.4.6. Métodos moleculares para a detecção de genes codificadores de carbapenemases

Os testes moleculares são considerados padrão-ouro para a detecção de genes codificadores de carbapenemases, entretanto os testes são limitados apenas à detecção do gene pesquisado e o tempo máximo para o resultado pode ser de até 4 horas. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é comumente utilizada para a detecção de um único ou múltiplos genes após extração do DNA, e consequente desnaturação, anelamento e extensão em um termociclador. O resultado é então visualizado em em gel de agarose (PCR convencional). O PCR em tempo real (RT PCR), realizado com um marcador fluorescente, por exemplo, é mais rápido que o PCR convencional, pois os resultados são demonstrados em tempo real pelo próprio software. Em geral, as reações são direcionadas à grupos específicos de carbapenemases, como por

exemplo, grupo IMP, grupo VIM, grupo NDM, grupo KPC e grupo OXA-23 devido a diversidade de genes de resistência (Poirel *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2012).

O NUCLISENS EasyQ KPC (bioMérieux, França), é um sistema automatizado de PCR em tempo real para detecção de genes *bla_{KPC}* a partir de colônias bacterianas. A metodologia combina a amplificação e detecção em tempo real NASBATM (Nucleic acid sequence based amplification) do RNA KPC presente nos ácidos nucleicos totais, utilizando sondas moleculares fluorescentes. Estudos demonstraram a capacidade desse método em detectar *bla_{KPC-2}* e *bla_{KPC-3}* em isolados de enterobactérias em 2 horas (Spanu *et al.*, 2012), sendo possível analisar até 48 reações por ensaio. Adicionalmente, McEwan e colaboradores observaram que o PCR em tempo real EasyQ KPC demonstrou 93,3% e 99, 0% de sensibilidade e especificidade a partir de colônias bacterianas, respectivamente, quando comparado com um método fenotípico (McEwan *et al.*, 2013).

Além disso, plataformas automatizadas (X-pert[®] Carba-R, BD Max Check-Points CPO) e kits (Carbaplex[®] IVD PCR, Check-Direct CPE) direcionados para grupos de enzimas específicas tem sido desenvolvido e comercializado. Embora estes testes possam detectar genes diretamente de amostras clínicas, como por exemplo, swab retais e hemoculturas, podem ser limitados devido ao alto custo, necessidade de profissionais qualificados e detecção de novos genes de resistência (Levy Hara *et al.*, 2013). Além disso estes testes são direcionados à grupos de genes de resistência codificadores de carbapenemases, restringindo a detecção de variantes clinicamente importantes. Embora o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) seja uma ferramenta que tem sido utilizada cada vez mais nos laboratórios de pesquisa, principalmente para a detecção de genes de resistência e virulência, a implantação deste na rotina laboratorial ainda requer adequação nos custos, duração e interpretação dos resultados (Rossen *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

- Avaliar o desempenho de diferentes testes rápidos para a detecção de carbapenemases em isolados gram-negativos em condições diferenciadas.

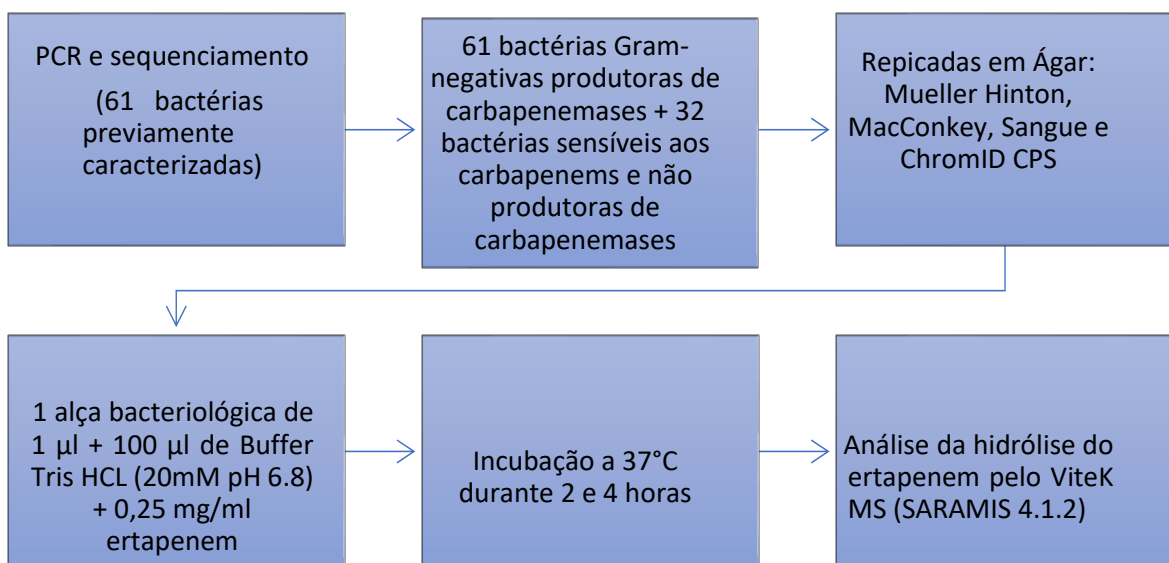
Objetivos específicos

- Avaliar a influência de diferentes meios de cultura para a detecção da hidrólise do ertapenem pela técnica de espectrometria de massa MALDI TOF;
- Avaliar a detecção de KPC-2, KPC-3, KPC-4, KPC-6, KPC-7, KPC-8, KPC-11 em um teste imunocromatográfico, bem como a influência de diferentes meios de cultura para a detecção dessas carbapenemases;
- Avaliar o desempenho do EasyQ KPC para a detecção de *bla*_{KPC} diretamente de swabs retais;
- Avaliar o perfil hidrolítico de ceftazidima/avibactam pela técnica de MALDI TOF MS em bactérias gram-negativas.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

4.1. Artigo Científico 1. Influence of Culture Media on Detection of Carbapenem Hydrolysis by MALDI-TOF MS. Publicado em abril de 2016 no periódico *Journal of Clinical Microbiology* – JCM, volume 54, número 7, páginas 1896-1898. Os resultados parciais desse estudo também foram apresentados na forma de poster (D-1532) no 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy - ICAAC, realizado no período de 5 a 9 de setembro de 2014 em Washington, DC.

- **Resumo/fluxograma da metodologia**



Influence of Culture Media on Detection of Carbapenem Hydrolysis by MALDI-TOF

MS

Ana Carolina Ramos^{1*}

Cecília Godoy Carvalhaes^{1,3}

Jhonatha Rodrigo Cordeiro-Moura¹

Anna Carolina Rockstroh²

Antonia Maria Oliveira Machado³

Ana Cristina Gales¹

¹Laboratório Alerta. Division of Infectious Diseases. Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

²bioMérieux, São Paulo - SP, Brazil

³Laboratório Central - Hospital São Paulo - UNIFESP, São Paulo-SP, Brazil

Running Title: Medium influence on carbapenems hydrolysis by MALDI-TOF

*Corresponding author: Ana Carolina Ramos

Rua Pedro de Toledo, 781, 6th Floor

São Paulo - SP

Brazil

ZIP code: 04039-032

Phone/Fax.: +551155764748

E-mail: anarolramos@msn.com

Abstract

In this study, we evaluated the influence of distinct bacterial growth media on detection of carbapenemase hydrolysis by MALDI TOF MS. False negative results were observed for OXA-25-, OXA-26-, and OXA-72-producing *A. baumannii* grown on MAC medium. The others culture media showed 100% sensitivity and 100% specificity for carbapenemase detected.

Text

Rapid detection of carbapenemase-producing isolates is important for clinical management of infected patients and implementation of infection control measures. The detection of different classes of carbapenemase activity has been assessed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)⁽¹⁻⁴⁾. In this study, we evaluated the influence of distinct growth culture media on detection of carbapenemase activity by MALDI-TOF MS using Vitek MS[®] equipment (bioMérieux, Brazil SA).

A total of 61 carbapenemase-producing and 32 non-carbapenemase producing Gram negative clinical isolates previously characterized by PCR and DNA sequencing were grown on Müeller-Hinton agar (MHA), blood agar (BA), MacConkey agar (MAC), and chromID CPS[®] agar (CPS) (bioMérieux, Brazil SA). Sixty-one carbapenemase-producing clinical isolates resistant to at least one carbapenem compound were evaluated, including *Klebsiella pneumoniae* producers of IMP-1 (n=6), KPC-2 (n=25), NDM-1 (n=1), and BKC-1 (n=2); *Enterobacter cloacae* producers of VIM-1 (n=1), IMP-1 (n=1), and KPC-2 (n=1); KPC-2-producing *Escherichia coli* (n=1); *Serratia marcescens* producers of KPC-2- (n=13) and IMP-1 (n=1); five SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*; and *Acinetobacter baumannii* producers of OXA-25 (n=1), OXA-26 (n=1), OXA-72 (n=1), and OXA-58 (n=1). In addition, 32 non carbapenemase-producing bacterial isolates were also tested as negative controls, including *Enterobacteriaceae* (n=29), *P. aeruginosa* (n=1), and *A. baumannii* (n=2). The MALDI-TOF MS assay was performed incubating 1 µL loop of fresh bacterial colonies from MHA, BA, MAC, or CPS in 100 µl buffer adjusted solution (Tris/HCl 20 mM pH 6.8) with ertapenem (ETP 0.25 mg/ml; Merck Sharp & Dohme, NJ, USA)⁽⁵⁾. The samples were analyzed after 2 and 4 hours of incubation at 37°C. One microliter of the supernatant was spotted onto a MALDI target plate followed by 1 µl of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (HCCA;

bioMérieux Brazil SA) on each spot and allowed to dry at room temperature. The mass spectrum was obtained by using the Vitek MS instrument operating in linear, positive ion mode and using SARAMIS 4.1.2 software (bioMérieux, Brazil SA). For each isolate, mass spectra were acquired by accumulating 200 laser shots at 50-55% laser power in the m/z range of 400 to 600 Da, after instrument calibration using the HCCA matrix peaks ($[M+H]^+ = 189.17$; $[2M+H]^+ = 379.35$) and ertapenem solution. Carbapenem hydrolysis was considered positive if the ertapenem mass peaks corresponding to intact-molecule ($[M+H]^+$) at 475 m/z and its monosodium salt ($[M+Na]^+$) at 497 m/z completely disappeared, as previously described^(3,5). The Figure 1 shows the mass peak spectrum observed for a KPC-2-producing *K. pneumoniae* grown on distinct media in a 2-hour assay. Independently of the growth medium tested, no false positive results were observed. MHA, BA and CPS showed a sensitivity of 92.4% and specificity of 100% after 2 h incubation. Only the two BKC-1-producing *K. pneumoniae* isolates and four carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDL)-producing *A. baumannii* isolates required an extended period of incubation (4h) for yielding positive results with those three media. These results are probably related to low level of carbapenem hydrolysis activity reported for BKC and most of CHDL enzymes^(6,7). In contrast, using colonies obtained from MAC medium, 9 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (BKC-1 (n=2), IMP-1 (n=4), KPC-2 (n=2), NDM-1 (n=1)) and 4 CHDL-producing *A. baumannii* (OXA-25 (n=1), OXA-26 (n=1), OXA-72 (n=1) and OXA-58 (n=1)) resistant to carbapenems (Table 1) were not detected by Vitek MS at 2-hour incubation period. When the incubation period was extended to 4 hours, all carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates and one OXA-58-producing *A. baumannii* had their carbapenemase activity recognized by Vitek MS. However, the mass peak of intact ertapenem molecule remained visible when three (4.9%) CHDL-producing *A. baumannii* isolates (OXA-25 (n=1), OXA-26 (n=1) and OXA-72 (n=1)) grown on the MAC medium were tested even after 4-hour incubation period. Both, positive and negative predictive values (PPV and NPV) were 100% for MHA, BA and CPS medium using 4-h incubation period, independently of the bacterial species tested. When MAC medium was evaluated the PPV and NPV were 100% and 91%, respectively. The PPV and NPV according to specific bacterial groups were presented on table 2.

A faster determination of the resistance mechanism may play a key role in the initial choice of antimicrobial therapy and implementation of infection control measures. MALDI-TOF

hydrolysis has been a useful tool for detection of carbapenemase producers. However, other mechanisms of carbapenem resistance such as outer membrane protein alterations associated with AmpC or extended spectrum β -lactamase (ESBL) production cannot be assessed by this methodology.

In the present study, we observed that false negative results were more frequently yielded for OXA-25-, OXA-26-, and OXA-72-producing *A. baumannii* grown on MAC medium, even when the incubation period was extended to 4 hours. Anderson *et al.* observed a poorer performance testing colonies cultivated on MAC than blood agar medium when testing *Pseudomonas* spp. by MALDI-TOF MS. These authors suggested that factors like growth conditions and presence of exogenous proteins could hinder analysis of mass spectrometry ⁽⁸⁾. The detection of carbapenem hydrolysis by Vitek MS using the proposed protocol was successfully achieved from bacterial colonies grown on all media, except MacConkey agar. Due to the occurrence of false negative results, we suggest that clinical microbiology laboratories do not perform hydrolysis assay by MALDI-TOF from bacterial colonies grown on MacConkey agar. It is worthy to mention that colonies grown on MacConkey agar were not recognized as carbapenemase producers by other rapid tests like Carba NP ⁽⁹⁾. We also emphasize the importance of increasing the incubation time for up to 4 hours before reporting a negative result, mainly when *Acinetobacter* spp. isolates were tested due to possible production of CHDL enzymes. In this study, only *Acinetobacter* spp. producers of weak carbapenemases (CHDL) were tested. For those isolates, an extended incubation period was necessary; however, it might not be required for *Acinetobacter* spp. producers of stronger carbapenemases.

Carbapenemase detection by MALDI-TOF MS could easily be incorporated into the routine clinical microbiology if kits for bacterial extraction/lysis become cheaper, and if software for automatic interpretation of results become commercially available. However, susceptibility testing will still be necessary to provide information regarding the activity of other antimicrobials and mechanisms of resistance.

TRANSPARENCY DECLARATIONS

A.C.G. has recently received research funding and/or consultation fees from AstraZeneca, MSD and Novartis. C.G.C has received honorarium from AstraZeneca. A.C.R² is bioMérieux'

employee. Other authors have nothing to declare. This study was presented in part as poster D-1532 at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, USA, 5-9 September 2014.

REFERENCES

1. Carvalhaes CG, Cayô R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, Assis DM, Juliano L, Machado AM, Gales AC. 2014. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother* **69** (8): 2132-2136.
2. Burckhardt I and Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 49: 3321-3324.
3. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 50 (3): 927-937.
4. Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, Gales AC. 2013. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 51 (1): 287-290.
5. Carvalhaes CG, da Silva AC, Streling AP, Cayô R, Rockstroh AC, Machado AM, Gales AC. 2015. Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J Med Microbiol.* 64 (8): 946-947.
6. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 440-458.
7. Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, Oliveira V, Gales AC. 2015. Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 59 (9): 5169-5164.
8. Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebor NA. 2012. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use

of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 50 (3): 1008-1013.

9. Dortet L, Brécard L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. J Med Microbiol. 63 (Pt 5): 772-776.

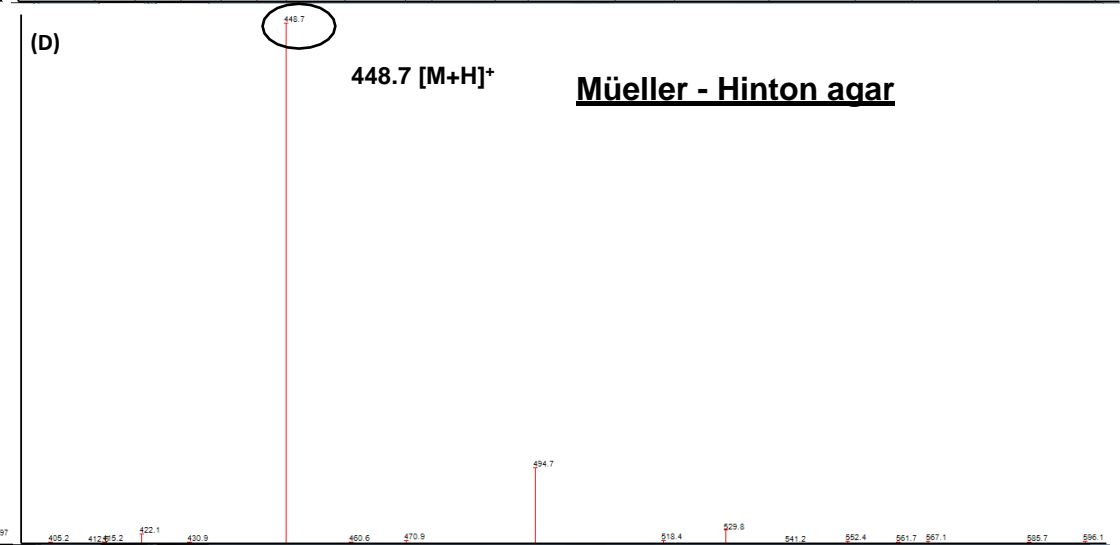
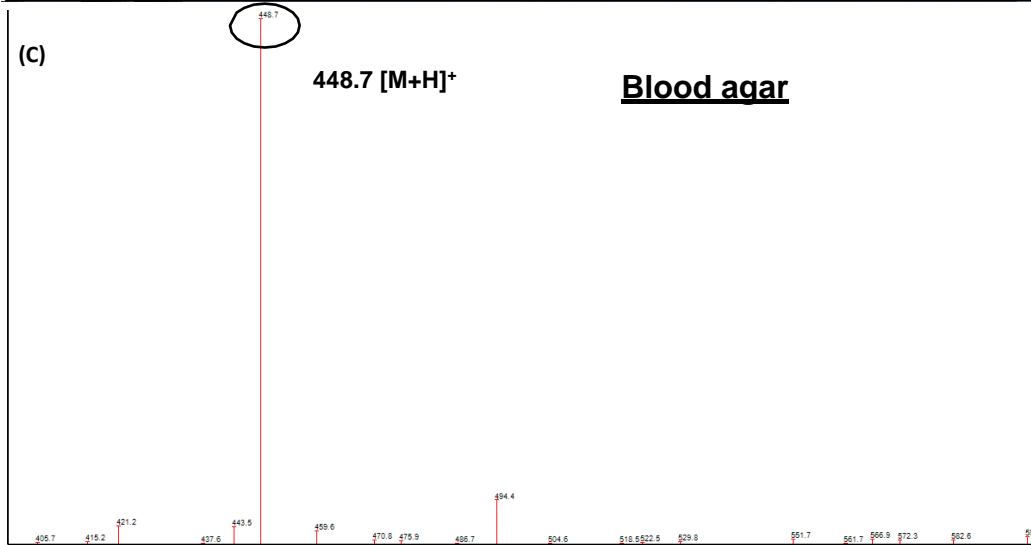
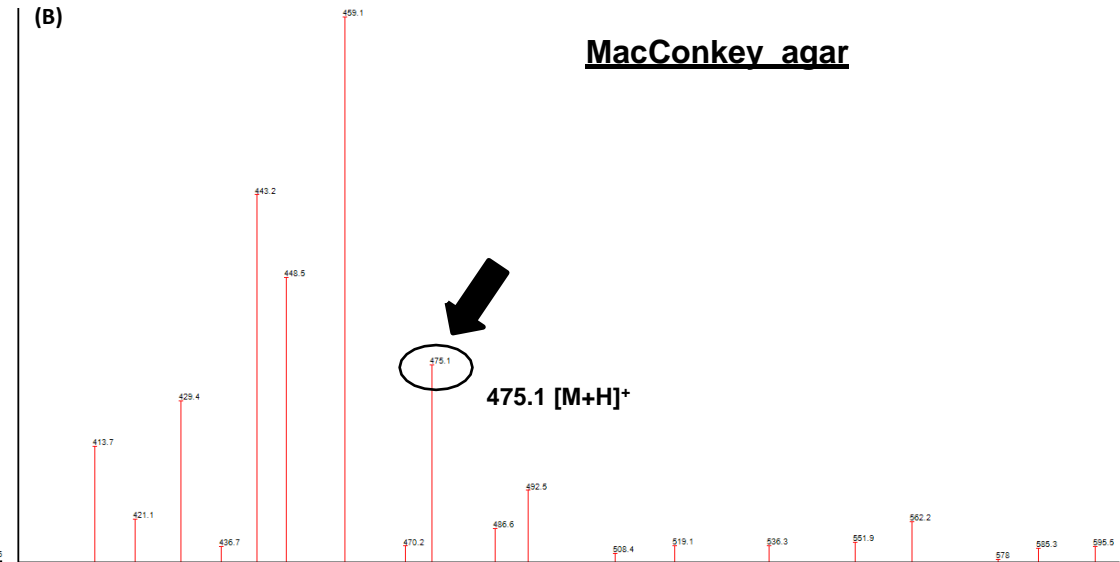
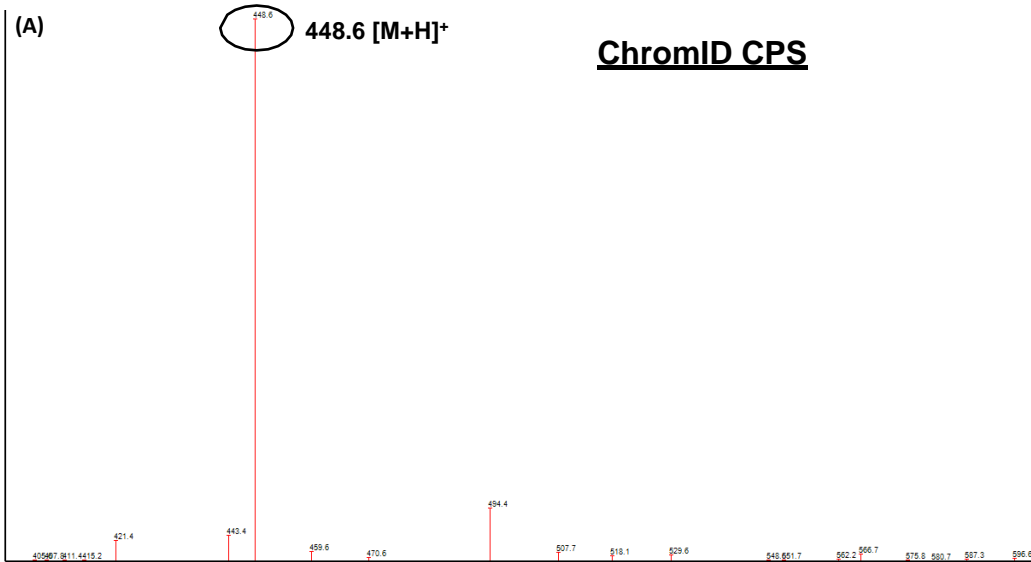
FIGURE LEGEND

Figure 1. Analysis of ETP hydrolysis in a KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate by VitekMS in a 2-hour assay. **(1A)** Colonies growth on chromID CPS[®] (CPS) agar, **(1B)** Colonies growth on MacConkey agar (MAC), **(1C)** Colonies growth on blood agar (BA), and **(1D)** Colonies growth on Müller-Hinton agar (MHA). It is important to note that this strain was detected as carbapenemase producer in **1A**, **1C** and **1D**, since the ertapenem intact molecule mass peak ($[M+H]^+ = 475 \text{ g mol}^{-1}$) was not detected. However, when the bacterial colonies were obtained from MacConkey agar the mass peak at 475 m/z could be detected (black arrow; **1B**).

TABLE LEGEND

Table 1. Carbapenem susceptibility profile of bacterial isolates grown on the MAC medium that showed false-negative results by MALDI-TOF assay.

Table 2. Positive and negative predictive values of MALDI-TOF assay regarding culture medium and incubation period (IP).



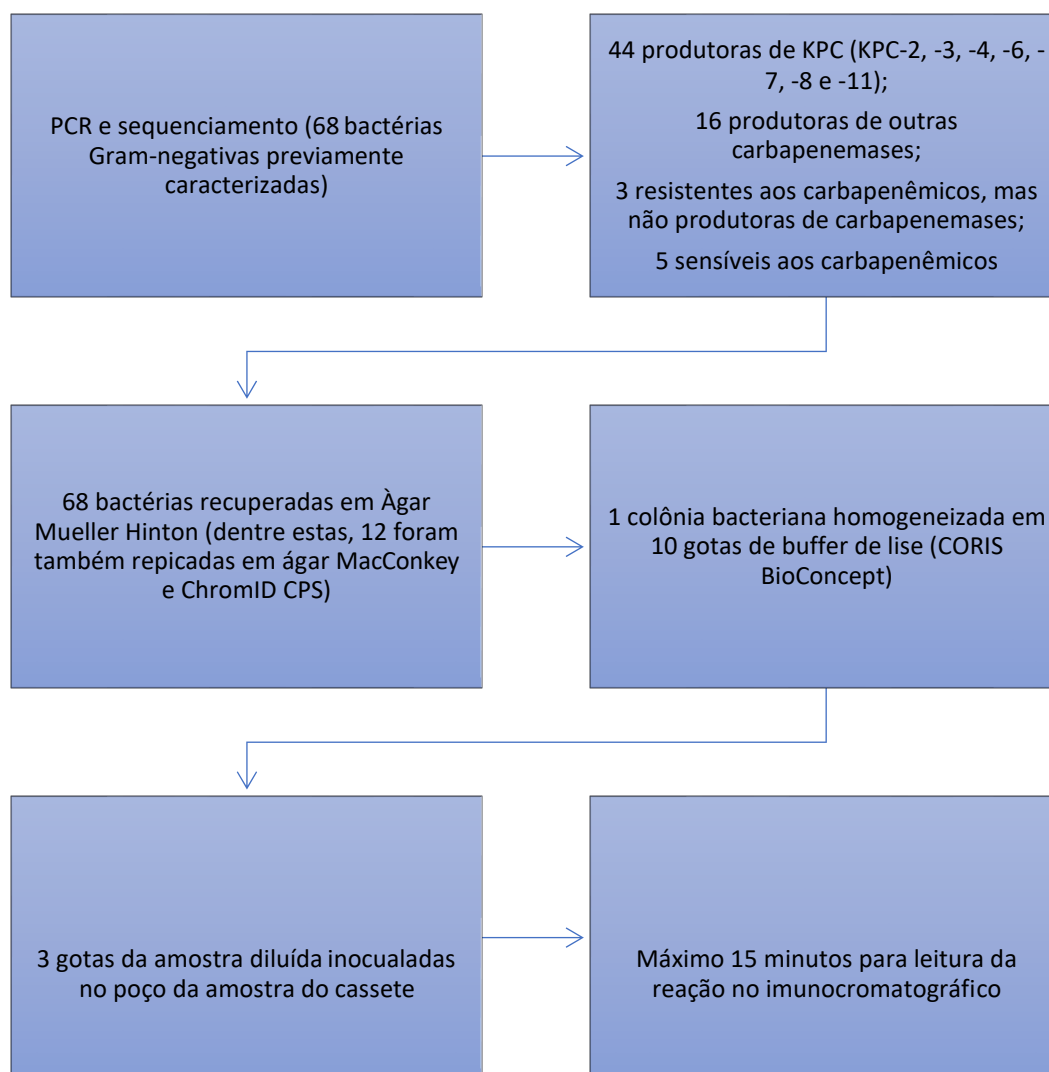
Bacterial species	Enzyme produced	No.	MIC range (µg/ml)		
			Ertapenem	Imipenem	Meropenem
<i>K. pneumoniae</i>					
	BKC-1	2	64	4-8	8-16
	IMP-1	4	>128	128	64
	KPC-2	2	16-128	8-32	16-32
	NDM-1	1	128	64	32
<i>A. baumannii</i>					
	OXA-25	1	-	128	256
	OXA26	1	-	128	256
	OXA-72	1	-	64	128
	OXA-58	1	-	16	32

Bacterial species	MHA, BA, CPS					MAC			
	2 hours (IP)		4 hours (IP)			2 hours (IP)		4 hours (IP)	
	No.	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
All isolates	93	100%	89%	100%	100%	100%	71%	100%	91,4%
<i>Enterobacteriaceae</i>	81	100%	94%	100%	100%	100%	76,3%	100%	100%
<i>A. baumannii</i>	6	100%	50%	100%	100%	- ^a	33%	100%	40%
<i>P. aeruginosa</i>	6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

^aDenominator was zero, not calculated.

4.2 Artigo Científico 2. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of distinct variants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *Enterobacteriaceae*. Publicado em agosto de 2017 no periódico Journal of Microbiological Methods – JMM, volume 142, páginas 1-3. Os resultados parciais desse estudo também foram apresentados na forma de poster (A-5264) no American Society for Microbiology – ASM, realizado no período de 16 a 20 de junho de 2016 em Boston, MA.

• **Resumo/fluxograma da metodologia**



Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of distinct variants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *Enterobacteriaceae*

Ana C. Ramos^{1*}

Ana C. Gales¹

Jussimara Monteiro²

Suzane Silbert³

Thomás Chagas-Neto⁴

Antonia M.O. Machado⁴

Cecília G. Carvalhaes^{1,4}

¹Laboratório Alerta. Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa, AFIP Medicina Diagnóstica, São Paulo, Brazil.

³Esoteric Testing Laboratory, Pathology Department, Tampa General Hospital, Tampa, United States.

⁴Laboratório Central - Hospital São Paulo - Division of Laboratory Medicine. Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Keywords: KPC variants, KPC-K-SeT, MacConkey, Mueller-Hinton, chromogenic agar, culture medium.

* Corresponding author: Ana Carolina Ramos

Pedro de Toledo, 781, 6th Floor
São Paulo - SP
Brazil
ZIP code: 04039-032
E-mail: anarolramos@msn.com

Abstract

The rapid detection of KPC-producing Enterobacteriaceae by microbiology laboratories has been required for infectious control programs. Herein we evaluated the performance of a novel immunochromatographic test for detecting KPC-2-, KPC-3-, KPC-4-, KPC-6-, KPC-7-, KPC-8-, and KPC-11-producing isolates and the influence of different growth media on the test performance.

Text

Carbapenemase production represents the main mechanism of carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. Among these, KPC enzyme is highly disseminated around the world and endemic in many regions (Martínez-Martínez et al., 2014). To date 23 KPC variants (KPC-2 to KPC-24) have been reported, and a number of tests have been proposed for their rapid detection by routine microbiology laboratories. Carba NP, Blue-Carba, mass spectrometry based assay, and molecular tests are methodologies that enables results within a few hours (Nordmann et al., 2012, Pasteran et al., 2015, Carvalhaes et al., 2015). Although, phenotypic tests have the advantage of detecting a broad range of carbapenemases, sometimes, false negative results are observed due to growth conditions on selective agar (Dortet et al., 2014; Ramos et al., 2016). Molecular methods are considered the gold-standard methodologies for detection of carbapenemases-encoding genes. However, molecular-based methods require specific equipment, supplies, expertise, and cost that may not be affordable by all routine laboratories.

Recently, a rapid immunochromatographic test using colloidal gold nanoparticles bound to nitrocellulose membrane sensitized with monoclonal antibodies has been developed for KPC detection directly from a single bacterial colony (Glupczynski et al., 2016). Conceptually, KPC enzymes are unrelated to other commonly encountered beta lactamases, making improbable the cross-reactivity of KPC monoclonal antibodies against other enzymes (Gudeta et al., 2016). The objective of this study was to evaluate the performance of the KPC-K-SeT[®] assay for

detecting distinct KPC variants and the influence of different growth media on the test performance.

A collection of 68 Gram-negative isolates, previously characterized by PCR and DNA sequencing, were studied, including 44 KPC-producing *Enterobacteriaceae* (7 distinct variants); 16 carbapenemase-producing isolates other than KPC; 3 carbapenem-resistant non-carbapenemase-producing *K. pneumoniae*; and 5 carbapenem-susceptible isolates (Table 1) (Monteiro et al., 2014; Carvalhaes et al., 2015). All isolates were subcultured overnight onto Müeller-Hinton (MHA), before testing by KPC-K-SeT assay. In addition, 12 of 68 isolates (Table 1) were also selected to be subcultured onto MacConkey (MAC) and chromogenic agar (ChromID CPS[®]; CPS). Briefly, a single colony was homogenized in 10 drops of lysis buffer as recommended by the manufacturer (CORIS BioConcept, Gembloux, Belgium). Three drops of this bacterial suspension were applied into the cassette sample spot and results were read in 15 minutes. A positive result was observed when both a visible red (T) and control (C) lines were detected.

The K-SeT assay was able to detect KPC-2-, KPC-3- and KPC-4-producing isolates within 3 minutes after inoculation of the cassette. Similar results were observed by recent studies that tested KPC-2, KPC-3, KPC-4, and KPC-9 variants (Glupczynski et al., 2016; Meunier et al., 2016). In addition, to the already reported variants, our results showed that KPC-7- and KPC-11-producing isolates were also detected by the immunochromatographic assay. In contrast, KPC-6 and KPC-8-producing *E. coli* were not detected using a single colony. Of interest, all carbapenemase-producing isolates, except for KPC-6- and KPC-8-producing *E. coli*, were resistant to at least one carbapenem (ertapenem, meropenem, and/or imipenem), according to the CLSI and EUCAST interpretative criteria (CLSI, 2016; EUCAST, 2016). The carbapenem susceptibility testing was performed by broth microdilution following CLSI recommendations. The KPC-6- and KPC-8-producing *E. coli* showed carbapenem MIC values ranging from 0.06 to 1 µg/ml, i.e., within the susceptible category. The KPC-K-SeT[®] assay was performed according to the manufacturer instructions. However, when the inoculum was increased to five bacterial colonies a weak red line could be observed for both KPC-6 and KPC-8-producing isolates. Considering that these two isolates were susceptible to carbapenems, it is possible that *bla*_{KPC-6} and *bla*_{KPC-8} had been expressed at low levels leading to false negative results. This assay presented high predictive positive and negative values (100% and 92.3%, respectively),

characterizing itself as an interesting alternative method for rapid detection KPC-producing isolates.

The use of chromogenic (ChromID CPS[®]; CPS) or MacConkey agars did not impaired the recognition of KPC-producing isolates by immunochromatographic assay, providing an additional advantage for its routine use by clinical microbiology laboratories. Similar results (100% of sensitivity) have been reported for this immunochromatographic assay, when bacterial isolates were grown on MacConkey or nutrient agars (Meunier et al., 2016). On the other hand, previous studies showed that, 29% and 4.9% of the bacterial isolates recovered from MacConkey agar could not be interpreted by Carba NP (Dortet et al., 2014) and MALDI-TOF MS (Ramos et al., 2016), respectively. KPC-K-SeT test requires high specificity of the antibodies against the epitopes of KPC, therefore is important to evaluate the assay against a broad range of KPC variants to ensure that all variants can be detected. This study showed that although the test was able to detect all KPC variants it seems to be influenced by the bacterial inoculum. This consideration is important to the routine use of this methodology, otherwise, false-negative results may occur.

In conclusion, the KPC-K-SeT[®] immunochromatographic test proved to be an accurate, rapid (few minutes), and friendly test for detecting different KPC variants. In this study, other KPC variants (KPC-6, KPC-7, KPC-8, and KPC-11) were tested showing that a higher inoculum might be necessary for proper detection of such isolates. Our results also show that the growth media did not influence the KPC-K-SeT[®] results either. In the clinical setting, this test could contribute for a faster adjustment of appropriate antimicrobial therapy and implementation of infection control measures. In this way, we suggest that a higher number of colonies be tested using KPC-K-SeT immunochromatographic test, especially when testing carbapenem susceptible isolates.

We would like to thank CORIS BioConcept for kindly providing us the test kits necessary for this study.

Funding. This research did not receive any specific grant from funding agencies.

TRANSPARENCY DECLARATIONS

A.C.G. has recently received research funding and/or consultation fees from AstraZeneca, MSD and Pfizer. We are also grateful to the National Council for Science and Technological Development (CNPq) for providing grant to A.C.G. (Process number: 305535/2014-5). Other authors have nothing to declare. This study was presented in part as poster A-5264 at the *American Society for Microbiology*, Boston, MA, 16-20, June 2016.

REFERENCES

1. Carvalhaes C.G., da Silva A.C., Streling A.P., Cayô R., Rockstroh A.C., Machado A.M., Gales A.C., 2015. Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J Med Microbiol.* 64 (8): 946-947.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI; 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard, 26th ed. Informational Supplement, CLSI document M100-S26. Wayne, PA, USA.
3. Dortet L., Brécharad L., Poirel L., Nordmann P., 2014. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol.* 63 (Pt 5):772-776.
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Clinical Breakpoints, 2016. Version 6.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCA_ST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf.
5. Glupczynski Y., Evrard S., Ote I., Mertens P., Huang T.D., Leclipteux T., Bogaerts P., 2016. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 71 (5): 1217-1222.
6. Gudeta D.D., Bortolaia V., Jayol A., Poirel L., Nordmann P., Guardabassi L., 2016. *Chromobacterium* spp. harbour Ambler class A β -lactamases showing high identity with KPC. *J Antimicrob Chemother.* 71 (6):1493-1496.
7. Martínez-Martínez L., González-López J.J., 2014. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 Suppl 4:4-9.
8. Meunier D., Vickers A., Pike R., Hill R.L., Woodford N., Hopkins K.L., 2016. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 71 (8):2357-2359.
9. Monteiro J., Widen R.H., Pignatari A.C., Kubasek C., Silbert S., 2014. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) variants by pyrosequencing. *J Microbiol Methods.* 100:42-45.

10. Nordmann P., Poirel L., Dortet L., 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 18 (9):1503-1507.
11. Pasteran F., Veliz O., Ceriana P., Lucero C., Rapoport M., Albornoz E., Gomez S., Corso A; ReLAVRA Network Group. 2015. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 53 (6):1996-1998.
12. Ramos A.C., Carvalhaes C.G., Cordeiro-Moura J.R., Rockstroh A.C., Machado A.M., Gales A.C., 2016. Influence of Culture Media on Detection of Carbapenem Hydrolysis by MALDI-TOF MS. *J Clin Microbiol.* 54 (7):1896-18

Table 1. KPC variants and bacterial species tested by KPC K-SeT assay

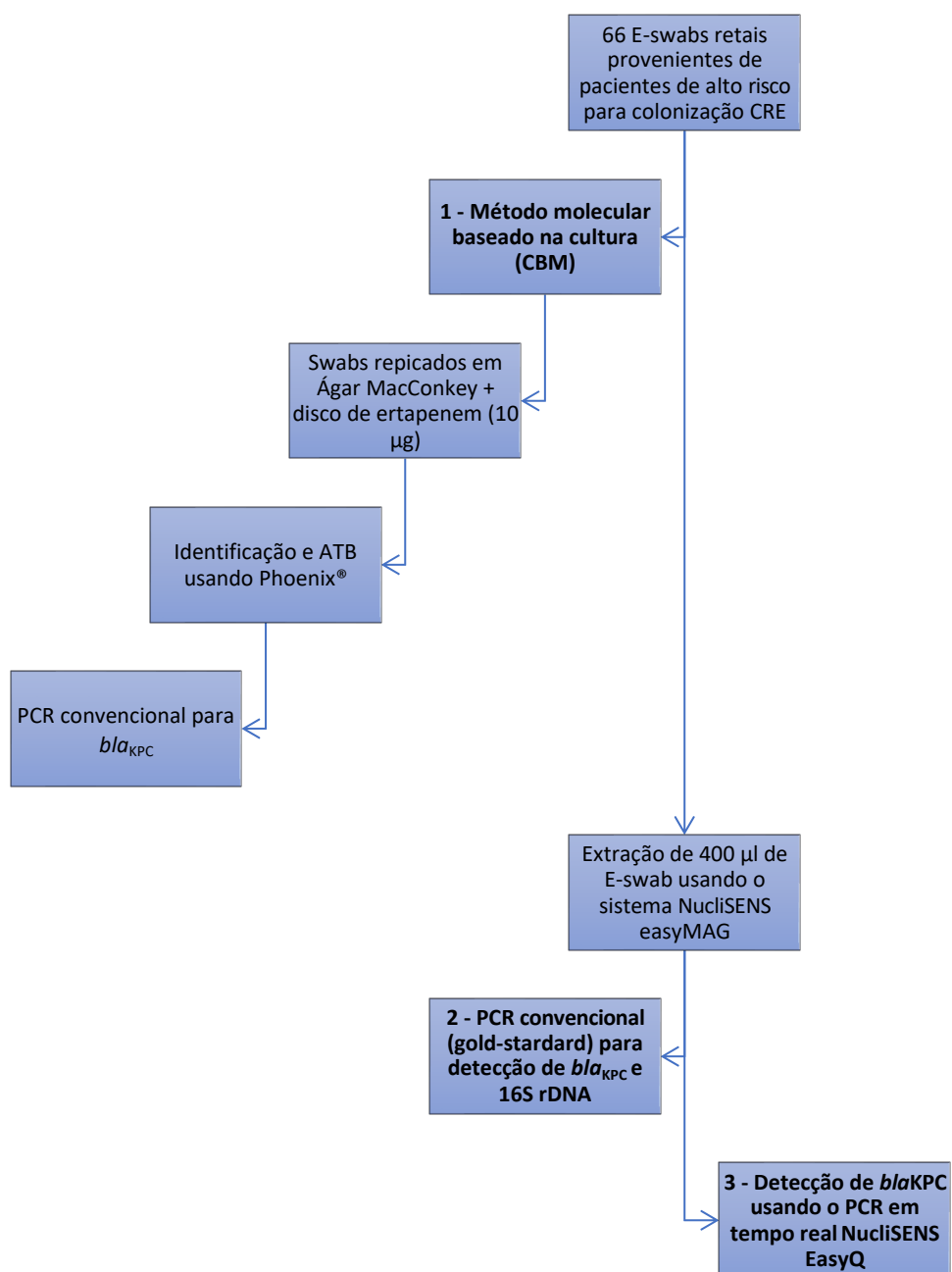
β -lactamase	Bacterial species (Total No./ No. tested on MAC or CPS) ^b	KPC K-Set No. of Positive results / Total No. of tested isolates (%) ^b
KPC variants		
KPC-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (19/2), <i>Klebsiella oxytoca</i> (1), <i>Escherichia coli</i> (2/1), <i>Serratia marcescens</i> (5/1), <i>Proteus mirabilis</i> (2), <i>Aeromonas hydrophila</i> (1/1), <i>Enterobacter cloacae</i> (2), <i>Enterobacter aerogenes</i> (1), <i>Citrobacter koseri</i> (1), <i>Citrobacter freundii</i> (1), <i>Citrobacter amalonaticus</i> (1), <i>Morganella morgani</i> (1), and <i>Raoutella planticola</i> (1)	44/44 (100)
KPC-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/1)	
KPC-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/1)	
KPC-6 ^a	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	
KPC-7	<i>Escherichia coli</i> (1/1)	
KPC-8 ^a	<i>Escherichia coli</i> (1)	
KPC-11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/1)	
Other tested carbapenemases		
NDM-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2/1), <i>Enterobacter cloacae</i> (2), <i>Enterobacter hormaechei</i> (1), and <i>Citrobacter freundii</i> (1)	
BKC-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3/1)	
OXA-48	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	0/16 (0)
OXA-23	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	
IMP-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1), and <i>Enterobacter cloacae</i> (1)	
VIM-1	<i>Enterobacter</i> (1)	
GES-16	<i>Serratia marcescens</i> (1)	
GES-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	
No carbapenemase-producing isolates		
CTX-M-2 /porin loss	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	
SHV-1/ porin loss	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	0/3 (0)
SHV-1, CTX-M-2, TEM-1/porin loss	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	
Carbapenem-susceptible		
SHV-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	
CTX-M-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/1)	0/5 (0)
CMY-2	<i>Escherichia coli</i> (1)	
MIR-1	<i>Escherichia coli</i> (1)	
-	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)(1)	

^aPositive result was achieved after increasing bacterial inoculum.

^bNo, number; MAC, MacConkey agar; and CPS, chromogenic agar (ChromID CPS®).

4.3. Artigo Científico 3. Rapid Detection of *bla*_{KPC} directly from surveillance rectal swabs by EasyQ KPC. Publicado em dezembro de 2017 no periódico Diagnostic Microbiology and Infectious Disease – DMID, volume 90, páginas 251-252.

- **Resumo/fluxograma da metodologia**



Rapid Detection of *bla*_{KPC} directly from surveillance rectal swabs by EasyQ KPC

Ana Carolina Ramos*¹

Lygia Schandert*¹

Cecilia G. Carvalhaes^{1,2}

Rafael Affini Martins¹

Paola Cappellano³

Flávia Ribeiro Machado⁴

Ana Cristina Gales¹

¹Laboratório Alerta. Division of Infectious Diseases. Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Laboratório Central. Hospital São Paulo. Division of Laboratory Medicine, Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

³Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Disciplina de Anestesiologia, Dor e Medicina Intensiva, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

* These authors contributed equally for this study.

Running title: *bla*_{KPC} detection directly from rectal swabs

Corresponding author: Ana Carolina Ramos

Rua Pedro de Toledo, 781, 6th Floor

São Paulo - SP

Brazil

ZIP code: 04039-032

Phone/Fax.: +551155715180

E-mail: anarolramos@msn.com

Abstract

The performance of EasyQ KPC assay was evaluated for the first time for *bla*_{KPC} detection directly from surveillance rectal swabs without broth enrichment. Using conventional PCR as gold standard method, EasyQ KPC and culture-based molecular tests demonstrated a sensitivity/specificity of 100%/87.3% and 83.3%/98.2%, respectively.

Text

Klebsiella pneumoniae-carbapenemase (KPC) represents the most successful mechanism of carbapenem resistance especially due to KPC-2-producing *K. pneumoniae* ST 258 clone dissemination (García-Fernández et al., 2012; Munoz-Price et al., 2013). The intestinal tract represents an important reservoir for nosocomial pathogens, including KPC-producing *K. pneumoniae*. Identification of intestinal carriers accompanied by implementation of contact precautions is essential to avoid patient-to-patient transmission. Surveillance cultures have been recommended as an important measure for identifying patients colonized by KPC-producing *K. pneumoniae* (Lolans et al., 2010). However, the sensitivity of conventional cultures is low, and patients colonized by KPC-producing *K. pneumoniae* might not be recognized (Lolans et al., 2010). Therefore, rapid, sensitive, and friendly methodologies for detecting KPC-producing isolates are of crucial importance for implementing effective control measures (Lee et al., 2016). EasyQ KPC test (bioMérieux, France) is a real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay developed for *bla*_{KPC} qualitative detection using NucliSENS platform (Spanu et al., 2012; Mosca et al., 2013). Herein, we evaluated the performance of this test compared to conventional PCR, which was considered as gold-standard method, for direct detection of *bla*_{KPC} from rectal surveillance swabs. Results from culture-based molecular method (CBM) were also compared. For CBM, the rectal swabs were streaked on a MacConkey agar plate (bioMérieux, Brazil) and a 10- μ g ertapenem disk was placed. The plate was incubated overnight at 35 \pm 2°C. Colonies of Enterobacteriaceae growing within 28 mm ertapenem disk inhibition zone were considered as potential carbapenemase producers (Lolans et al., 2010). These bacterial colonies were submitted to the Phoenix[®] system (BD Diagnostic Systems SA, Brazil) for bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing as well as for the detection of *bla*_{KPC} by conventional PCR. A total of 66 rectal E-swabs[®] (Copan, Italy) were recovered from patients hospitalized in the bone marrow transplant unit, and intensive care units in a

teaching hospital located in the city of São Paulo, Brazil, between June and August, 2012. The total nucleic acid was extracted from 400 µL of the rectal swabs specimens using NucliSENS easyMAG extraction system (bioMérieux, France) with onboard lysis, according to manufacturer's recommendations. These specimens were tested in triplicate. The amount of total nucleic acid was quantified by Nanovue™ Plus equipment (GE), and varied from 0.7 to 296 ng/µl. The *bla*_{KPC} and 16S rDNA detection were amplified from the same nucleic acid extraction by conventional PCR using specifically designed primers, as follows: KPC-F (5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3'), KPC-R (5'-TTACTGCCCGTTGAC GCCCAATCC-3'), 16S-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), and 16S-R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Monteiro et al., 2009). The 16S rDNA-encoding gene was detected in all isolates, showing a successful DNA extraction procedure. Detection of *bla*_{KPC} was achieved within 2 hours by real-time PCR NucliSENS EasyQ in 13 of 66 (19.7%) specimens, while conventional PCR detected *bla*_{KPC} in 6 of 66 (9.1%) specimens after 3 hours. A single isolate (yielding 38 ng/µl of total DNA quantification) was negative for *bla*_{KPC} by PCR, but positive by EasyQ and CBM, suggesting a greater sensitivity of EasyQ KPC. In the same way, the majority of remaining samples that showed positive results by EasyQ KPC but negative by PCR or CBM (4/6) had less than a 100 ng/µl of DNA quantification (Table 1). In accordance to our findings, a previous study observed high sensitivity to detect KPC-producing Enterobacteriaceae by EasyQ KPC assay (Spanu *et al.*, 2012). In contrast, the medical chart review as well as further culture results from our patients did not demonstrate KPC-producing isolate colonization or infection. In the present study, the EasyQ KPC sensitivity and specificity were 100% and 87.3%, respectively. Interestingly, the culture based method followed by confirmatory *bla*_{KPC} detection showed lower sensitivity (83.3%) but greater specificity (98.2%) than EasyQ KPC. Five invalid results (7.6%) were observed in our study by EasyQ KPC. All these results were negative by reference method and could not be clarified by retesting these specimens. As described by manufacturer's instructions, invalid results might occur due to lack of internal control detection or amplification by EasyQ KPC. McEwan and colleagues have also observed false positive (22.2%) and invalid results (5.1%) when bacterial colonies were tested by EasyQ KPC (McEwan et al., 2013). Since CBM requires extra time for incubation period, and conventional PCR can be labor intensive, EasyQ KPC demonstrated to be a rapid and feasible assay for detection of patients colonized by KPC-producing Enterobacteriaceae.

Despite the low number of evaluated swabs, our study detected *bla*_{KPC} directly from rectal swabs without broth enrichment step, diminishing the turnaround time for test results. In this manner, contact precautions for patients could have been discontinued earlier. Discontinuing contact precautions usually result in considerable hospital savings (Otter *et al.*, 2017). However, this assay is specifically designed for *bla*_{KPC} detection, restricting its usefulness to epidemiological scenarios, where KPC is the most prevalent carbapenemase.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mariana Vitule (bioMérieux, Brazil) for supplying NucliSENS EasyQ KPC kits, equipment and training support. We also thank the clinical microbiology laboratory staff for performing the routine surveillance results.

TRANSPARENCY DECLARATIONS

A.C.G. has recently received research funding and/or consultation fees from Bayer, MSD and Pfizer. Other authors have nothing to declare.

REFERENCES

1. García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. 2012. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(4):2143-5.
2. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. 2016. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front. Microbiol.* 13; 7: 895. Review.
3. Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. 2010. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J. Clin. Microbiol.* 48(3):836-841.
4. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. 2009. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:333–334.

5. McEwan AS, Derome A, Meunier D, Burns PJ, Woodford N, Dodgson AR. 2013. Evaluation of the NucliSENS EasyQ KPC assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 51 (6):1948-1950.
6. Mosca A., Miragliotta L, Del Prete R, Tzakis G, Dalfino L, Bruno F, Pagani L, Migliavacca R, Piazza A, Miragliotta G. 2013. Rapid and sensitive detection of *bla*_{KPC} gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. Springerplus. 2(1):31-35.
7. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect. Dis. 13(9):785-796.
8. Otter JA, Burgess P, Davies F, Mookerjee S, Singleton J, Gilchrist M, Parsons D, Brannigan ET, Robotham J, Holmes AH. 2017. Counting the cost of an outbreak of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: an economic evaluation from a hospital perspective. Clin. Microbiol. Infect. 23(3):188-196.
9. Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, Palucci I, Tumbarello M, Sanguinetti M, Rossolini GM. 2012. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*bla*_{KPC}). J. Clin. Microbiol. 50(8):2783-2785.

Table 1. *bla*_{KPC} detection directly from rectal swabs by EasyQ KPC, conventional PCR and culture-based molecular test (CBM) and total DNA quantification.

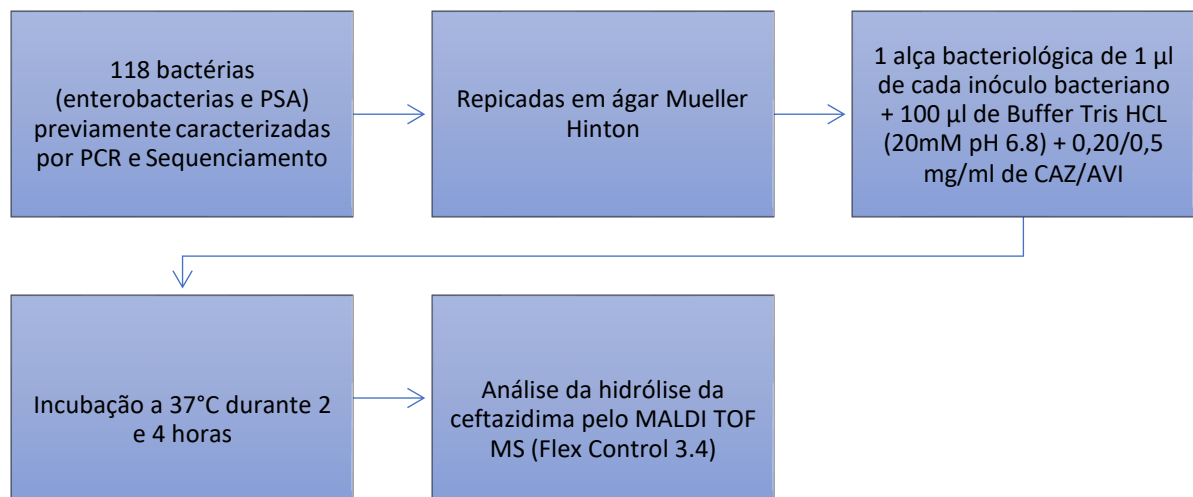
Strain	EasyQ KPC	<i>bla</i> _{KPC} PCR	CBM	DNA quantification (ng/μl)
1	-	-	-	0.7
2	-	-	-	1.8
3	+	-	-	2
4	-	-	-	2.01
5	+	+	-	2.9
6	-	-	-	3.5
7	-	-	-	4
8	-	-	-	4.1
9	-	-	-	4.5
10	-	-	-	5.2
11	-	-	-	6.1
12	-	-	-	6.2
13	-	-	-	7.2
14	-	-	-	7.3
15	-	-	-	8.4
16	-	-	-	8.5
17	+	-	-	8.6
18	-	-	-	8.6
19	+	-	-	8.7
20	-	-	-	10.4
21	+	+	+	10.7
22	-	-	-	10.7
23	-	-	-	11.2
24	-	-	-	11.7
25	-	-	-	12.4
26	-	-	-	12.4
27	-	-	-	13.8
28	-	-	-	14.4
29	-	-	-	14.7
30	-	-	-	15
31	-	-	-	15.7
32	-	-	-	15.7
33	#	-	-	26
34	#	-	-	27.5
35	-	-	-	30
36	+	-	-	36

37	+	-	+	38
38	-	-	-	39.5
39	-	-	-	43.5
40	-	-	-	48
41	-	-	-	55.5
42	-	-	-	68.8
43	-	-	-	73
44	#	-	-	76
45	-	-	-	83
46	#	-	-	84.5
47	+	-	-	92.5
48	-	-	-	95.5
49	-	-	-	99
50	+	+	+	105
51	-	-	-	109.5
52	-	-	-	110.5
53	-	-	-	111
54	-	-	-	114.5
55	-	-	-	116.5
56	-	-	-	116.5
57	-	-	-	130
58	-	-	-	131.5
59	+	-	-	138.5
60	+	+	+	139.5
61	+	+	+	140
62	-	-	-	141.5
63	-	-	-	150
64	#	-	-	156
65	-	-	-	216
66	+	+	+	296

#, Invalid results

4.4. Artigo Científico 4. Rapid detection of ceftazidime/avibactam resistance by MALDI-TOF MS. Publicado em setembro de 2018 no periódico The Journal of Antimicrobial Chemother – JAC, volume 73, páginas 2579-2582.

- Resumo/fluxograma da metodologia



Rapid detection of ceftazidime/avibactam resistance by MALDI-TOF MS

Cecilia Godoy Carvalhaes^{1*}, Ana Carolina Ramos², Lilian Caroline Gonçalves de Oliveira³,
Maria Aparecida Julinao³, Ana Cristina Gales².

¹ Microbiology Section, Division of Laboratory Medicine, Internal Medicine Department,
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo - SP, Brazil.

² Alerta Laboratory, Division of Infectious Diseases, Internal Medicine Department,
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo - SP, Brazil.

³ Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo - SP,
Brazil.

Short running title: CAZ-AVI resistance by MALDI-TOF.

*Corresponding author.

Current Address: Microbiology Section, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Rua
Napoleão de Barros, 715, 2nd floor, Vila Clementino, 04039-032, São Paulo - SP, Brazil.

Phone/Fax.: +55 11 55764045. E-mail: cicacarvalhaes@gmail.com.

Sir,

Over the last decades, MDR Gram-negative rods have emerged an important etiologic agents of nosocomial-acquired infections worldwide. The combination of β -lactam and new β -lactamases inhibitors has become an option for treating those infections with fewer side effects than old compounds as polymyxins. Avibactam is a diazabicyclooctane β -lactamase inhibitor that demonstrates excellent inhibitory properties against class A, C, some class D β -lactamases (CHDL; basically OXA-48). In contrast, it does not possess activity against most metallo- β -lactamase (M β L) producing isolates.¹

Recently, ceftazidime/avibactam was approved for treatment of patients with complicated intra-abdominal infections, complicated urinary tract infections, and hospital-acquired pneumonia.² To reduce the development of drug-resistant bacteria and preserve the susceptibility of ceftazidime/avibactam, it should be used only to treat infections that are proven or strongly suspected to be caused by susceptible bacteria. However, susceptibility testing of new drugs in routine labs is restricted to disk and/or gradient diffusion methodologies until inclusion on commercial panels of susceptibility automated systems. According to a recent evaluation, ceftazidime/avibactam susceptibility testing using E-test and disc diffusion methods presented very major and major errors, respectively, compared to broth microdilution and those tests should be interpreted cautiously in clinical practice.³ MALDI-TOF MS has been applied for detection of carbapenems hydrolysis.⁴ Since susceptibility testing to ceftazidime/avibactam might be tricky, herein, we evaluated the performance of MALDI-TOF MS for rapid detection of ceftazidime/avibactam resistance by testing against 118 previous molecular characterized bacterial clinical isolates, including a range of different β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* (Table 1).^{5,6} In addition, 21 non-carbapenemase producing isolates were also studied. Species identification was confirmed by MALDI-TOF MS (Biotyper 3.3 version, Bremen, Germany).

The MALDI-TOF MS hydrolysis assay was performed as previously reported with a few modifications.⁷ The isolates were grown overnight on Mueller-Hinton agar plates (Oxoid™, Basingstoke, UK) at 37°C. One microliter loop of each organism was inoculated into a 100 μ L of adjusted solution [20 mM Tris-HCl pH 6.8] with ceftazidime/avibactam (0.20 and 0.05 g/L, respectively; Allergan, Pittsburgh USA). The reaction tubes were incubated at 37°C during 2

h. After the incubation period, each sample tube was centrifuged at 13,000 rpm for 2 minutes. One microliter of the supernatant was spotted onto a MALDI target plate, followed by addition of 1 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (10 g/L; diluted into 49.9% water, 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid). Mass spectrum was obtained using a Bruker Daltonics Microflex LT instrument (Bremen, Germany), using the Flex Control 3.4 software in the m/z range of 400-600 Da. Avibactam restored the ceftazidime activity when the ceftazidime intact molecule mass peak ($[M+H]^+$ 547.6 Da) and its pyridine-eliminated molecule mass peak (468.7 Da) were present. In contrast, a resistant phenotype was detected if a mass peak correspondent to pyridine-eliminated hydrolyzed form was observed (442.6 Da).⁷ All isolates were submitted to ceftazidime/avibactam agar dilution susceptibility testing and confirmed by microdilution following EUCAST guideline.⁸ In addition, PCR and sequencing experiments were repeated and confirmed the presence of β -lactamases-encoding genes in isolates that showed discordant results (unexpected profile according to β -lactamase content).^{6,7}

In this study, MALDI-TOF showed good results for detection of ceftazidime/avibactam activity compared to those of susceptibility testing (94% agreement; 111/118) and molecular methods (97% agreement; 114/118) (Table 1). Ceftazidime/avibactam was active against all class A, class C, and class D β -lactamase-producing isolates tested by MALDI-TOF MS assay. However, both OXA-72-producing isolates yielded high ceftazidime-avibactam MICs (>64 mg/L), showing that resistance may be caused by other mechanisms such as permeability. As expected, the majority of MBL-producing isolates (86.2%) were not inhibited by avibactam, since the ceftazidime's intact molecule disappeared, and the pyridine-eliminated hydrolyzed form was observed. Four IMP-1-producing isolates, two *Proteus mirabilis* and two *Klebsiella pneumoniae*, presented the ceftazidime intact molecule mass peak detectable. When the MALDI-TOF assay were extended to 4-hour incubation the hydrolysis profile was detected in all isolates. Thus, leading to concordance between MALDI-TOF results and ceftazidime/avibactam susceptibility testing by broth microdilution. In accordance to our results, previous studies have observed ceftazidime/avibactam *in vivo* activity against New Delhi Metallo (NDM) β -lactamase-producing Enterobacteriaceae.^{9,10} Our results also suggest that properly clinical usefulness of ceftazidime/avibactam to treat infections caused by metallo- β -lactamase should be better studied.

Rapid diagnostic tests, which provide final results within hours, can guide clinicians to correctly prescribe antibiotics. MALDI-TOF has become a valuable tool for bacterial identification and has been used for rapid detection of carbapenemase activity in clinical isolates; even from positive blood culture vials.⁵ In this study, we applied a ceftazidime/avibactam assay for rapid detection of bacterial resistance to this combination.

Since ceftazidime/avibactam has been used for treating infections caused by MDR pathogens, which have few or no therapeutic alternatives, the early and accurate detection of ceftazidime/avibactam activity *in vitro* against those isolates and occurrence of emerging resistance during treatment is crucial to predict clinical success and guide antimicrobial therapy.^{11,12} According to our findings, in addition to rapid microorganism's identification, MALDI-TOF MS showed to be an excellent tool for screening ceftazidime/avibactam activity against Gram-negative isolates. MALDI-TOF MS could be easily applied by routine labs to help clinicians to correctly prescribe ceftazidime/avibactam, before susceptibility testing results become available. However, if an isolate shows both peaks corresponding to intact and hydrolyzed molecules, an extended incubation period of time could be tested, or a non-interpretable result could be reported advising to wait for antimicrobial susceptibility results.

Funding

The study was carried out as part of our routine work. A. C. G. is a researcher from the National Council for Science and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil (Process number: 307816/2009-5). M. A. J. is a researcher from São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant #12/50191-4).

Transparency declarations

A.C.G. and C.G.C have recently received research funding and/or consultation fees from MSD and Pfizer. All other authors: none to declare.

Acknowledgments

We thank Ana Clara Narciso Barbosa for her valuable support during the complementary tests.

References

1. King DT, King AM, Lal SM, *et al.* Molecular mechanism of avibactam-mediated beta-lactamase inhibition. *ACS Infect. Dis.* 2015; 1: 175-184.
2. Zavicefta™ (ceftazidime/avibactam); Summary of opinion. European Medicines Agency. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/004027/WC500205395.pdf
3. Shields RK, Clancy CJ, Pasculle AW, *et al.* Verification of Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam Susceptibility Testing Methods against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2018;56.
4. Carvalhaes CG, Cayô R, Visconde MF, *et al.* Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:2132-6.
5. Ramos AC, Cayô R, Carvalhaes CG, *et al.* Dissemination of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Clones Carrying a Novel Integron-Borne *bla* (IMP-1) in a Tertiary Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62.
6. Carvalhaes CG, da Silva AC, Streling AP, *et al.* Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J Med Microbiol.* 2015;64:946-7.
7. Sparbier K, Schubert S, Weller U, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:927-37.
8. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>
9. Monogue ML, Abbo LM, Rosa R, *et al.* In Vitro Discordance with In Vivo Activity: Humanized Exposures of Ceftazidime/avibactam, Aztreonam, and Tigecycline Alone and in Combination against New Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Lung Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61.
10. MacVane SH, Crandon JL, Nichols WW, *et al.* Unexpected in vivo activity of ceftazidime alone and in combination with avibactam against New Delhi metallo β -lactamase-

producing Enterobacteriaceae in a murine thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58: 7007–7009.

11. Shields RK, Chen L, Cheng S, *et al.* Emergence of ceftazidime/avibactam resistance due to plasmid-borne *bla*KPC-3 mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61.
12. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, Stump S, Khan S, McConville TH, Mehta M, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Successive Emergence of Ceftazidime/Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in *bla*(KPC-2)-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62.
13. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, *et al.* Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65: 249-51.

Table 1. Molecular characterization of bacterial isolates evaluated by MALDI-TOF MS ceftazidime/avibactam hydrolysis assay.

Microorganism (n)	β -lactam resistance determinant	β -lactamase Molecular Class (Ambler)	Ceftazidime/avibactam hydrolyze MALDI assay	Ceftazidime/avibactam MIC range (mg/L)
<i>K. pneumoniae</i> (44), <i>S. marcescens</i> (4), <i>Citrobacter</i> spp. (3), <i>E. coli</i> (2), <i>Rauoltella planticola</i> (1), <i>K. oxytoca</i> (1), <i>E. cloacae</i> complex (1), <i>P.</i> <i>mirabilis</i> (1), <i>M. morgannii</i> (1), <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>S. marcescens</i> (1) <i>S. marcescens</i> (1)	KPC-2 BKC-1 GES-5 GES-16 SME-1	Class A - carbapenemase	Negative Negative Negative Negative Negative	<0.03 - 2 0.5 0.06 4 0.06
<i>K. pneumoniae</i> (1), <i>E. coli</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (4) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>E. cloacae</i> complex (1)	CTX-M-16 CTX-M-8 CTX-M- 2/ Δ OmpK36* SHV-11/ Δ OmpK36* TEM-11 / Δ OmpK36* GES-1 PER-2	Class A - ESBL	Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative	0.125-0.25 0.25 0.06 <0.03 - 2 <0.03 16 2
<i>E. cloacae</i> complex (1)	KPC-2/NDM-1	Class A & B carbapenemase	Positive	>64
<i>P. mirabilis</i> (6), <i>K. pneumoniae</i> (2), <i>E.</i> <i>cloacae</i> complex (1), <i>S. marcescens</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (6), <i>E. cloacae</i> complex (1), <i>E. hormaechei</i> (1), <i>C. freundii</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (7) <i>E. cloacae</i> complex (1), <i>P. aeruginosa</i> (1)	IMP-1 IMP-18 NDM-1 SPM-1 VIM-1	Class B - carbapenemase	Positive (6); Negative (4) Positive Positive Positive Positive	64 - >64 >64 >64 >64 >64
<i>E. coli</i> (2) <i>E. coli</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1)	MIR-1 CMY-2 FOX-5	Class C - cephalosporinase	Negative Negative Negative	0.125-0.25 0.25 <0.03
<i>A. baumannii</i> (2) <i>A. baumannii</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1)	OXA-72 OXA-58 OXA-48	Class D - carbapenemase	Negative Negative Negative	>64 1 1
<i>Salmonella</i> spp. (1) <i>E. coli</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	- - - - -	Multi-susceptible	Negative	0.5 0.5 0.25 0.25 2

Positive result indicates ceftazidime hydrolysis mass spectrometry profile detected; **Negative** result indicates ceftazidime intact molecule mass spectrometry profile observed.

* The outer membrane proteins studies were performed as previous described.¹³

5. DISCUSSÃO

A detecção precoce do perfil de resistência aos antimicrobianos, bem como a detecção da produção de carbapenemases em bactérias gram-negativas de pacientes com infecções hospitalares é uma medida necessária para auxiliar na adequação da terapia antimicrobiana, controle de disseminação de microrganismos multirresistentes, diminuição dos índices mortalidade e redução dos custos hospitalares através da diminuição do tempo de internação (Otter *et al.*, 2017). A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antimicrobiano é essencial para direcionar a terapia clínica de pacientes com infecções bacterianas. No entanto, os métodos fenotípicos usados rotineiramente requerem o mínimo de 40 horas para crescimento bacteriano e determinação da CIM por testes automatizados, fita graduada e/ou técnicas dilucionais, sendo este último considerado o método padrão ouro. Entretanto, testes como a automatização podem falhar para determinar a CIM aos carbapenêmicos, principalmente em enterobactérias (Carvalhoes *et al.*, 2014).

Em 2009, após o primeiro relato da detecção de cepas produtoras de KPC no Brasil (Monteiro *et al.*, 2009), o teste de Hodge modificado passou a ser recomendado pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) para a detecção de carbapenemases em enterobactérias resistentes a pelo menos um carbapenênico. No entanto, resultados falsos positivos começaram a ser observados, principalmente pela produção de ES β L e/ou hiperprodução de AmpC associado com alteração de porinas (Pasteran *et al.*, 2009; Carvalhoes *et al.*, 2010), diminuindo dessa forma a confiabilidade e sensibilidade do teste. Além disso, alguns estudos demonstraram baixa sensibilidade desta metodologia para detecção de isolados produtores de NDM (Girlich *et al.*, 2012). Sendo assim, o teste de Hodge modificado deixou de ser preconizado para a detecção da produção de carbapenemases nos laboratórios clínicos (CLSI, 2018).

Os testes fenotípicos e/ou moleculares são recomendados pelo EUCAST/BrCAST, 2017 para a detecção de carbapenemases em isolados bacterianos com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos (BrCAST, 2017). Estudos observaram que alguns dos testes sugeridos, como por exemplo, MALDI TOF MS, Carba NP e os imunocromatográficos poderiam ser realizados diretamente de amostras clínicas, como por exemplo, urinas e hemoculturas (Carvalhoes *et al.*, 2014; Oviaño *et al.*, 2017; Riccobono *et al.*, 2018; Giordano *et al.*, 2019; Seco *et al.*, 2019). Embora o **artigo científico 3** seja um dos nossos últimos estudos publicados, este é o único no

qual avaliamos a detecção de *bla*_{KPC-2} diretamente de swabs retais sem a necessidade de incubação através do teste molecular EasyQ KPC (Ramos *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstraram uma sensibilidade de 100% quando comparado com o PCR convencional. A detecção e consequente análise dos resultados foram possíveis após o período de 2 horas. Estudos anteriores observaram uma especificidade superior (99%) quando comparado aos nossos resultados (87,3%), entretanto a comparação do teste foi realizada com um método fenotípico e após crescimento bacteriano em uma placa de ChromID ESβL (McEwan *et al.*, 2013). Apesar do baixo número de amostras testadas, resultados falso positivos e inválidos, este ensaio baseado na tecnologia Real-Time Acid Nucleic Sequence-Based amplification (NASBA) demonstrou-se uma ferramenta rápida para a detecção de *bla*_{KPC} diretamente de swabs retais (Ramos *et al.*, 2017). Contudo essa metodologia é limitada ao equipamento, pois o mesmo é um requisito mínimo para que a amplificação e detecção em tempo real do gene a ser pesquisado ocorra efetivamente. Alguns laboratórios de rotina utilizam o EasyQ-PCR para detecção de outros genes de interesse clínico. Sendo assim, seria necessário apenas a aquisição do kit para detecção de *bla*_{KPC} diretamente de swabs retais, por exemplo.

Adicionalmente, os testes imunocromatográficos K-SeT e NG-Test demonstraram uma alta sensibilidade (100% e 98,4%, respectivamente) e especificidade (98,9% e 100%, respectivamente) para a detecção de carbapenemases diretamente de hemoculturas (Riccobono *et al.*, 2018; Giordano *et al.*, 2019). No **artigo científico 2** o método imunocromatográfico foi avaliado após o crescimento e isolamento das colônias bacterianas com o objetivo de determinar sua acurácia na detecção de outras variantes da enzima KPC e avaliar a possível influência dos meios de cultura no método. Além disso, poucos estudos anteriores haviam sido reportados, e apenas as variantes de KPC-2, KPC-3, KPC-4 e KPC-9 haviam sido avaliadas pelo KPC K-SeT (Glupczynski *et al.*, 2016; Meunier *et al.*, 2016). Dados do nosso estudo demonstraram que o teste imunocromatográfico KPC K-SeT foi capaz de detectar a maioria das variantes de KPC testadas (KPC-2, KPC-3, KPC-4 e KPC-11) em até 3 minutos (**artigo científico 2**). Entretanto para a detecção das variantes KPC-6 e KPC-8 foi necessário o aumento do inóculo bacteriano de uma para cinco colônias bacterianas. Baseando-se no fato de que os isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtores de KPC-6 e KPC-8, respectivamente foram sensíveis aos carbapenêmicos, sugerimos que a expressão destas enzimas poderia estar diminuída, ainda que o imunocromatográfico seja um teste de alta sensibilidade para a detecção de antígenos (Ramos

et al., 2017). Diferentes estudos avaliaram o K-SeT para a detecção de carbapenemases, no qual este não está mais restrito a detecção de variantes de KPC, mas com uma alta sensibilidade e especificidade para detecção de enzimas do grupo da OXA-48, OXA-163, VIM-like e NDM-like (Pasteran *et al.*, 2013; Glupczynski *et al.*, 2019). Além disso, um único teste pode detectar até 4 enzimas ao mesmo tempo em menos de 15 minutos, entretanto o custo deste ainda é alto (€15) para a aquisição pelos laboratórios clínicos de rotina brasileiros.

O EasyQ KPC e o K-SeT são testes rápidos que permitem a detecção de carbapenemases diretamente de isolados clínicos. Entretanto a aplicabilidade destes testes limita-se a detecção de genes/enzimas específicas, como por exemplo, a *bla*_{KPC-2}/KPC-2. Além disso, resultados negativos poderiam ser observados para isolados bacterianos não produtores de KPC-2, bem como para isolados produtores de outros genes/carbapenemases diferentes dos pesquisados pelo EasyQ/K-SeT. Embora a detecção de um gene específico possa não caracterizar um determinado fenótipo de resistência pela ausência ou diminuição da expressão da proteína transcrita, a avaliação direcionada a um determinado gene/enzima poderia ser indicada à laboratórios clínicos com surtos de enterobactérias produtoras de KPC-2, por exemplo, ou até mesmo aqueles com alto índice de positividade para apenas uma ou um conjunto específico de carbapenemases. Além disso, estas metodologias poderiam ser utilizadas como uma ferramenta eficaz para o controle de disseminação de genes de resistência em ambientes hospitalares.

Outros testes fenotípicos para a detecção de isolados bacterianos produtores de carbapenemases, como por exemplo, a técnica de MALDI TOF MS demonstrou alta sensibilidade e especificidade para a detecção da hidrólise de diferentes carbapenêmicos (Sparbier *et al.*, 2012). Além dos testes imunocromatográficos e do EasyQ KPC, a técnica de MALDI TOF MS também é capaz de avaliar a produção de carbapenemases pela análise da hidrólise do carbapenêmico diretamente de hemoculturas, bem como de colônias bacterianas (Carvalhoes *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que a hidrólise do ertapenem diretamente de hemoculturas foi observada em 100% dos isolados produtores de KPC-2 e SPM-1 (Carvalhoes *et al.*, 2014). Entretanto a detecção da hidrólise em isolados de *Acinetobacter* spp. produtores de carbapenemases do grupo D foi sugerida apenas diretamente de colônias bacterianas e com o tempo de incubação estendido para 4 horas (Carvalhoes *et al.*, 2014). Na maioria dos casos, a detecção da hidrólise do ertapenem em bactérias gram-negativas produtoras das enzimas KPC-2, IMP-1 e SPM-1, podem ser detectadas pelo MALDI TOF MS em no mínimo 15 minutos de incubação a 37°C (Carvalhoes *et al.*, 2015).

Recentemente, nossos resultados observaram que o MALDI TOF MS também poderia

ser utilizado para avaliar a atividade de ceftazidima/avibactam, principalmente em isolados bacterianos produtores de carbapenemases (**artigo científico 4**). Estudos demonstraram que a combinação de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases representa uma importante opção terapêutica, principalmente em pacientes infectados com bactérias produtoras de carbapenemases. O avibactam demonstrou-se um excelente inibidor de β -lactamases de classe A, C e D, entretanto não possui atividade contra as carbapenemases de classe B (King *et al.*, 2015). Nossos resultados (**artigo científico 4**) demonstraram uma alta capacidade na detecção da atividade de CAZ/AVI quando comparado com os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (94%) e com os métodos moleculares (97%) (Carvalhoes *et al.*, 2018). Embora a análise dos isolados tenha sido avaliada apenas após crescimento bacteriano em placas de Mueller-Hinton, nossos resultados iniciais (**artigo científico 1**) demonstraram que o ensaio de hidrólise dos antimicrobianos pelo MALDI TOF MS não é influenciada após crescimento bacteriano em ágar cromogênico ou ágar sangue. Sendo assim, estes também poderiam ser utilizados para o teste, ao contrário do ágar MacConkey (Ramos *et al.*, 2016). Os sais biliares e a lactose presentes no ágar MacConkey poderiam ser os principais interferentes do teste de espectrometria de massa. Anderson e colaboradores (2012) observaram resultados semelhantes, nos quais meios de cultura direcionados para crescimento de *Pseudomonas* spp., por exemplo, influenciaram a análise pelo espectrômetro de massa devido a presença de proteínas externas ou condições de crescimento (Anderson *et al.*, 2012). Ao contrário do MALDI TOF MS, Blue Carba e Carba NP, o ágar MacConkey não interferiu na detecção de diferentes variantes da enzima KPC pelo imunocromatográfico K-SeT (Ramos *et al.*, 2017; **artigo científico 2**).

A escolha correta para o melhor teste diagnóstico deve ser baseada na estrutura, equipamentos previamente adquiridos, custos, epidemiologia, fluxo de amostras recebidas e profissionais qualificados de cada hospital. Os testes fenotípicos e moleculares desenvolvidos para a detecção de carbapenemases são compostos por vantagens e desvantagens. Sendo assim cada laboratório clínico deve avaliar o teste que melhor se adapta a rotina do seu laboratório, baseando-se inicialmente nos estudos publicados que demonstram, principalmente, importantes índices de sensibilidade e especificidade. A seguir, 3 cenários foram sugeridos para a implementação de testes de detecção de carbapenemases em laboratórios de microbiologia clínica, fenotípicos e/ou moleculares, considerando-se as particularidades de cada laboratório. Embora testes específicos sejam sugeridos para cada cenário, estes não estão limitados à apenas um perfil laboratorial.

Cenário 1 – Laboratório clínico de grande porte. Em um laboratório clínico de grande porte, por exemplo, que utiliza equipamentos de MALDI TOF MS em sua rotina laboratorial para a identificação de patógenos bacterianos, o mesmo equipamento pode ser utilizado para avaliar a atividade das carbapenemases pela detecção da hidrólise aos carbapenêmicos. Embora o equipamento e a manutenção do mesmo demandem um alto investimento financeiro, os insumos utilizados para cada teste são de baixo custo. Além disso, carbapenemases como KPC-2 e IMP-1 podem ser detectadas em até 15 minutos de incubação e a detecção da hidrólise aos carbapenêmicos observada no software do equipamento em menos de 2 minutos. A análise da produção de carbapenemases é comumente avaliada pela hidrólise do ertapenem, imipenem ou meropenem, entretanto o espectro proteico da molécula do ertapenem é melhor definido e interpretado. A avaliação dos picos dos carbapenêmicos, por exemplo, presentes ou ausentes nos espectros proteicos somente poderia ser interpretada por um profissional capacitado. Contudo, atualmente há disponível software específico para a interpretação dos espectros dos antimicrobianos, o qual pode ser adquirido pelo laboratório clínico. A reorganização da rotina laboratorial para utilização dos equipamentos de MALDI TOF MS para a identificação bacteriana juntamente com a detecção da hidrólise aos antimicrobianos ainda é considerado um desafio para alguns laboratórios de grande porte. O fluxo de recebimento, consequente processamento e identificação das amostras para a avaliação de agentes bacterianos, na maioria das vezes é extremamente alto, o que poderia impossibilitar a utilização do equipamento diariamente para outros testes, como a avaliação da hidrólise aos carbapenêmicos. Entretanto, laboratórios de grande porte que não possuem o equipamento de espectrometria de massa ou não possuem flexibilidade na utilização do mesmo para outros testes fenotípicos, poderiam optar pelos testes colorimétricos Blue Carba ou Carba NP. Devido ao alto número de isolados bacterianos e altos índices da diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos, os laboratórios de grande porte poderiam utilizar placas de microtitulação de 96 poços ao invés de microtubos, permitindo a análise de um elevado número de suspensões de inóculos bacterianos ou amostras clínicas ao mesmo tempo.

Cenário 2 – Laboratório clínico de pequeno porte. Testes colorimétricos rápidos como o Blue Carba e o Carba NP são ferramentas eficazes para o rastreamento de isolados bacterianos produtores de carbapenemases, principalmente para laboratórios clínicos que ainda não possuem a técnica de MALDI TOF MS ou são de pequeno porte. Apesar do Blue Carba e

o Carba NP serem testes influenciados pelo crescimento bacteriano em MacConkey, a mudança de pH quando há a produção de carbapenemases por uma bactéria gram-negativa e consequentemente a mudança de cor do teste pode ser inicialmente mais rápida quando interpretada pelo Blue Carba. Entretanto em outros casos, o Carba NP pode demonstrar melhor definição da mudança de cor de vermelho para amarelo, principalmente em inóculos bacterianos adquiridos diretamente de amostras clínicas como a hemocultura. A utilização do B-PERII como um reagente de extração de proteína bacteriana, auxilia no resultado do teste, no qual as carbapenemases são facilmente expostas para a hidrólise do carbapenêmico. Embora este reagente possa ser produzido *in house*, o seu custo pode ser alto para aquisição nos laboratórios clínicos (custo de aproximadamente R\$ 1.500,00 por 250 mL). Tamma e colaboradores (2017) demonstraram que o Carba NP é considerado mais caro quando comparado com outros testes fenotípicos para a detecção de carbapenemases, como por exemplo, o mCIM (Tamma *et al.*, 2017), bem como os testes de disco combinado A detecção da produção de carbapenemases diretamente de hemoculturas é possível em ambos os testes, entretanto, o Carba NP demonstrou uma concordância superior para os resultados positivos e negativos (100%) em relação ao Blue Carba (92,8% e 41%, respectivamente) (Seco *et al.*, 2019). Contudo, a detecção de carbapenemases com fraca capacidade hidrolítica, principalmente em isolados de *A. baumannii* ainda é considerado um desafio. O aumento das CIMs aos carbapenêmicos nestes isolados pode também ser atribuído a outros mecanismos como alteração de porinas e/ou aumento da expressão de bombas de efluxo (Tamma *et al.*, 2017). O Carba NP demonstrou uma sensibilidade de 12% para detectar enzimas do grupo das OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-58-like, and OXA-143-like em isolados de *A. baumannii*, entretanto, após modificação deste teste e consequente desenvolvimento do CarbAcineto, uma sensibilidade de 95% foi observada para a detecção destas carbapenemases (Dortet *et al.*, 2014). A maioria dos testes fenotípicos não é capaz de detectar com rapidez a produção de carbapenemases, principalmente diretamente de amostras clínicas. Contudo estes testes bioquímicos colorimétricos podem ser subjetivos e de difícil análise, pois a interpretação do resultado é realizada pela mudança de cor do teste, que em alguns casos não é muito bem definida.

Pierce e colaboradores, 2017 demonstraram uma alta reprodutibilidade do mCIM para a detecção da produção de carbapenemases em enterobactérias proveniente de 9 centros clínicos

diferentes (Pierce *et al.*, 2017). A média da sensibilidade e especificidade observada foi de 97% e 99%, respectivamente (Pierce *et al.*, 2017). Este teste representa uma alternativa de fácil execução e baixo custo para a detecção de carbapenemases em laboratórios clínicos, entretanto pode requerer no mínimo 40 horas para o crescimento bacteriano, processamento e então leitura do teste (Walsh *et al.*, 2002; Girlich *et al.*, 2013; Tamma *et al.*, 2017). Contudo, adaptações para diminuir o tempo de leitura do teste foram validados por Caméléna e colaboradores (2018). Após o crescimento das colônias bacterianas, a detecção da atividade da carbapenemase foi observada em apenas 8 horas pelo CIMplus diferentemente do mCIM, no qual a leitura do teste é comumente realizada após 20 horas de incubação (Caméléna *et al.*, 2018). O teste demonstrou uma sensibilidade de 95,7% e uma especificidade de 94,4% para a detecção de carbapenemases de classe A, B e D em enterobactérias (Caméléna *et al.*, 2018).

Cenário 3. Laboratório clínico com alto índices da produção de carbapenemases específicas. Apesar de requerer um investimento financeiro significativo quando comparado com os testes fenotípicos (exceção do equipamento de MALDI TOF MS), os testes moleculares podem ser utilizados como uma ferramenta de alta sensibilidade e especificidade para detecção de genes codificadores de carbapenemases após triagem do perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos. A escolha da utilização de um método molecular, dependerá se um determinado laboratório clínico adquiriu previamente o equipamento e tem observado em sua rotina diária altos índices de um determinado gene codificador de carbapenemase. A técnica de PCR convencional está cada vez mais frequente nos laboratórios clínicos brasileiros para a detecção de genes de resistência, como por exemplo de *bla_{KPC-2}*. Entretanto, os testes de PCR em tempo real também são metodologias rápidas e com alta sensibilidade para a detecção destes genes codificadores de carbapenemases. Smith e colaboradores, 2016 demonstraram uma sensibilidade e especificidade de 100% para a detecção de carbapenemases de classe A, B e D provenientes de enterobactérias usando o teste molecular em tempo real X-pert[®] Carba-R. O método molecular em tempo real é capaz de detectar até 5 genes de resistência aos carbapenêmicos ao mesmo tempo (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, and *bla_{IMP-1}*). Após crescimento bacteriano, a leitura e interpretação do teste foi realizada em aproximadamente 55 minutos (Smith *et al.*, 2016). Além disso este teste molecular demonstrou uma boa sensibilidade (96,6%) e especificidade (98,6%) para a detecção de carbapenemases diretamente de swabs retais (Tato *et al.*, 2016).

Os testes moleculares em tempo real representam potenciais metodologias para a detecção de genes codificadores de carbapenemases, e quando comparados com os testes de PCR convencional ou multiplex, demonstram maior sensibilidade e rapidez para a avaliação do resultado do teste. Contudo, estes podem falhar na detecção de variantes clinicamente importantes, os quais estas podem não ser reconhecidas pelos primers que compõem uma determinada plataforma comercial, por exemplo (Moore *et al.*, 2017).

O EasyQ KPC (**Artigo científico 3**) demonstrou-se um teste rápido (2 h) para a detecção de *bla_{KPC}* diretamente de swabs retais de vigilância sem a necessidade de incubação prévia e com uma sensibilidade e especificidade de 100 % e 87,3%, respectivamente quando comparado com o PCR convencional (Ramos *et al.*, 2017). Entretanto demonstrou limitações importantes quando comparado com outros testes moleculares em tempo real para a detecção de genes codificadores de carbapenemases. A plataforma comercial do teste é limitada em detectar apenas *bla_{KPC}* e o teste requer o dobro de tempo para a finalização do teste quando comparado com o X-pert[®] Carba-R, por exemplo. Além disso, assim como demonstrado por McEwan e colaboradores 2013, observamos em nosso estudo 5 resultados inválidos (7,6%) (McEwan *et al.*, 2013 2013; Ramos *et al.*, 2017).

O teste imunocromatográfico K-SeT também representa uma ótima opção para os laboratórios clínicos com um alto índice de bactérias gram-negativas produtoras de uma ou mais carbapenemases específicas. O teste é capaz de detectar até 4 carbapenemases ao mesmo tempo, entretanto sugerimos que a aquisição da melhor versão do imunocromatográfico seja baseado nas características epidemiológicas de cada hospital. Embora o teste seja rápido (<15 minutos) e demonstre uma alta sensibilidade e especificidade para a detecção de carbapenemases a partir de colônias bacterianas e diretamente de amostras clínicas, o teste ainda é considerado de alto custo, principalmente para os laboratórios brasileiros. Além disso, assim como os testes moleculares, estes estão limitados a detecção de carbapenemases específicas.

6. CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que a detecção de carbapenemases pela técnica de MALDI-TOF MS representa uma alternativa rápida e eficaz para os laboratórios clínicos, entretanto a utilização de kits e automação da avaliação dos picos do antimicrobiano é fortemente sugerida. Contudo, sugerimos que o meio de cultura MacConkey não seja utilizado para crescimento bacteriano, pois a detecção de carbapenemases em bactérias provenientes deste meio de cultura demonstrou resultado falso-negativo. Observamos ainda em nosso trabalho que o MALDI TOF MS também foi capaz de ser utilizado com uma técnica rápida e com alta sensibilidade e especificidade para a detecção da hidrólise de CAZ-AVI. Embora altos índices de sensibilidade e especificidade tenham sido observados pelo imunocromatográfico KPC-K-SeT para a detecção de diferentes variantes de KPC e os meios de cultura MacConkey, CPS e Agar Sangue não demonstraram interferência pelo teste, sugerimos o aumento do inóculo bacteriano para 5 colônias devido aos isolados produtores de carbapenemases sensíveis aos carbapenêmicos. Os métodos fenotípicos empregados para a detecção de carbapenemases diretamente de amostras clínicas representam boas alternativas para os laboratórios clínicos. Em nosso trabalho, observamos que o PCR em tempo real EasyQ KPC demonstrou-se uma metodologia rápida para a detecção de *bla*_{KPC} diretamente de swabs retais, entretanto a necessidade do equipamento é um requisito para que o teste seja realizado. O desenvolvimento e otimização de metodologias que permitam a detecção de carbapenemases diretamente de isolados clínicos sem a necessidade de crescimento bacteriano ainda precisa ser aprimorada. Sugerimos que cada laboratório clínico avalie as vantagens e desvantagens de cada método, objetivando a necessidade particular de cada centro hospitalar. Embora alguns testes ou equipamentos possam requerer um maior investimento, a relação custo/benefício deve ser avaliada, bem como a rapidez nos resultados que podem refletir na melhor assistência, diminuição dos custos hospitalares, assim como na diminuição dos índices de morbidade e mortalidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018) (portal.anvisa.gov.br_ acesso em 23/08/2019)

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289 (1036), 321-231.

Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebner NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (3): 1008-1013.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(7), 3579-3583.

Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates.* 2006; 9,142-156.

Bae, I.K., Lee, Y.N., Jeong, S.H., Hong, S.G., Lee, J.H., Lee, S.H., Kim, H.J., Youn, H. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended spectrum class A β lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 58, 465-468.

Barnes MD, Winkler ML, Taracila MA, Page MG, Desarbre E, Kreiswirth BN, Shields RK, Nguyen MH, Clancy C, Spellberg B, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2 (KPC-2), Substitutions at Ambler Position Asp179, and Resistance to Ceftazidime-Avibactam: Unique Antibiotic-Resistant Phenotypes Emerge from β -Lactamase Protein Engineering. *MBio.* 2017;8(5).

Bassetti M, Vena A, Castaldo N, Righi E, Peghin M. New antibiotics for ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2018 ;31(2):177-186.

Bebrone, C., Bogaerts, P., Delbrück, H., Bennink, S., Kupper, M.B., Rezende de Castro, R., Glupczynski, Y., Hoffmann, K.M. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013; 57, 396-401.

Beirão EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira Filho H, Gales AC. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011; 15(1), 69-73.

Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis*. 2018 .9 3;66(8):1290-1297.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast). Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas. v. 2.0. Julho, 2017.

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. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(9):3321-4.

Bush K. , Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:969-76.

Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33(3):259-63.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:1211-33.

Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care*. 2010;14: 224.

Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 24;62(10).

Caméléna F, Cointe A, Mathy V, Hobson C, Doit C, Bercot B, Decré D, Podglajen I, Dortet L, Monjault A, Bidet P, Bonacorsi S, Birgy A. Within-a-Day Detection and Rapid Characterization of Carbapenemase by Use of a New Carbapenem Inactivation Method-Based Test, CIMplus. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9)

Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22(2):161.e1-161.e7.

Carvalhoes CG, Cayô R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, Assis DM, Juliano L, Machado AM, Gales AC. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(8):2132-6.

Carvalhoes CG, da Silva AC, Streling AP, Cayô R, Rockstroh AC, Machado AM, Gales AC. Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J Med Microbiol*. 2015; 64(8):946-7.

Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(2):249-51.

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, et. al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(12), 2956-2957.

Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Canton R, Sader HS, Jones RN. Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among Enterobacteriaceae

Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis.* 2019, 15;6(Suppl 1): S23-S33.

Castanheira M, Doyle TB, Smith CJ, Mendes RE, Sader HS. Combination of MexAB-OprM overexpression and mutations in efflux regulators, PBPs and chaperone proteins is responsible for ceftazidime/avibactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from US hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2019. pii: dkz243. [Epub ahead of print]

Centers for Disease Control and Prevention. [acesso em 28/08/2019]; Antibiotic resistance threats in the United States. 2013 <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(3):547-603. Review.

Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, Decré D, Lavollay M, Podglajen I. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β Carba Test. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3065-3068.

Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla_{OXA-23}* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51:1530-3.

Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3based transposon involved in *bla_{KPC}* gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:5370–3.

Delbrück H, Bogaerts P, Kupper MB, Rezende de Castro R, Bennink S, Glupczynski Y, Galleni M, Hoffmann KM, Bebrone C. Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5618-25.

Demain AL, Elander RP. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; 75(1-2): 5-19.

Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDE CR CARBA NP, the Rapid CARB ScreenR and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70:3014-22.

Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2359-64.

Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3773-6.

Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63:659-67.

El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017; 131:185-195. Review.

Fauconnier C, Dodemont M, Depouhon A, Anantharajah A, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Lateral flow immunochromatographic assay for rapid screening of faecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74(2):357-359.

Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012; 16(6), 577-580.

Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001; 20:157-71.

Gaibani P, Galea A, Fagioni M, Ambretti S, Sambri V, Landini MP. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(10):2609-13.

Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. PLoS One. 2017;12(2): e0170769.

Giordano L, Fiori B, D'Inzeo T, Parisi G, Liotti FM, Menchinelli G, De Angelis G, De Maio F, Luzzaro F, Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T. Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NG-Test Carba 5 Assay. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(7).

Girlich D, Halimi D, Zambardi G, Nordmann P. 2013. Evaluation of Etest strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis 77:200–201.

Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect. 2011; 17:552-6.

Glupczynski Y, Evrard S, Huang TD, Bogaerts P. Evaluation of the RESIST-4 K-SeT assay, a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of OXA-48-like, KPC, VIM and NDM carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2019. [Epub ahead of print].

Glupczynski, Y., Evrard, S., Ote, I., Mertens, P., Huang, T.D., Leclipteux, T., Bogaerts, P. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 2016; 71 (5), 1217–1222.

Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2013;19(5): E230-2.

Hemarajata P, Humphries RM. Ceftazidime/avibactam resistance associated with L169P mutation in the omega loop of KPC-2. J Antimicrob Chemother. 2019. doi: 10.1093/jac/dkz026. [Epub ahead of print]

Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3523-3526.

Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20:839-53.

Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudáčková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:3222-7.

Humphries RM, Hemarajata P. Resistance to Ceftazidime-Avibactam in *Klebsiella pneumoniae* Due to Porin Mutations and the Increased Expression of KPC-3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6).

Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22:161-82.

Jean SS, Gould IM, Lee WS, Hsueh PR; International Society of Antimicrobial Chemotherapy (ISAC). New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *Drugs.* 2019;79(7):705-714.

Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(11):2820-2824.

Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA, van den Akker F. Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases. *Biochemistry.* 2007. 15;46(19):5732-40.

Kolenda C, Benoit R, Carricajo A, Bonnet R, Dauwalder O, Laurent F. Evaluation of the New Multiplex Immunochromatographic O.K.N.V. K-SeT Assay for Rapid Detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2018; 25;56(11).

Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(12): 4155–62.

Lau AF, Wang H, Weingarten RA, Drake SK, Suffredini AF, Garfield MK, Chen Y, Gucek M, Youn JH, Stock F, Tso H, DeLeo J, Cimino JJ, Frank KM, Dekker JP. 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. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(8):2804-12.

Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1584-1590.

Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 895. Review.

Leung LM, Cooper VS, Rasko DA, Guo Q, Pacey MP, McElheny CL, Mettus RT, Yoon SH, Goodlett DR, Ernst RK, Doi Y. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(11):3035-3042.

Levy Hara G, Gould I, Endimiani A, Pardo PR, Daikos G, Hsueh PR, Mehtar S, Petrikkos G, Casellas JM, Daciuk L, Paciel D, Novelli A, Saginur R, Pryluka D, Medina J, Savio E. Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: recommendations from an International Working Group. *J Chemother.* 2013; 25:129-40.

Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1):516-519.

Livermore, D. M., and N. Woodford. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 2000; 3: 489-495.

Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017 Feb 15;215(suppl 1): S28-S36. Review.

Magagnin CM, Rozales FP, Antochévis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, Sampaio JM, Zavascki AP. Dissemination of bla (OXA-370) gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(10):1907-1910

Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 32 Suppl 4:4-9. (14)70168-5. Review.

Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* 2007; 35(6):457-60.

Martins WM, Cordeiro-Moura JR, Ramos AC, Fehlberg LC, Nicoletti AG, Gales AC. Comparison of phenotypic tests for detecting BKC-1-producing Enterobacteriaceae isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 84(3):246-8.

McEwan AS, Derome A, Meunier D, Burns PJ, Woodford N, Dodgson AR. Evaluation of the NucliSENS EasyQ KPC assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1948–50.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, *et. al.* First report of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53, 333-334.

Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:906-9.

Monteiro J, Inoue FM, Lobo APT, Ibanes AS, Tufik S, Kiffer CRV. A major monoclonal hospital outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 and the first report of ST2570 in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019; 40(4):492-494.

Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. 2009. Functional analysis of insertion sequence ISAbal, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 191:2414-8.

Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect Dis. 2013; 13:785-796.

Moore NM, Cantón R, Carretto E, Peterson LR, Sautter RL, Traczewski MM; Carba-R Study Team. Rapid Identification of Five Classes of Carbapenem Resistance Genes Directly from Rectal Swabs by Use of the Xpert Carba-R Assay. J Clin Microbiol. 2017;55(7):2268-2275.

Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, Oliveira V, Gales AC. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(9):5159-64.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011; 17(10):1791-1798.

Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1503-7.

Novais Â, Sousa C, de Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, Coque TM, Cantón R, Peixe L. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2(ST131) and D (ST69, ST405, ST393). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33(8):1391-9.

Nunez, L. E., C. Mendez, A. F. Brana, G. Blanco, and J. A. Salas. 2003. The biosynthetic gene cluster for the β -lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. Chem. Biol. 10:301–311.

Oliver A., Levin B. R., Juan C., Baquero F., Blazquez J. 2004. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for

susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4226–4233

World Health Organization (WHO, 2014). *Antimicrobial Resistance, Global Report on Surveillance.*

Otter JA, Burgess P, Davies F, Mookerjee S, Singleton J, Gilchrist M, et al. Counting the cost of an outbreak of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: an economic evaluation from a hospital perspective. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23(3):188–96.

Oueslati S, Iorga BI, Tlili L, Exilie C, Zavala A, Dortet L, Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Naas T. Unravelling ceftazidime/avibactam resistance of KPC-28, a KPC-2 variant lacking carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(8):2239-2246.

Oviaño M, Ramírez CL, Barbeyto LP, Bou G. Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(5):1350-1354.

Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1):177-83.

Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(5):1731-5.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11):4943-60. Review

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-lactamases: a Clinical Update. 2005 *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18 (4), 657-86. Review.

Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P, Corso A. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(11):2832-2836.

Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(6):1996-8.

Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993; 2:81-7.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6), 2702.

Peirano G, Seki LM, Passos VLV, et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro. *Brazil J Antimicrob Chemother.* 2009; 63, 265-268.

Pereira PS, Borghi M, de Araujo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:4453–4456.

Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ, Thomson RB Jr, Jenkins SG, Limbago BM, Das S. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2321-2333.

Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281-3.

Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(7):1597-1606. Review.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011b; 70:119-123.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:24–38

Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:2546-51

Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*. 2018; 20(6):13.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20, 440-458.

Quiles MG, Boettger BC, Inoue FM, Monteiro J, Santos DW, Ponzio V, Carlesse F, Cappellano P, Carvalhaes CG, Pignatari ACC. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and real-time PCR in a combined protocol for diagnosis of bloodstream infections: a turnaround time approach. *Braz J Infect Dis*. 2019. pii: S1413-8670(18)31074-2.

Ramos A. C., Carvalhaes C.G, Oliveira L. C G, Assis D. M., Santos F. F., Cayô R., Martins W. M B, Ishihama C. S., Gomes T. A.T, Juliano M. A., Martínez-Martínez L., Gales A.C. Porin Loss in *Klebsiella pneumoniae*: A Rapid Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Poster A5468. American Society for Microbiology (ASM) Microbe, San Francisco – CA, 2019.

Rapp E, Samuelsen Ø, Sundqvist M. Detection of carbapenemases with a newly developed commercial assay using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *J Microbiol Methods*. 2018; 146:37-39.

Riccobono E, Antonelli A, Pecile P, Bogaerts P, D'Andrea MM, Rossolini GM. Evaluation of the KPC K-SeT® immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC

carbapenemase producers from positive blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(2):539-540.

Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):355-360.

Rossi F, Cury AP, Franco MRG, Testa R, Nichols WW. The in vitro activity of ceftazidime-avibactam against 417 Gram-negative bacilli collected in 2014 and 2015 at a teaching hospital in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2017; 21(5):569-573.

Sader HS, Castanheira M, Flamm RK. Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam against Gram-Negative Bacteria Isolated from Patients Hospitalized with Pneumonia in U.S. Medical Centers, 2011 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4).

Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 2016;47 Suppl 1:31-37.

Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochewis LC, Barth AL, Zavascki AP. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:3566-3567.

Seco BMS, Campos JC, da Costa Rocha DA, de Lima AV, de Oliveira FF, Lemo MEB, Sampaio SCF, Sampaio JLM. Improved blood culture workflow for faster identification of KPC-producing Enterobacterales. *Braz J Microbiol.* 2019;50(1):127-132.

Segal H, Jacobson RK, Garny S, Bamford CM, Elisha BG. Extended 10 promoter in ISAb_a-1 upstream of *bla*_{OXA-23} from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. 51:3040-1.

Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, Palucci I, Tumbarello M, Sanguinetti M, Rossolini GM. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*bla*_{KPC}). *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8):2783-5.

Sparbier K, Schubert S, Kostrzewa M. MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods*. 2016; 15; 104:48-54.

Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):927-37.

Streling AP, Barbosa PP, Marcondes MF, Nicoletti AG, Picão RC, Pinto EC, Marques EA, Oliveira V, Gales AC. Genetic and biochemical characterization of GES-16, a new GES-type β -lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;92(2):147-151.

Suárez C; Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27(2): 116-129.

Sun K, Xu X, Yan J, Zhang L. 2017. Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in Gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Ann Lab Med* 37:305–312.

Taconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; 18:318e27.

Tamma PD, Opene BN, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. 2017. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 55: 1046–1055.

Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, Dodgson A, McEwan A, Humphries R, Hindler J, Veltman J, Wang H, Cantón R. Multisite Evaluation of Cepheid Xpert Carba-R Assay for Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in Rectal Swabs. *J Clin Microbiol*. 2016;54(7):1814-1819.

Torres A, Zhong N, Pacht J, Timsit JF, Kollef M, Chen Z, Song J, Taylor D, Laud PJ, Stone GG, Chow JW. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia,

including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):285-295.

Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Clin Microbiol*.2015;53(4):1245-51.

van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10(3): e0123690.

van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, Leverstein-Van Hall MA, Cohen Stuart JW. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):345-9.

Van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75:115-20.

Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. 2002. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 40:2755–2759.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18 (2):306-325.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36S3, S8-S14.

Walther-Rasmussen, J., Høiby N. Class A carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother*. 2007; 60, 470-482.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsushashi S. Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 (1): 147-151.

Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. β -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8(5): 525-533.

World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. 2014; <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32(2).

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et. al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4), 1151-1161.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12), 5046-5054.

Youn JH, Drake SK, Weingarten RA, Frank KM, Dekker JP, Lau AF. Clinical Performance of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Detection of Certain bla_{KPC}-Containing Plasmids. 2016. *J Clin Microbiol.*; 54(1):35-42.

Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, et. al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis.* 2010; 14(6), e539-540.

Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, Lagacé-Wiens PRS, Walkty A, Denisuik A, Golden A, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowisky JA. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs.* 2018; 78(1):65-98. Review. Erratum in: *Drugs.* 2018; PubMed PMID:29230684.

Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PR, Denisuik A, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowisky JA. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. *Drugs.* 2013; 73(2):159-77. Review

8. **ANEXO.** Artigo científico publicado em periódico no período da tese de doutorado utilizando a metodologia de espectrometria de massa MALDI TOF. Dissemination of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clones carrying a novel integron-borne *bla*_{IMP-1} in a tertiary hospital. Publicado em fevereiro de 2018 no periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy – AAC, volume 62, issue 2 e01321-17, páginas 1-5.

Dissemination of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clones carrying a novel integron-borne *bla*_{IMP-1} in a tertiary hospital

Ana Carolina Ramos^{1*§}

Rodrigo Cayô^{1§}

Cecilia Godoy Carvalhaes²

Thomas Jové³

Greice Pereira da Silva⁴

Fernanda Maciel Paschoin Sancho⁴

Thomas Chagas-Neto²

Eduardo Alexandrino Servolo Medeiros⁵

Ana Cristina Gales¹

§Both authors have equally contributed to this work.

¹Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Laboratório Alerta, Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina - EPM, São Paulo, Brazil.

²Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Setor de Microbiologia - Laboratório Central, Hospital São Paulo. Division of Laboratory Medicine, Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina - EPM, São Paulo, Brazil.

³Université de Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France.

⁴Hospital Estadual de Diadema. Associação Paulista para o Desenvolvimento da Medicina - SPDM, Diadema, Brazil.

⁵Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Hospital Epidemiology Committee, Hospital São Paulo. Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine. Escola Paulista de Medicina - EPM, São Paulo, Brazil.

Running title: IMP-1-producing *P. mirabilis*.

*Corresponding author: Ana Carolina Ramos

Rua Pedro de Toledo, 781, 6th Floor

São Paulo - SP

Brazil

ZIP code: 04039-032

Phone/Fax.: +55 11 55715180

E-mail: anarolramos@msn.com.

ABSTRACT

This study aimed to characterize multi-drug resistant *P. mirabilis* clones carrying a novel class 1 integron-borne *bla*_{IMP-1}. In1359 was inserted into a large conjugative plasmid that also carried *bla*_{CTX-M-2}. The production of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* that are intrinsically resistant to polymyxins and tigecycline is very worrisome, representing a serious challenge to clinicians and infection control teams.

Proteus mirabilis is a common etiologic agent of urinary tract infections in humans and animals (1,2). This opportunistic pathogen belongs to a group of *Enterobacteriaceae* that exhibits intrinsic reduced susceptibility to polymyxins and tigecycline (3). Therefore, the acquisition of carbapenemases encoding genes by *P. mirabilis* is worrisome, since therapeutic options are drastically reduced (4). Metallo- β -lactamases (M β Ls) are class B carbapenemases that hydrolyze almost all β -lactams, being mainly reported among Gram-negative pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* (5). In *Enterobacteriaceae*, *bla*_{NDM-1} is one of the most frequent M β L encoding genes. It usually resides on broad-host-range plasmid types what makes easier the *bla*_{NDM-1} spread to distinct bacterial species (6). In contrast, most IMP and VIM encoding genes are usually found as gene cassettes in class 1 integrons. These mobile elements usually carry other gene cassettes conferring resistance to multiple antimicrobial agents (5). Hence, this study aimed to characterize multi-drug resistant *P. mirabilis* clones carrying a novel class 1 integron-borne *bla*_{IMP-1} in a Brazilian hospital.

A total of 10 carbapenem-resistant *P. mirabilis* isolates were recovered from tracheal aspirates (three isolates responsible for causing tracheobronchitis/pneumonia), and rectal swabs (fecal colonization) from patients hospitalized at a tertiary hospital located in the city of Diadema, metropolitan region of São Paulo city, Brazil, between July and August 2015. The bacterial identification at the species level was performed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) using Microflex LT mass spectrometer and Biotyper 3.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), following manufacturer's recommendations. Antimicrobial susceptibility test was performed by broth microdilution and interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (7). All *P. mirabilis* isolates were resistant to β -

lactams and showed intermediate resistance to both aminoglycosides (MICs ranging from 4 to 16 µg/mL), except for Pm-7 isolate that showed high MICs to these compounds. In opposite, ciprofloxacin was the only antimicrobial agent tested that demonstrated *in vitro* activity against such isolates (MICs ranging from ≤0.125 to 0.25 µg/mL).

Screening for carbapenemase activity by ertapenem hydrolysis assay was performed by MALDI-TOF MS, as previously published (8). In addition, the presence of β-lactamases and 16S rRNA methylases encoding genes was evaluated by PCR followed by DNA sequencing using specific primers, as previously described (9,10,11). All *P. mirabilis* isolates were identified as carbapenemase producers by MALDI-TOF MS and carried *bla*_{IMP-1} (accession number KY057362), *bla*_{TEM-1}, and *bla*_{CTX-M-2} (Table 1). Additional resistance genes were detected in Pm-3 (*bla*_{KPC-2}), and Pm-7 (*bla*_{CTX-M-14} and *rmtB-1*) isolates. Therefore, the production of methylase RmtB-1 was responsible for the high resistance rates to gentamicin (MIC; >64 µg/mL) and amikacin (MIC; >256 µg/mL) shown by Pm-7 isolate. To evaluate the genetic environment of *bla*_{IMP-1}, specific primers targeting the 5'- and 3'-conserved sequence (CS) regions of class 1 integron were tested (10,12,13). As expected, the sequencing analysis demonstrated that *bla*_{IMP-1} was inserted at the first position of a new class 1 integron (Figure 1A), named In1359 (accession number MG255131). *bla*_{IMP-1} was followed by two aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) encoding genes (*aacA4-26* and *aadA1e*), and *qacEΔ1/sul1* at 3'-CS region. Since its first description in Brazil, in 2003 (14), In86 (Figure 1B) has always been involved with *bla*_{IMP-1} spread among distinct Gram-negative bacilli isolated from hospitals of the city of São Paulo (12,15). Recently, In990-harboring *bla*_{IMP-10} (Figure 1C), which differs by one nucleotide from *bla*_{IMP-1}, was reported in *A. baumannii* isolates recovered in the year 2000 (10). Fifteen years later, In990 was detected in *bla*_{KPC-2}-producing *Serratia marcescens* isolates, which caused an outbreak in a distinct Brazilian geographic region (16). The cassette arrangement structure of In1359 was similar to those displayed by In86 and In990, except for: (i) *aacA4-26* gene that is a novel allele of the reference *aacA4* gene. The *aacA4-26* encodes a AAC(6')-Ib protein shortened to 172 amino-acid (instead of 184-aa) that displays the Ala19Pro, Tyr22His, and Glu23Asp substitutions; (ii) the *attC* region of the *aacA4-26* was replaced by a truncated version of the *attC* (Figure 1A). Since this *attC* is not functional, *aacA4-26* and *aadA1e* will be probably mobilized together.

The plasmid DNA extraction was performed using the Kieser protocol followed by Southern Blot/hybridization experiments using specific probes, as described previously (10,16,17). *bla*_{IMP-1} and *bla*_{KPC-2} genes were located on a ~150 kb and ~95 kb plasmids, respectively. Conjugation assays using the azide-resistant (Az^R) *Escherichia coli* J53 and Pm-3 as the recipient and donor strains, respectively, were carried out. The ~150 kb plasmid harboring *bla*_{IMP-1} and *bla*_{CTX-M-2} was successfully transferred by conjugation (transconjugant strain T-3.1; Table 1). However, conjugation experiments failed to transfer *bla*_{KPC-2}. The transconjugant T-3.1 showed an 8- to 32-fold, and 64- to 512-fold increase in the MICs for carbapenems and extended-spectrum cephalosporins, respectively, as well as 2- to 8-fold increase in the MICs for aminoglycosides compared to wild *E. coli* J53Az^R strain (Table 1). The plasmid carrying *bla*_{IMP-1} in T-3.1 strain was screened for the incompatibility groups by PCR-based replicon typing (PBRT), as previously described (18). PBRT analysis showed that the plasmid harboring *bla*_{IMP-1} belonged to IncA/C group, confirming its association with *bla*_{IMP}-like genes, as previously observed (19).

The analysis of the genetic similarity among IMP-1-producing *P. mirabilis* strains was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the restriction enzyme SpeI (New England BioLabs, MA, USA). The PFGE assay was performed using the CHEF DR II equipment (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) in 0.5X TBE electrophoresis buffer with thiourea (50 µM), using a pulse time 5 to 30s, for 23h. PFGE patterns were interpreted according to the criteria of Pfaller and colleagues (20). IMP-1-producing *P. mirabilis* isolates were distributed into a predominant clone (type A/two subtypes; n=9 isolates), and Pm7 isolate, which co-produces CTX-M-14 and RmtB-1, belonging to a single PFGE pattern, type B (Table 1). Interestingly, only a few resistant *P. mirabilis* strains have been previously associated to outbreaks (21,22). The current report highlights the potential of intra-hospital dissemination of a MDR *P. mirabilis* clone among patients hospitalized at different hospital units, reinforcing the need for adherence to proper infection control measures.

The acquisition of *bla*_{IMP}-like genes by *P. mirabilis* seems to be a rare event, since only a single description of IMP-27 carried by a class 2 integron has been reported to date (23). To the best of our knowledge, this is the first report of IMP-1 in *P. mirabilis* worldwide. Although, there was a predominant clone related to this outbreak, the colonization by two distinct *P. mirabilis* genotypes carrying specific resistance determinants exemplifies the dynamics of temporal

evolution among multidrug resistance pathogens in the nosocomial environment. Lastly, the coproduction of plasmid-mediated *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC-2}, and *rmtB*-1 genes in such pathogen is very worrisome, representing a serious challenge to clinicians and infection control teams.

TRANSPARENCY DECLARATIONS

A.C.G. has recently received research funding and/or consultation fees from Bayer, MSD, and Pfizer. Other authors have nothing to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Andressa Dias Tognolli, Bruna Genaro, Willames M.B.S. Martins, and Ana Clara Narciso Barbosa for their excellent technical contribution to this study. We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing grants to A.C.R. and R.C. (PNPD 20131991), and to the National Council for Science and Technological Development (CNPq) for providing grant to A.C.G. (Process number: 305535/2014-5).

REFERENCES

1. Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, DeOrnellas V, Eaton KA, Yep A, Mody L, Wu W, Mobley HL. 2017. The Pathogenic Potential of *Proteus mirabilis* Is Enhanced by Other Uropathogens during Polymicrobial Urinary Tract Infection. *Infect Immun.* 85 (2). pii: e00808-16.27895127.
2. Abe T, Iizuka A, Kojima H, Kimura K, Shibahara T, Haritani M. 2017. Necrotizing suppurative nephritis in a Japanese black feedlot steer due to *Proteus mirabilis* infection. *J Vet Med Sci.* 79:709-713.
3. Cunha BA, Baron J, Cunha CB. 2017. Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 15:257-267.
4. Qin S, Qi H, Zhang Q, Zhao D, Liu ZZ, Tian H, Xu L, Xu H, Zhou M, Feng X, Liu HM. 2015. Emergence of Extensively Drug-Resistant *Proteus mirabilis* Harboring a Conjugative NDM-1 Plasmid and a Novel *Salmonella* Genomic Island 1 Variant, SGI1-Z. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:6601-6604.

5. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 11:381-393.
6. Girlich D, Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2015. Integration of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 70:98-102.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2017. Available at: <http://www.eucast.org>. Accessed June 26, 2017.
8. Ramos AC, Carvalhaes CG, Cordeiro-Moura JR, Rockstroh AC, Machado AM, Gales AC. 2016. Influence of Culture Media on Detection of Carbapenem Hydrolysis by MALDI-TOF MS. *J Clin Microbiol.* 54: 1896-1898.
9. Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, Oliveira V, Gales AC. 2015. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:5159-5164.
10. Cayô R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhaes CG, Jové T, Gales AC. 2015. Identification of a new integron harboring *bla* (IMP-10) in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:3687-3689.
11. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1843-1845.
12. Mendes RE, Castanheira M, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. 2007. Characterization of an integron carrying *bla*_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac*(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:2611-2614.
13. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. 2004. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac*(6')-30/*aac*(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4693-4702.

14. Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. 2003. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 45:77-79.
15. Penteado AP, Castanheira M, Pignatari AC, Guimarães T, Mamizuka EM, Gales AC. 2009. Dissemination of *bla* (IMP-1)-carrying integron *In86* among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr23*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 63:87-91.
16. Silva KE, Cayô R, Carvalhaes CG, Patussi Correia Sacchi F, Rodrigues-Costa F, Ramos da Silva AC, Croda J, Gales AC, Simionatto S. 2015. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol.* 53:2324-2328.
17. Kieser T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid.* 12:19-36.
18. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 63:219-28.
19. Dolejska M, Masarikova M, Dobiasova H, Jamborova I, Karpiskova R, Havlicek M, Carlile N, Priddel D, Cizek A, Literak I. 2016. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *J Antimicrob Chemother.* 71:63-70.
20. Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ, Wenzel RP, Fritschel SJ, Neubauer JJ, Herwaldt LA. 1996. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 25:1-8.
21. Nakano R, Nakano A, Abe M, Inoue M, Okamoto R. 2012. Regional outbreak of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *J Med Microbiol.* 61:1727-1735.
22. Kim JY, Park YJ, Kim SI, Kang MW, Lee SO, Lee KY. 2004. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 54:1144-1147.

23. Dixon N, Fowler RC, Yoshizumi A, Horiyama T, Ishii Y, Harrison L, Geyer CN, Moland ES, Thomson K, Hanson ND. 2016. IMP-27, a Unique Metallo- β -Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:6418-6421.

Table 1. Microbiological characterization of IMP-1-producing *P. mirabilis*.^a

Strain	Patient	Site isolation	Date of isolation (mm/dd/yy)	PFGE	ETP hydrolysis assay	Hospital Unit	MIC (µg/ml)										Resistance Determinants
							CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	ETP	GEN	AMK	CIP	
Pm-1	1	Tracheal aspirate	07/31/2015	A1	+	Internal Medicine	>32	>128	>64	16	>64	>64	64	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-2	2	Tracheal aspirate	08/01/2015	A1	+	ICU	>32	>128	>64	16	>64	>64	32	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-3	3	Tracheal aspirate	08/03/2015	A2	+	ICU	>32	>128	>64	16	>64	>64	64	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{KPC-2}
Pm-4	4	Rectal swab	08/10/2015	A1	+	ICU	>32	>128	>64	32	>64	64	32	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-5	5	Rectal swab	08/10/2015	A1	+	ICU	>32	>128	>64	16	>64	>64	32	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-6	6	Rectal swab	08/11/2015	A1	+	ICU	>32	>128	>64	16	>64	64	32	4	16	0.25	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-7	7	Rectal swab	08/17/2015	B	+	Surgery II	>32	>128	>64	16	>64	>64	32	>64	>256	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{IMP-1} , <i>rmtB-1</i>
Pm-8	8	Rectal swab	08/24/2015	A1	+	Internal Medicine	>32	>128	>64	32	>64	>64	32	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-9	9	Rectal swab	08/31/2015	A1	+	ICU	>32	>128	>64	16	>64	>64	32	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
Pm-10	10	Rectal swab	08/31/2015	A1	+	ICU	>32	>128	>64	16	>64	>64	32	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}
<i>E. coli</i> J53Az ^R					-		≤0.5	≤0.5	≤0.125	NT	1	0.5	≤0.25	2	2	≤0.125	-
T-3.1					+		>32	>128	>64	NT	8	16	8	4	16	≤0.125	<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{IMP-1}

^a. ICU - intensive care unit; PFGE - pulsed field gel electrophoresis; MIC - minimal inhibitory concentration; mm/dd/yy - month/day/year; AMK - amikacin; ATM - aztreonam; CIP - ciprofloxacin; CTX - cefotaxime; CAZ - ceftazidime, ETP - ertapenem; FEP - cefepime; GEN - gentamicin; IPM - imipenem; MEM - meropenem.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Comparison of cassette arrangement structures of class 1 integron-borne *bla*_{IMP}-like genes reported among distinct Gram-negative pathogens recovered from hospitals located in the city of São Paulo during the past 20 years (9,11,14,15). **A** - In1359. The box indicated the mobilized gene cassettes composed by *aacA4-26* and *aadA1e* genes; **B** - In86; **C** - In990. Arrows designate transcription directions of genes. Each gene was represented by a distinct color. Figure is not to scale.

Figure 1.

