

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

Utilização de espectrometria de massa, MALDI-TOF, na detecção de resistência aos carbapenêmicos mediada por carbapenemases em *Enterobacterales*

NATÁLIA KEHL MOREIRA

PORTO ALEGRE, 2022

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

Utilização de espectrometria de massa, MALDI-TOF, na detecção de resistência aos carbapenêmicos mediada por carbapenemases em *Enterobacterales*

Dissertação apresentada por **Natália Kehl Moreira** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Caierão

Coorientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre, 2022

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de setembro de 2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andreza Francisco Martins
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Marcelo Pillonetto
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira, Natália Kehl
Utilização de espectrometria de massa, MALDI-TOF,
na detecção de resistência aos carbapenêmicos mediada
por carbapenemases em Enterobacterales / Natália Kehl
Moreira. -- 2022.
143 f.
Orientadora: Juliana Caierão.

Coorientador: Afonso Luís Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Microbiologia . 2. Resistência Bacteriana. 3.
Carbapenemases. 4. MALDI-TOF. I. Caierão, Juliana,
orient. II. Barth, Afonso Luís, coorient. III.
Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Departamento Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE/HCPA), com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - Programa Pesquisador Gaúcho, edital 05/2019) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE/HCPA – nº 2020-0233). O autor recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, profa. Dra. Juliana Caierão, por confiar a mim o desenvolvimento deste trabalho e todos os outros projetos que estamos realizando nestes últimos anos. Por segurar a minha mão para subir cada degrau dessa jornada. Pela disponibilidade 24 horas por dia, 7 dias da semana, respondendo mensagens e tirando dúvidas até mesmo quando o pequeno Lipe nasceu. Obrigada pelas dicas, pela paciência, pelo incentivo e por me mostrar a cada dia o que é trabalhar fazendo o que se ama.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Afonso Luís Barth, por todo o apoio e incentivo durante esses anos, por ver um pequeno potencial em mim, quando nem eu mesma sabia que existia. Obrigada principalmente pelos ensinamentos, pois, a “hora do café” não é só um horário que tomamos café, mas sim um momento de aprender com as histórias e experiências que o senhor compartilha conosco. Obrigada por ser um exemplo de vida profissional e pessoal.

À minha parceira de projeto, Camila Mörschbacher Wilhelm, por abraçar esse trabalho junto comigo e estar presente em todas as etapas, inclusive quando estava dando tudo errado. Obrigada por compartilhar tua experiência, me ensinar e aprender junto comigo a cada dia. E o mais importante, obrigada por dizer “Nati hoje vai dar certo”, mesmo quando eu era pessimista (quase sempre).

Aos outros membros do grupo LABRESIS, Priscila Lamb Wink, Patricia Orlandi Barth, Otávio von Ameln Lovison, Maiara dos Santos Carneiro Evelyn Kern Almeida e Aymê Duarte Echevarria, por me receberem tão bem e tornarem todo o processo mais leve, além de doarem sangue sempre que eu pedia (sem vocês não teria sido possível); e um agradecimento especial à Fabiana C. Zempulski Volpato, que sempre estava ali para ajudar quando eu precisava, fazendo o possível e o impossível, e dar o sangue (literalmente) pelo meu projeto, tanto quanto eu.

À minha amiga, Franciele Fátima Lopes, por enfrentar essa jornada de mestrado comigo. Por passar pelos perrengues junto comigo, sofrer com artigos recusados e várias submissões até a felicidade de ter um artigo publicado. Por compartilhar a esperança de a bolsa cair na conta dia 1^a do mês. Por planejar sair para tomar um café ou um drink no início do mês, mas acabar sempre não indo. Obrigada por estar comigo e por doar sangue para minha pesquisa.

À minha “outra metade bacteriológica”, Gabriela da Silva Collar, minha parceira de laboratório desde o início, que apesar de não ter participado efetivamente do projeto de mestrado comigo, sempre esteve ali para tudo que precisei. Obrigada por me auxiliar, me ouvir reclamar, fofocar, fazer faxina comigo e muito mais. Obrigada por dizer “eu sei que tu consegue” mesmo quando eu estava esgotada. Eu realmente não sei o que seria de mim sem você, e nem quero imaginar. Sei que ainda virão muitos projetos e perrengues, mas juntas tudo fica mais fácil.

À minha família, a base de tudo. Ao meu pai, Gelson Nascimento Moreira, obrigada por sempre me incentivar e colocar minha educação e dos meus irmãos em primeiro lugar. À minha mãe, Andréia Kehl Moreira, que sempre me deu todo o apoio e força para continuar. Obrigada por dizer “filha descansa”, “filha vem comer”, quando eu me sentava para escrever e nem via o dia passar. Aos meus avós maternos, Maria Virgínia Kehl e Ari Kehl, por serem meus “segundo pai e segunda mãe” e estarem sempre presentes. À minha dinda Geovana Nascimento Moreira por ser a pessoa que mais acredita e torce por mim depois dos meus pais. E, àqueles que me estressam diariamente, mas tornam meus dias completos, meus irmãos, Lucas Kehl Moreira e Gabriela Kehl Moreira.

Por fim, um agradecimento especial, à Olívia, que está sempre me esperando com o rabinho abanando quando chego em casa e não importa o quão difícil tenha sido meu dia, ela sempre o torna feliz.

Muito obrigada!

RESUMO

Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (ERC) são uma ameaça atual à saúde global. ERCs produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) são mundialmente disseminadas e responsáveis por diversos surtos. Infecções por estas bactérias estão associadas a elevados índices de morbidade e mortalidade (podendo chegar a 80% nos casos de bacteremias), aumentando significativamente o tempo de hospitalização e os custos com cuidados médicos. Nesse contexto, a implementação da terapia adequada o mais breve possível contribui, sobremaneira, para um melhor desfecho do paciente. Sendo assim, métodos rápidos para detecção de ERCs são cada vez mais necessários. A espectrometria de massa de avaliação do “tempo de voo” de moléculas proteicas pós-dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) tem sido uma ferramenta adequada para a microbiologia clínica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do MALDI-TOF MS para a determinação de resistência aos carbapenêmicos, através da detecção da hidrólise de carbapenêmicos (a partir de frascos de hemoculturas positivas) e da detecção da KPC (a partir de colônias isoladas e diretamente de frascos de hemoculturas positivas). No ensaio de hidrólise foram avaliados 100 isolados (81 carreando genes de carbapenemases), obtendo sensibilidade de 84,6% e especificidade de 89,5%, com uma variação significativa de acordo com o tipo da enzima: 97,9% de sensibilidade em isolados *bla*_{KPC}-positivos; 58,8%, para *bla*_{NDM-1} e 60,0%, para *bla*_{OXA-48-like}. Para a detecção da KPC, foram avaliados 300 isolados (157 *bla*_{KPC}-positivos) crescidos em meio de cultura sólido e foi estabelecido um ponto de corte para intensidade do pico da enzima (≥ 120 [u.a.]), com sensibilidade de 98,09% e especificidade de 97,90%. Para as hemoculturas, foram avaliados 102 isolados (59 *bla*_{KPC}-positivos), com sensibilidade e especificidade de 94,9% e 95,3%, respectivamente, utilizando o mesmo valor de ponto de corte. Uma categoria intermediária (115 a 125 [u.a]) foi proposta para obter resultados mais confiáveis e reprodutíveis. Portanto, conclui-se que a detecção da hidrólise do carbapenêmico direto de frascos de hemoculturas positivas através do MALDI-TOF MS, e a detecção do pico de KPC, são metodologias viáveis e rápidas para otimização do tratamento antimicrobiano e de estratégias de *stewardship*.

Palavras-chave: *Enterobacterales*, carbapenemases, hemoculturas, KPC, MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) are an urgent threat to global health. Among them, CRE producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) are disseminated worldwide and responsible for several clinical outbreaks. Infections caused by these bacteria are associated with high morbidity and mortality (up to 80% in cases of bacteremia), increasing hospitalization time and costs. In this context, the implementation of an appropriate therapy as soon as possible contributes to a better patient outcome. Therefore, rapid methods to detect CREs are even more necessary. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) proved to be a suitable tool for clinical microbiology. The objective of this work was to evaluate the use of MALDI-TOF MS to detect carbapenem resistance, through the detection of carbapenem hydrolysis (from positive blood culture bottles) and the detection of KPC (from colonies grown in solid culture medium and directly from positive blood culture bottles). In the hydrolysis assay, 100 isolates were evaluated (81 carrying carbapenemase genes); sensitivity of 84.6% and specificity of 89.5% were observed, with a significant variation according to the enzyme type: 97.9% of sensitivity in *bla*_{KPC}-positive isolates; 58.8% for *bla*_{NDM-1} and 60.0% for *bla*_{OXA-48-like}. For the detection of the KPC, 300 isolates (157 *bla*_{KPC}-positives) grown in solid culture medium were evaluated and a cut-off point was established for the peak intensity of the enzyme (≥ 120 a.u.), with a sensitivity of 98.09% and specificity of 97.90%. For blood cultures, 102 isolates (59 *bla*_{KPC}-positives) were evaluated, with sensitivity and specificity of 94.9% and 95.3%, respectively, using the same cut-off value. An intermediate category was proposed to obtain more reliable and reproducible results. Therefore, in conclusion, the detection of carbapenem hydrolysis directly from positive blood culture bottles using MALDI-TOF MS, and the detection of KPC peak, are practicable and rapid methods for optimizing antimicrobial treatment and stewardship.

Keywords: *Enterobacterales*, carbapenemases, bloodculture, KPC, MALDI-TOF MS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	REVISÃO DO TEMA.....	21
3.1	Ordem <i>Enterobacterales</i>	21
3.2	Epidemiologia.....	23
3.3	<i>Enterobacterales</i> resistentes aos carbapenêmicos	23
3.3.1	Carbapenemases	25
3.3.2	Classe A.....	27
3.3.3	Classe B.....	29
3.3.4	Classe D.....	31
3.4	Métodos para detecção de carbapenemases.....	31
3.4.1	Métodos de triagem.....	31
3.4.2	Teste de disco combinado.....	33
3.4.3	Método de inativação de carbapenêmicos	35
3.4.4	Métodos bioquímicos colorimétricos	37
3.4.5	Métodos moleculares	37
3.4.6	Imunocromatografia.....	39
3.4.7	Espectrometria de massas MALDI-TOF.....	39
4	MANUSCRITOS	45
4.1	Manuscrito 1	45
4.2	Manuscrito 2.....	77
4.3	Manuscrito 3.....	89
5	DISCUSSÃO GERAL.....	119
6	CONCLUSÃO GERAL	123
7	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos se tornou, nas últimas décadas, uma das maiores ameaças globais à saúde humana, devido à emergência e disseminação de bactérias multirresistentes para as quais as opções terapêuticas são mínimas e/ou subótimas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Ao mesmo tempo, a velocidade de ocorrência de novos fenótipos de resistência aos antimicrobianos ultrapassou a velocidade de desenvolvimento e disponibilidade de novos agentes antimicrobianos na prática clínica, reiterando a magnitude do problema (DORTET *et al.*, 2018; THEURETZBACHER *et al.*, 2019).

Nesse contexto, *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) são apontadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (“Centers for Diseases Control and Prevention” - CDC) como um dos principais desafios, necessitando pesquisa e desenvolvimento de novas opções terapêuticas urgentemente (LODISE *et al.*, 2019; PEREZ; BONOMO, 2019; SABINO *et al.*, 2019; VILLEGAS *et al.*, 2019). Infecções por estas bactérias estão associadas a alguns fatores de risco, tais como: internação em unidade de terapia intensiva (UTI), tempo prolongado de internação, presença de comorbidades, uso prévio de antimicrobianos, alta pressão de colonização e uso prolongado de dispositivos invasivos. Tais fatores contribuem para altos índices de morbidade e mortalidade, aumentando significativamente o tempo de hospitalização e os custos com cuidados médicos (LODISE *et al.*, 2019; OKAMOTO *et al.*, 2017; PALACIOS-BAENA *et al.*, 2021; PEREZ; BONOMO, 2019; SABINO *et al.*, 2019; VILLEGAS *et al.*, 2019; YI; KIM, 2021). Além disso, infecções da corrente sanguínea por ERC estão associadas a um aumento de 75% na probabilidade de mortalidade intra-hospitalar (PEREZ; BONOMO, 2019; STEWARDSON *et al.*, 2019).

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos nessas bactérias é a produção de enzimas carbapenemases, que estão alocadas nas classes A, B e D de Ambler. A produção de carbapenemases da classe A é o mecanismo mais importante em muitas regiões do mundo, sendo a KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) a enzima mais relevante desta classe (BUSH; BRADFORD, 2020; HANSEN, 2021; HUSSEIN *et al.*, 2022; LOGAN; WEINSTEIN, 2017a; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020). Como os genes que codificam as carbapenemases

podem se disseminar em um padrão clonal ou por transferência horizontal, a detecção rápida e precisa de ERC é fundamental, não apenas para otimizar estratégias terapêuticas, mas também para fins de controle de infecção (LEE *et al.*, 2016; LODISE *et al.*, 2019; PORRECA; SULLIVAN; GALLAGHER, 2018).

Nesse contexto, já está bem estabelecido que a implementação precoce da terapia adequada impacta diretamente na mortalidade do paciente (LIU *et al.*, 2017; LODISE *et al.*, 2019; NAUCLÉR *et al.*, 2021; SHERWIN *et al.*, 2017; TIMSIT; PAIVA; BASSETTI, 2016). Como a frequência de ocorrência de infecções por ERC é cada vez maior, iniciar um tratamento efetivo depende, cada vez mais, dos resultados da detecção da suscetibilidade aos antimicrobianos pelo laboratório de microbiologia clínica (LEE *et al.*, 2022, 2022; LODISE *et al.*, 2019; NAUCLÉR *et al.*, 2021), principalmente no contexto das novas combinações de β -lactâmicos e inibidores da β -lactamase (BRADLEY; LEE, 2019; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015; HO *et al.*, 2019; NATIONAL HEALTH SURVEILLANCE AGENCY, 2018; POGUE; BONOMO; KAYE, 2019; VILLEGAS *et al.*, 2019). Sendo assim, a otimização, e aceleração, dos procedimentos diagnósticos é claramente necessária, visando otimizar o desfecho clínico do paciente e controlar a disseminação de ERC, além de otimizar as estratégias de *stewardship* (NAUCLÉR *et al.*, 2021; RICE, 2018; TARIQ; RASOOL, 2016).

Para tanto, nenhuma metodologia proposta recentemente teve tanto impacto na microbiologia clínica como a espectrometria de massas, através do MALDI-TOF MS (“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry”) (LA SCOLA; RAOULT, 2009; YOON; JEONG, 2021; ZABBE *et al.*, 2015). De fato, a incorporação do MALDI-TOF MS tem sido um dos mais significativos avanços na microbiologia clínica moderna, e está sendo cada vez mais utilizado por laboratórios de média e alta complexidade. Essa técnica provou ser uma ferramenta acurada para a rápida identificação bacteriana (OVIAÑO; BOU, 2018; SANDALAKIS *et al.*, 2017). Apesar de o investimento inicial ser elevado, os custos operacionais do equipamento são baixíssimos (US\$1,00–2,00 por amostra) (LEE *et al.*, 2022; TAMMA; SIMNER, 2018), o que é, claramente, uma de suas vantagens.

Além da identificação dos microrganismos, outras aplicabilidades na microbiologia clínica têm sido estudadas para essa metodologia como, por exemplo, a detecção de suscetibilidade e/ou de mecanismos de resistência aos

antimicrobianos. Algumas abordagens já foram propostas e demonstraram bons resultados, mas ainda requerem uma avaliação mais ampla e sistemática. A primeira é o ensaio de hidrólise, que exige um curto tempo de incubação (2-4h) e está baseado na detecção da capacidade hidrolítica da carbapenemase (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; KAWAMOTO *et al.*, 2018, 2019; LEE *et al.*, 2022; TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Além dessa abordagem, alguns autores demonstraram ser possível caracterizar o pico que se refere, diretamente, à molécula da enzima, pela análise do perfil proteico gerado pelo MALDI-TOF MS (ESPINOSA *et al.*, 2018; FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; PAPAGIANNITSIS *et al.*, 2014; YOON *et al.*, 2020). Figueroa-Espinosa e colaboradores (2019) desenvolveram um protocolo para a detecção de carbapenemases do tipo KPC-2, obtendo resultados satisfatórios, embora com um número limitado de isolados. Além disso, os autores também propuseram a detecção do pico referente à KPC-2 diretamente de frascos de hemocultura de pacientes com suspeita de bacteremia.

Mais recentemente, Yoon e colaboradores (2020) determinaram a massa molecular exata da proteína KPC-2 (28718 Da) e o intervalo de massa que se encontram as diferentes variantes de KPC (28708–28728 Da). Em ambos estudos para detecção da enzima KPC (FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020), foi necessário menos de 1h para a detecção da presença da carbapenemase em comparação a, pelo menos, 24h exigidas pelas técnicas baseadas em cultura.

Ao considerar as ERC, o impacto clínico do uso dessa metodologia reveste-se de particular importância, sendo ela capaz de reduzir a mortalidade do paciente e a disseminação de bactérias multirresistentes, já que terapias efetivas e medidas de controle de infecção adequadas poderão ser implementadas de forma mais rápida e assertiva. A partir do exposto, fica evidente a importância do MALDI-TOF MS na microbiologia clínica atual.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização do MALDI-TOF, através de diferentes ensaios, para a detecção de resistência aos carbapenêmicos.

2.2 Objetivos específicos

- (a) Avaliar a performance do MALDI-TOF na detecção da hidrólise de carbapenêmicos diretamente de frascos de hemoculturas;
- (b) Avaliar a capacidade do MALDI-TOF de detectar a enzima KPC em bactérias crescidas em meio de cultura sólido;
- (c) Avaliar a capacidade do MALDI-TOF de detectar a enzima KPC diretamente de frascos de hemoculturas.

3 REVISÃO DO TEMA

3.1 Ordem *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales*, pertencente à classe *Gammaproteobacteria*, é composta por bacilos Gram-negativos (BGN), anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. É composta por 60 gêneros, sendo a maioria (mais de 250 espécies) pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (ADEOLU *et al.*, 2016).

A diversidade bioquímica dentro da ordem *Enterobacterales* torna a classificação fenotípica em subgrupos difícil (BRENNER *et al.*, 2005; OCTAVIA; LAN, 2014). O entendimento acerca da filogenia e da inter-relação dos membros dessa ordem, até pouco tempo, era primariamente baseado na diversidade do gene 16S rRNA. Contudo, este gene possui um baixo poder discriminatório para esse grupo e as árvores filogenéticas baseadas nele não proporcionavam uma boa resolução (OCTAVIA; LAN, 2014).

Com o aumento do uso das tecnologias de sequenciamento de genoma completo, houve um crescimento significativo no volume de dados de genomas sequenciados disponíveis publicamente. Atualmente, existem 9.623 genomas completos de organismos da ordem *Enterobacterales* disponíveis no banco de dados de genomas do NCBI ("National Center for Biotechnology Information", acesso em 06/10/2022). A disponibilidade dessas sequências proporcionam estudos mais

robustos e confiáveis de reconstrução de árvores filogenéticas, baseadas em várias proteínas ribossomais e proteínas MLSA (*multiple gene/protein-based multilocus sequence analysis*) para identificar características moleculares conservadas que pudessem ser usadas para determinar as inter-relações dentro da ordem (ADEOLU *et al.*, 2016; JANDA; ABBOTT, 2021).

Considerando essas novas árvores filogenéticas, foi proposta a divisão da ordem *Enterobacterales* em 7 novas famílias. Estas famílias são: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae* (ADEOLU *et al.*, 2016; JANDA; ABBOTT, 2021; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022). Os principais gêneros e espécies de importância clínica são: *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* e *Shigella* spp. (MURRAY *et al.*, 2010).

3.2 Epidemiologia

As bactérias da ordem *Enterobacterales* são microrganismos ubiqüitários, encontrados em todo o mundo, no solo, na água e na vegetação. A maioria destes microrganismos tem um comportamento comensal, sendo membros da microbiota normal de homens e animais, mas que podem causar infecções oportunistas nos seres humanos. Eventualmente, tais microrganismos se tornam patogênicos pela presença de fatores de virulência ou por adquirirem genes que codificam fatores de virulência localizados em plasmídeos, bacteriófagos ou ilhas de patogenicidade. Infecções causadas por esse grupo de bactérias podem se originar de um reservatório animal, de um carreador humano ou por meio de transmissão endógena, podendo envolver todos os sítios do corpo (MURRAY *et al.*, 2010). Elas causam uma variedade de doenças em humanos, como infecções do trato urinário (ITU), respiratório, infecções intestinais e bacteremias.

Um estudo feito no Brasil, entre os anos de 2012 e 2017, demonstrou que as *Enterobacterales* são responsáveis por cerca de 47,7% das infecções intra-hospitalares, sendo, *E. coli* (20,7%), *K. pneumoniae* (20,7%) e *Enterobacter* spp. (16,1%), os patógenos mais notificados em infecções cirúrgicas. As ITU são causadas em sua maioria por *E. coli* (33,3%) e *K. pneumoniae* (30,8%), enquanto nas infecções respiratórias, *K. pneumoniae* compõe 24,9% dos casos, seguida de bactérias gram-negativas não-fermentadoras. Por último, cabe destacar as infecções da corrente sanguínea, onde 32,1% têm participação de *K. pneumoniae*, seguida por *Enterobacter* spp. (14,5%) e outras *Enterobacterales* (14,5%) (DIAS *et al.*, 2021).

3.3 *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos amplamente utilizados no mundo todo. Atuam como agentes bactericidas, inibindo a síntese da parede celular bacteriana através da ligação às proteínas ligadoras de penicilina ("Penicillin-binding proteins" - PBPs) (MURRAY *et al.*, 2010).

Por décadas, os carbapenêmicos permaneceram ativos no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas e se mantiveram frequentemente utilizados como terapia empírica em pacientes com infecções graves causadas por esses microrganismos. Isso porque, diferente de outros antimicrobianos da classe, os carbapenêmicos são capazes de manter a eficácia no cenário de resistência às penicilinas (naturais e sintéticas) e às cefalosporinas, em consequência do núcleo β -

lactâmico único que os torna resistentes à hidrólise ou leva a uma hidrólise lenta por muitos tipos de enzimas β -lactamases (HANSEN, 2021).

No entanto, a eficácia dessa terapia antimicrobiana tem sido desafiada nas últimas décadas pela emergência e disseminação da resistência aos carbapenêmicos. Essa resistência está associada a dois mecanismos: (i) aquisição de genes que codificam carbapenemases, ou (ii) diminuição da captação de antibióticos por uma deficiência qualitativa e/ou quantitativa da expressão de porinas em associação com a superexpressão de β -lactamases que possuem afinidade muito fraca para carbapenêmicos (LOGAN; WEINSTEIN, 2017b; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Sem dúvidas, o principal mecanismo, tanto do ponto de vista clínico quanto de saúde pública, é a produção de enzimas carbapenemases (BRINK, 2019; HANSEN, 2021; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012), pela facilidade de disseminação dos seus genes codificadores, através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis. Dessa forma, tais enzimas estão se tornando mais frequentes nas últimas décadas, especialmente, em instituições de cuidados com a saúde, mas também no ambiente comunitário (JEAN; HARNOD; HSUEH, 2022; KELLY; MATHEMA; LARSON, 2017).

De fato, o aumento da prevalência de ERC pode ser observada no mundo todo (CASTANHEIRA *et al.*, 2019; HANSEN, 2021; MURRAY *et al.*, 2022). Na América do Norte, por exemplo, houve um aumento de 1,7% para 5,1% de 2004 a 2005, com um constante aumento nos anos subsequentes (Figura 1). Entre os países europeus, o aumento na prevalência de ERC foi mais um pouco mais tardio, mas não menos relevante. Para Ásia-Pacífico e América Latina, taxas de ERC acima de 5% foram observadas após 2008 e 2010, respectivamente (Figura 1), e continuaram a aumentar desde então (CASTANHEIRA *et al.*, 2019).

Além disso, nos últimos anos, houve um impacto da pandemia de COVID-19 nas infecções associadas a bactérias multidroga-resistentes (MDR). Um estudo observacional retrospectivo feito no Brasil comparou a incidência de infecções causadas por bactérias MDR pré-COVID (2017-2019) e durante a pandemia de COVID-19 (2020) em pacientes hospitalizados e em UTIs. Eles identificaram um aumento de 23% em infecções causadas por bactérias MDR, incluindo ERCs (POLLY *et al.*, 2022).

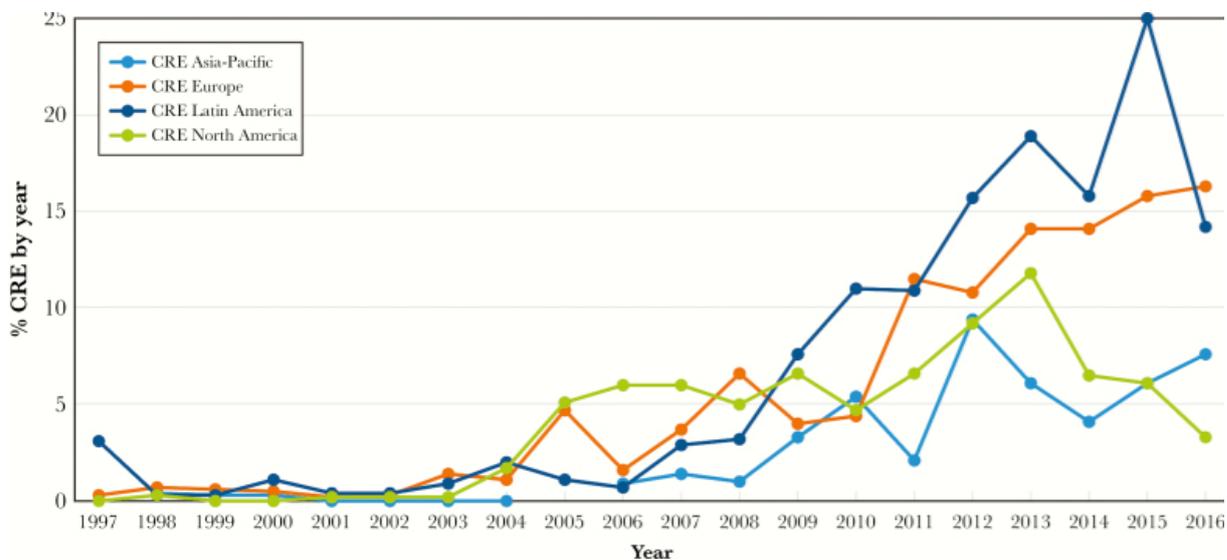


Figura 1: Tendências de isolamento de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos ao longo dos anos por região. CRE – “Carbapenem Resistant *Enterobacteriales*”. Obtido de Castanheira e colaboradores (2019).

Nos casos de bacteremias causadas por ERCs, as infecções foram associadas a um aumento de 75% na probabilidade de mortalidade intra-hospitalar, uma diminuição de quase 40% na probabilidade de receber alta com vida e um aumento no tempo de internação em cerca de 3 dias (PEREZ; BONOMO, 2019; STEWARDSON *et al.*, 2019).

3.3.1 Carbapenemases

A classificação das carbapenemases (Tabela 1), assim como as demais β -lactamases, baseia-se nas características funcionais das enzimas (BUSH; JACOBY, 2010) ou na sua estrutura primária (AMBLER, 1980). A classificação fundamentada na estrutura primária, proposta por Ambler, é a mais utilizada. Esta é baseada em sequências de aminoácidos, enquadrando as carbapenemases em 3 classes: A, B e D (AMBLER, 1980).

Por outro lado, o esquema de classificação funcional leva em consideração os perfis de substrato e inibidores das enzimas, na tentativa de agrupá-las de maneira que possam ser correlacionadas com seu fenótipo em isolados clínicos. Os agrupamentos principais geralmente se correlacionam com a classificação molecular mais ampla, tendo vários novos subgrupos descritos, com base em atributos específicos de enzimas individuais (BUSH; JACOBY, 2010).

Tabela 1: Classificação das principais enzimas carbapenemases em *Enterobacterales*. Adaptado de Bush & Bradford (2020) e Hansen (2021).

Classe de Ambler	Grupo de Bush-Jacob	Enzima	Principais representantes
A	2f	Serino carbapenemase	KPC
B	3a	Metallo β -lactamase	IMP, NDM, VIM
D	2df	OXA carbapenemase	OXA-48

3.3.2 Classe A

As carbapenemases da classe A de Ambler hidrolisam uma ampla variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam, por um mecanismo hidrolítico envolvendo um sítio ativo que contém o aminoácido serina na posição 70 (AMBLER *et al.*, 1991; QUEENAN; BUSH, 2007). Essas enzimas são codificadas por genes plasmidiais e são clinicamente relevantes, pela associação a valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM) de carbapenêmicos. Também, têm grande relevância epidemiológica, uma vez que os genes que as codificam apresentam alto potencial de disseminação (BUSH; BRADFORD, 2020; HUSSEIN *et al.*, 2022; QUEENAN; BUSH, 2007).

As enzimas KPC são as mais importantes da classe, sendo codificadas por muitos membros da ordem *Enterobacterales* (BUSH, 2018; QUEENAN; BUSH, 2007) e são eficientemente inibidas pelos novos inibidores de β -lactamases, como avibactam, relebactam e vaborbactam (CARPENTER *et al.*, 2019; HACKEL *et al.*, 2018; KAZMIERCZAK *et al.*, 2016a). No entanto, isolados que carregam mutantes do gene *bla_{KPC}* podem se tornar resistentes à ceftazidima-avibactam, por exemplo (MOREIRA; CAIERÃO, 2021; WANG *et al.*, 2020).

A KPC foi detectada pela primeira vez em 1996, em um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de um paciente na Carolina do Norte (YIGIT *et al.*, 2001). Subsequentemente, em 1998, a enzima foi identificada em Maryland, em um isolado de *Salmonella enterica* sorotipo Cubana (MIRIAGOU *et al.*, 2003); em quatro pacientes em um hospital de Baltimore (SMITH MOLAND, 2003); e em uma *Klebsiella oxytoca*, em Nova Iorque (YIGIT *et al.*, 2003). Já, o primeiro surto envolvendo microrganismos produtores de KPC ocorreu na cidade de Nova Iorque, entre 2000 e 2001. Foram 14 pacientes infectados, dos quais oito foram a óbito pela infecção (WOODFORD *et al.*, 2004). Na mesma época, alguns hospitais da cidade relataram que quase metade de seus isolados de *K. pneumoniae* carregavam genes *bla_{KPC}* (ABDALLAH *et al.*, 2016). De acordo com o CDC, a partir do ano de 2010, quase todos os estados dos Estados Unidos já haviam relatado casos de organismos produtores de KPC (SIEVERT *et al.*, 2013).

Fora dos Estados Unidos, a produção de KPC foi detectada em um paciente internado em um hospital de Paris, em fevereiro de 2005, por retenção aguda de urina, do qual foi recuperada uma *K. pneumoniae* carregando o gene *bla_{KPC}* em culturas de

urina e sangue (NAAS *et al.*, 2005). Cabe salientar que o paciente havia realizado um procedimento cirúrgico em dezembro de 2004 em um hospital da cidade de Nova Iorque.

Subsequentemente, as KPCs se disseminaram rapidamente por todo o mundo e foram detectadas em praticamente todas as *Enterobacterales* clinicamente relevantes (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). No Brasil, a primeira descrição de KPC envolveu a identificação de quatro *K. pneumoniae* produtoras de KPC, isoladas em uma UTI em 2006 (MONTEIRO *et al.*, 2009). Um estudo posterior revelou que a maioria dos isolados KPC-positivos do Brasil eram KPC-2 do clone ST437, uma variante de *locus* único da ST258/CC258 (ANDRADE *et al.*, 2011; NICOLETTI *et al.*, 2012; SEKI *et al.*, 2011).

Os genes que codificam as KPCs estão localizados em elementos genéticos móveis, como transposons (por exemplo, *Tn4401b*), que podem ser transferidos por plasmídeos de diferentes famílias de incompatibilidade (*IncFII*, *IncL/M* e *IncN*, por exemplo) (BUSH; BRADFORD, 2020; DRAWZ; BONOMO, 2010). Cabe salientar que microrganismos que expressam genes que codificam KPC são frequentemente resistentes a outras classes de antibióticos, como quinolonas e aminoglicosídeos, por exemplo, culminando, assim, em um fenótipo de multirresistência (LOGAN; WEINSTEIN, 2017a; PORRECA; SULLIVAN; GALLAGHER, 2018).

A ocorrência frequente de isolados produtores de KPC deve-se, principalmente, à disseminação clonal, especialmente de *K. pneumoniae* pertencentes ao complexo clonal 258 (CC258), clone mundialmente disseminado. Em uma pesquisa envolvendo *K. pneumoniae* produtoras de KPC coletadas globalmente em 2012, foi observado que 290 (55,6%) de 522 isolados, de 19 países, pertenciam ao CC258 (PEIRANO *et al.*, 2017). Esses isolados foram divididos em dois cladogramas. O clado I da ST258 foi mais frequentemente associado à *bla*_{KPC-2}, enquanto o clado II foi mais frequentemente associado à *bla*_{KPC-3} (PEIRANO *et al.*, 2017).

Até o momento, existem 126 variantes dessa enzima (Beta-Lactamase DataBase, BLDB, acesso em 27/08/2022), sendo as variantes KPC-2 e KPC-3 as mais prevalentes (GARCÍA-BETANCUR *et al.*, 2021; KAZMIERCZAK *et al.*, 2016a; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; VAN DUIN; DOI, 2017).

3.3.3 Classe B

As enzimas da classe B, também conhecidas como metalo- β -lactamases (MBL), requerem um íon metálico bivalente, geralmente zinco, para hidrólise de β -lactâmicos. São capazes de hidrolisar efetivamente todos os antimicrobianos dessa classe, exceto aztreonam, e não são inibidas por inibidores da β -lactamases comercialmente disponíveis (ácido clavulânico, tazobactam, avibactam, vaborbactam e relebactam). Devido à dependência dos íons Zn^{2+} , a catálise é inibida na presença de agentes quelantes de metais como o ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) (QUEENAN; BUSH, 2007; WALSH *et al.*, 2005).

As primeiras MBLs detectadas e estudadas foram enzimas cromossômicas presentes em bactérias oportunistas, tais como *Bacillus cereus* (KUWABARA; ABRAHAM, 1967; LIM; PÈNE; SHAW, 1988), *Aeromonas* spp. (IACONIS; SANDERS, 1990) e *Stenotrophomonas maltophilia* (SAINO *et al.*, 1982). São normalmente isoladas em BGN não-fermentadores da glicose, incluindo *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Entretanto, atualmente, estão cada vez mais associados a membros da ordem *Enterobacterales* (ACMAN *et al.*, 2022; BONOMO *et al.*, 2018; KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017; LOGAN; WEINSTEIN, 2017b; PATEL; BONOMO, 2013).

Um estudo de vigilância incluindo isolados bacterianos coletados em 40 países, de 2012 a 2014, mostrou que as enzimas do tipo NDM (“New Delhi Metallo- β -lactamase”) representaram 44,2% de todas as *Enterobacterales* produtoras de MBL coletadas (KAZMIERCZAK *et al.*, 2016b). Atualmente, a mais frequente e preocupante é a NDM-1, descrita pela primeira vez em 2009, em um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de um paciente na Suécia que já havia sido internado em dois hospitais diferentes na Índia (YONG *et al.*, 2009).

No Brasil, a NDM-1 foi descrita pela primeira vez em 2013, em *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013) e *Enterobacter hormaechei* (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014), recuperados de pacientes internados em um mesmo hospital. Entretanto, foi relatado a ocorrência do gene *bla*_{NDM-1} em *Acinetobacter pittii*, anterior a essas primeiras descrições. Sendo este isolado recuperado em 2012 de um paciente sem histórico de viagens nacionais ou internacionais, ou transferência de outro hospital (DEGLMANN *et al.*, 2019). Desde então, foram relatadas esporadicamente em diferentes regiões do país e em prevalência relativamente muito baixa (DA SILVA

et al., 2019). Entretanto, um aumento consistente e constante na frequência de NDM entre ERC tem sido relatado em algumas regiões do Brasil (ANVISA, 2022; WINK *et al.*, 2021), bem como em outros países (ACMAN *et al.*, 2022; KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017).

3.3.4 Classe D

As β -lactamases da classe D, também conhecidas como oxacilinasas (OXA), compreendem um grupo bastante heterogêneo de enzimas (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Dentro da família OXA, apenas uma pequena fração tem um papel funcional como carbapenemase, como por exemplo, a cada vez mais prevalente, OXA-48 e suas variantes relacionadas (MAIRI *et al.*, 2018).

As OXA carbapenemases geralmente têm atividade hidrolítica contra penicilinas e carbapenêmicos de amplo espectro e são pouco inibidas por inibidores de β -lactamase, exceto pelo avibactam (BUSH, 2018; EHMANN *et al.*, 2013; HAIDAR *et al.*, 2017; LOMOVSKAYA *et al.*, 2017). Particularmente, a OXA-48 hidrolisa um espectro mais estreito de β -lactâmicos, com hidrólise clinicamente relevante de penicilinas e imipenem, e menor hidrólise de meropenem (BONOMO *et al.*, 2018; POIREL *et al.*, 2004; POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). Essa variante foi descrita pela primeira vez em isolados clínicos de *K. pneumoniae* na Turquia e posteriormente disseminou-se pela Europa e região do Mediterrâneo, sendo encontrada com menor frequência nas Américas (MAIRI *et al.*, 2018; POIREL *et al.*, 2004). No Brasil, as oxacilinasas são pouco frequentes e fazem parte do grupo OXA-48-like, sendo a OXA-370 a única variante de OXA-48 descrita até o momento (MAGAGNIN *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2015).

3.4 Métodos para detecção de carbapenemases

3.4.1 Métodos de triagem

Em algumas situações, a CIM dos carbapenêmicos para ERC pode estar abaixo dos pontos de corte clínico da categoria resistente (EUCAST, 2022; NORDMANN *et al.*, 2012), sendo, portanto, classificadas como suscetíveis a essa classe de antimicrobianos pelo antibiograma, teste pelo qual determina-se a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos antimicrobianos. Por isso, os pontos de corte utilizados para a triagem de isolados produtores de carbapenemase são os epidemiológicos (Tabela 2) (ANVISA, 2013; BRCAST, 2018).

Para os testes de triagem, é importante destacar que o meropenem oferece um melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade em termos de triagem de isolados produtores de carbapenemases, enquanto o ertapenem apresenta boa sensibilidade, mas baixa especificidade devido à instabilidade da molécula

(NORDMANN et al., 2012). O resultado positivo do teste de triagem pelos pontos de corte epidemiológicos requerem confirmação com metodologias adicionais, as quais serão descritas a seguir.

Tabela 2: Pontos de corte clínicos e pontos de corte de triagem para a detecção de *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases. Adaptado de BrCAST (2017).

Carbapenêmico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Diâmetro do halo de inibição com disco de $10\mu\text{g}$ (mm)	
	Ponto de corte clínico (S/I)	Ponto de corte triagem	Ponto de corte clínico (S/I)	Ponto de corte triagem
Meropenem	≤ 2	$>0,125$	≥ 22	< 28
Ertapenem	$\leq 0,5$	$>0,125$	≥ 25	< 25

CIM: concentração inibitória mínima; S: sensível; I: intermediário.

3.4.2 Teste de disco combinado

Os testes fenotípicos são, ainda hoje, utilizados pela maioria dos laboratórios de microbiologia em todo o mundo, por serem métodos de baixo custo e de simples execução (DOYLE *et al.*, 2012; GISKE *et al.*, 2011; VADING *et al.*, 2011). No teste de disco combinado, os carbapenêmicos são combinados com inibidores de carbapenemases específicos, sendo o ácido fenilborônico (AFB) utilizado para a inibição de carbapenemases da classe A e o ácido dipicolínico ou EDTA para inibir as carbapenemases da classe B. O teste é considerado positivo quando há diferença de, pelo menos, 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos com e sem o inibidor (ANVISA, 2013). Embora a OXA-48 seja inibida pelo avibactam, ele ainda não foi incluído nos painéis fenotípicos (HUANG *et al.*, 2014; PORRES-OSANTE *et al.*, 2014). A interpretação do resultado é demonstrada na Tabela 3 e Figura 2.

Tabela 3: Esquema de interpretação do teste de disco combinado.

Resultado do teste	Interpretação
Teste positivo com AFB	Carbapenemase da classe A
Teste positivo com EDTA	Carbapenemase da classe B
Teste negativo com EDTA, AFB e CLOXA	Oxa-48 ou deficiência de porina

AFB: ácido fenilborônico; EDTA: ácido etilendiamino tetra acético; CLOXA: cloxacilina.

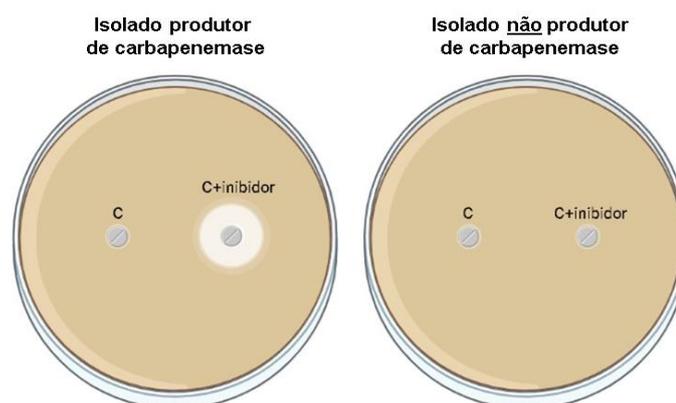


Figura 2: Exemplo de interpretação do resultado do teste de disco combinado. C: carbapenêmico.

A principal desvantagem desse método é a necessidade de 18-24h para a obtenção do resultado (após crescimento bacteriano no meio de cultura sólido, que exige 18-24h, e antibiograma, o qual requer mais 18-24h de incubação), razão pela qual métodos alternativos, mais rápidos, têm sido propostos (HUANG *et al.*, 2014; LEE

et al., 2022; NORDMANN *et al.*, 2012, 2020a; TAMMA *et al.*, 2017). Para além da questão temporal, outras desvantagens desses métodos fenotípicos clássicos, utilizando inibidores enzimáticos, incluem a dificuldade de interpretação, não diferenciam entre os tipos de cada classe (como NDM, IMP e VIM), a variabilidade na sensibilidade/especificidade entre diferentes espécies e a incapacidade de detecção direta de OXA carbapenemases (ALTAMIMI *et al.*, 2017).

3.4.3 Método de inativação de carbapenêmicos

O método de inativação do carbapenêmico (MIC) tem como princípio a detecção da hidrólise enzimática após incubação da suspensão bacteriana do isolado a ser testado com um disco de papel filtro de carbapenêmico (Figura 3). Após duas horas de incubação, o disco é aplicado em placa de agar Mueller-Hinton, inoculada com *E. coli* ATCC 25922, suscetível aos carbapenêmicos. Se houve a inativação enzimática pelo isolado testado, não será observada a esperada zona de inibição de crescimento da ATCC, enquanto a ausência de atividade de carbapenemase implicará na presença de halo de inibição, já que o carbapenêmico no disco não foi hidrolisado (VAN DER ZWALUW *et al.*, 2015a). O teste apresentou desempenho variável em diferentes estudos (TIJET; PATEL; MELANO, 2016; VAN DER ZWALUW *et al.*, 2015b; YAMADA *et al.*, 2016), mas continua sendo uma alternativa possível, embora o valor preditivo negativo do teste ainda não esteja claro. Uma das principais desvantagens desta técnica é a necessidade de incubação *overnight* para a obtenção dos resultados. A variante desta técnica, o eMIC, incuba o isolado teste na presença de EDTA e, realizado concomitantemente ao MIC, permite a identificação de metalo β -lactamase (BRCAST, 2018).

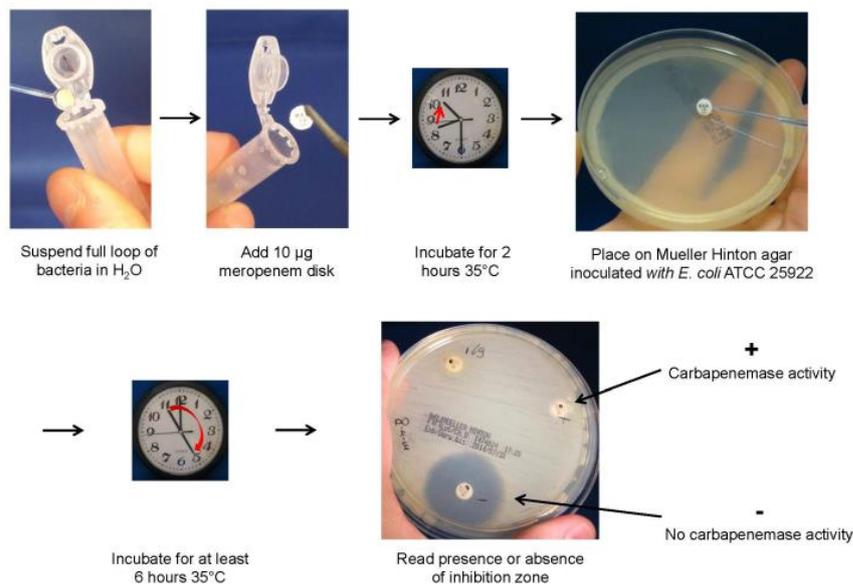


Figura 3: Esquema de realização e interpretação do método de inativação de carbapenêmicos. Obtido de Van Der Zwaluw (2015b).

3.4.4 Métodos bioquímicos colorimétricos

O teste Carba NP, e seus derivados como o Blue-Carba, são métodos bioquímicos colorimétricos para detecção de enzimas carbapenemases, os quais se baseiam na diminuição do pH resultante da hidrólise do anel β -lactâmico dos carbapenêmicos, o que é detectado utilizando um indicador de pH (Figura 4). O teste é realizado a partir de colônias crescidas em meios de cultura sólidos e exige um período de 2-4h para a obtenção dos resultados (NORDMANN *et al.*, 2020a; NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012; OVIAÑO; BOU, 2018; PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013). Sistemas automatizados para leitura de métodos bioquímicos também estão disponíveis (HOMBACH *et al.*, 2015; THOMSON *et al.*, 2017).

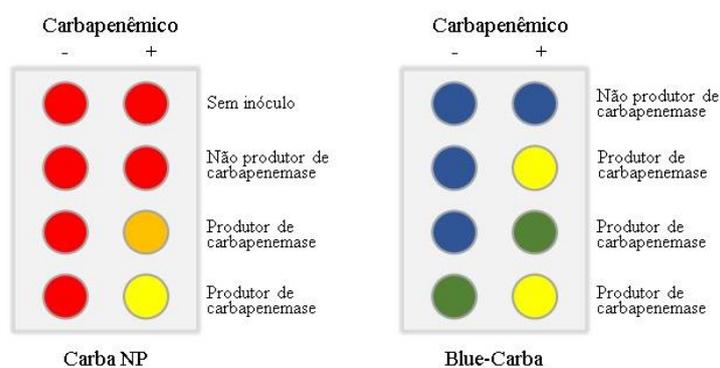


Figura 4: Métodos bioquímicos Carba NP e Blue-Carba. Observa-se o crescimento bacteriano (mudança de cor), na presença do antibiótico, onde há produção de enzima carbapenemase.

Esse teste possui bons resultados (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012; PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013; TAMMA *et al.*, 2017), porém, nas suas versões originais, não se pode estabelecer o tipo de carbapenemase presente no isolado bacteriano testado. Tal informação, além da relevância epidemiológica, reveste-se de particular importância no contexto da utilização de novas combinações de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases, como ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam e meropenem-vaborbactam, onde reconhecer o tipo de enzima produzido pela bactéria é essencial para a adequada e efetiva utilização desses novos compostos. Entretanto, já existem versões mais recentes que permitem essa diferenciação do tipo da carbapenemase presente, porém, ainda necessitam mais avaliações (NORDMANN *et al.*, 2020b; WANG *et al.*, 2021).

3.4.5 Métodos moleculares

Os testes fenotípicos podem detectar de forma eficiente a produção de carbapenemases; entretanto, conforme previamente mencionado, os resultados

destes testes são geralmente liberados em um prazo muito longo, reduzindo seu impacto clínico e epidemiológico. Além disso, existem situações em que o fenótipo é pouco expresso ou há necessidade de identificar os genes envolvidos na produção de carbapenemases. Nesse sentido, as técnicas moleculares continuam sendo o padrão de referência para a identificação e diferenciação de carbapenemases (NORDMANN *et al.*, 2012). A maioria é baseada em reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction” – PCR), simples ou multiplex, e pode ser seguida de sequenciamento, se necessário, para identificação precisa de uma carbapenemase (AVLAMI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011; POIREL *et al.*, 2011).

A técnica de PCR realizada a partir de colônias é considerada referência para identificação e diferenciação de carbapenemases, podendo dar resultados em 4 a 6 h (ou menos, no caso da PCR em tempo real). O sequenciamento de produtos da PCR é interessante principalmente para fins epidemiológicos. A principais desvantagens das tecnologias de base molecular para detecção de genes de carbapenemases, é que essas reações são capazes apenas de detectar genes com sequências já reconhecidas, o que implica em dizer que novos alelos não serão detectados (NORDMANN *et al.*, 2012; VIVAN *et al.*, 2017).

3.4.6 Imunocromatografia

Além dos testes colorimétricos, metodologias que utilizam imunocromatografia, em reações únicas ou multiplex, capazes de detectar diferentes carbapenemases estão disponíveis (Figura 5). Elas se baseiam em reações do tipo antígeno-anticorpo e são testes rápidos, práticos, e específicos, além de serem um dos únicos que detectam duplo gene de carbapenemase. Eles têm se demonstrado bastante acurados e são capazes de gerar resultados em 15 minutos, porém, ainda possuem um custo elevado por teste (aproximadamente US\$ 15,00 por amostra) (BAEZA *et al.*, 2019; BOUTAL *et al.*, 2018).



Figura 5: Exemplo de teste imunocromatográfico comercialmente disponível para detecção de KPC, OXA-48, IMP, VIM e NDM. Obtido de: <https://www.ngbiotech.com>

3.4.7 Espectrometria de massas MALDI-TOF

Nos últimos anos, a espectrometria de massas, através da metodologia de MALDI-TOF ganhou um grande destaque dentro dos laboratórios de microbiologia (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; CORREA-MARTÍNEZ *et al.*, 2020; FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2022; TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020; YOON; JEONG, 2021; ZABBE *et al.*, 2015). Essa técnica baseia-se na ionização de moléculas orgânicas por dessorção a laser assistida por uma matriz, seguida pela detecção em um analisador do tempo de voo (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

Acontece da seguinte forma (Figura 6): há a deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de adicionar prótons a essa molécula para o processo de ionização de seus componentes. A absorção da energia emitida por um laser gera a transferência dos prótons da matriz para os componentes da amostra, culminando em um processo de dessorção, o que permite a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. A amostra, agora dessorvida e ionizada, passa por um tubo a vácuo onde os componentes são acelerados através de um campo elétrico, até atingir um detector. Nesse tubo, os componentes da amostra são separados de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e chegam em tempos diferentes no detector. Esses

resultados se refletem em diferentes picos, gerando um espectro característico de uma espécie ou gênero bacteriano (MARVIN; ROBERTS; FAY, 2003).

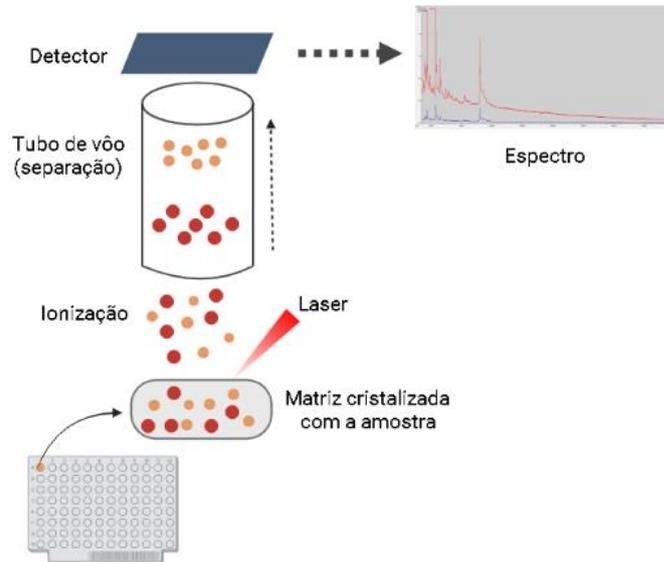


Figura 6: Esquema demonstrando o funcionamento do MALDI-TOF MS. Criado com BioRender.com

Como citado anteriormente, apesar de aquisição do equipamento apresentar custo muito elevado, os custos operacionais são baixíssimos. Além disso, possui um *workflow* simples, não exigindo pessoal especializado e permitindo a identificação de uma bactéria a partir de cultura em meio sólido em cerca de 5 minutos. Existem dois equipamentos disponíveis no mercado nacional brasileiro, o VITEK[®] MS (bioMérieux) e o MALDI Biotyper CA System (Bruker Daltonics), ambos aprovados pela ANVISA para uso nos laboratórios de microbiologia, para a identificação de microrganismos.

Sendo assim, comparado com os métodos usuais, a técnica de MALDI-TOF MS reduz o tempo de identificação do microrganismo em cultura em, pelo menos, 20h (HUANG *et al.*, 2013). Além disso, o MALDI-TOF tem sido adaptado para a identificação direta de microrganismos em frascos de hemocultura positivas de pacientes com suspeita de bacteremia, o que diminui ainda mais o tempo necessário para a identificação da bactéria (AZRAD *et al.*, 2019; CURTONI *et al.*, 2017; DELPORT *et al.*, 2017; DI GAUDIO *et al.*, 2018; LA SCOLA; RAOULT, 2009).

Mais recentemente, a detecção de resistência aos antimicrobianos, em particular aos carbapenêmicos, utilizando o sistema MALDI-TOF MS também vem sendo estudada para aplicação na microbiologia clínica. Duas das abordagens mais

promissoras são a determinação da presença de carbapenemases pela observação da hidrólise do carbapenêmico, e a detecção direta da enzima carbapenemase (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020), as quais serão discutidas a seguir.

3.4.7.1 Hidrólise de carbapenêmicos

O *MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance-βLactamase* (MBT STAR-BL, Bruker Daltonics) é uma metodologia que mede a atividade das β-lactamases analisando a hidrólise dos antibióticos β-lactâmicos. Esse ensaio exige um curto tempo de incubação (máximo 4h) e está baseado na observação do pico da molécula do antimicrobiano intacto, no caso de bactérias suscetíveis, e na detecção de picos correspondentes aos subprodutos da hidrólise do carbapenêmico, quando a bactéria for produtora de carbapenemases, conforme já descrito anteriormente (Figura 7). Para isso, a bactéria, após ser cultivada em meio de cultura sólido, é incubada em solução com o antimicrobiano, a fim de observar o resultado dessa interação, observando os picos referentes à degradação do meropenem (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; JUNG *et al.*, 2014).

Existem vários estudos demonstrando excelentes resultados e comprovando a utilidade dessa metodologia, com diferentes tempos de incubação (de 20 minutos a 4 horas), avaliando diferentes antimicrobianos e espécies (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; CARVALHAES *et al.*, 2014; KAWAMOTO *et al.*, 2018, 2019; YU *et al.*, 2018a). Além disso, também foram desenvolvidas e avaliadas diferentes formas de interpretação da análise do espectro para determinar a ocorrência de hidrólise. Entretanto, a maioria dos estudos baseiam-se na observação visual de picos, o que pode levar a uma avaliação inconclusiva (DABOS *et al.*, 2022; OUESLATI; NORDMANN; POIREL, 2015; POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012; TAMMA; SIMNER, 2018).

Uma alternativa para a avaliação visual é a utilização das intensidades dos respectivos picos para calcular o valor logRQ (medida de eficiência da hidrólise). O logRQ é o logaritmo da razão entre a intensidade somada das formas hidrolisadas e a intensidade somada das formas não hidrolisadas. Valores de logRQ mais altos indicam um grau mais alto de hidrólise do antibiótico (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019).

Apesar desta metodologia não conseguirem identificar especificamente qual é a enzima responsável pela hidrólise, a realização em um curto espaço de tempo e uma medida quantitativa, como o logRQ, são boas vantagens sobre os métodos fenotípicos com indicador de pH, visto que bactérias com baixa expressão do gene de carbapenemase ou cuja enzima possua baixo poder hidrolítico poderiam ser detectados através de uma quantificação.

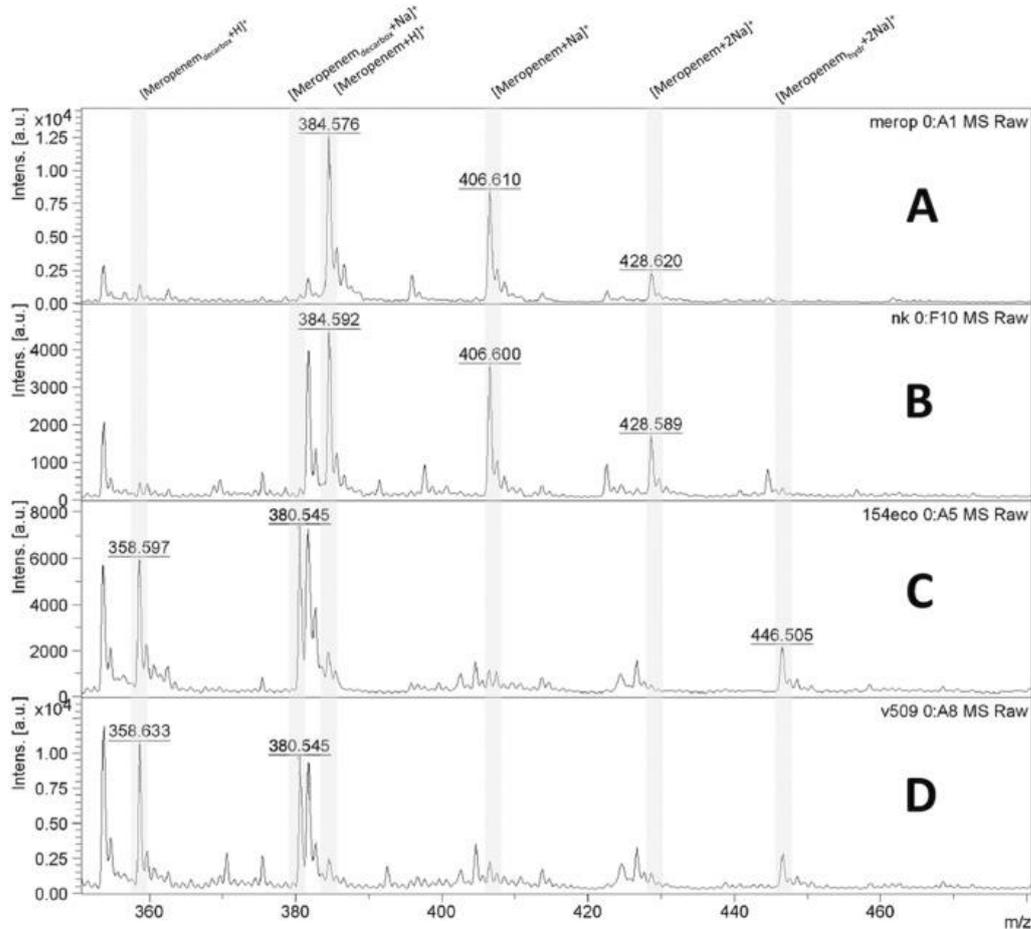


Figura 7: Espectro do MALDI-TOF MS mostrando o meropenem, seus sais de sódio e seus produtos de degradação. (A) Espectro da solução de meropenem. (B) Controle negativo (isolado não produtor de carbapenemases de *Klebsiella pneumoniae*). (C) *Escherichia coli* produtora de NDM-1. (D) *Acinetobacter baumannii* produtora de NDM-1. [Meropenem_{decarbox}+H]⁺, produto de degradação descarboxilado do meropenem após hidrólise pela carbapenemase (m/z 358,5); [Meropenem_{decarbox}+Na]⁺, sal monossódico descarboxilado do produto de degradação do meropenem após hidrólise (m/z 380,5); [Meropenem+H]⁺, molécula de meropenem (m/z 384,5); [Meropenem+Na]⁺, sal monossódico de meropenem (m/z 406,5); [Meropenem+2Na]⁺, sal dissódico de meropenem (m/z 428,5); [Meropenem_{idr}+2Na]⁺, sal dissódico do produto de degradação do meropenem após hidrólise (m/z 446,5). Obtido de Hrabák e colaboradores (2012).

3.4.7.2 Detecção direta de enzimas carbapenemases

A detecção direta de enzimas carbapenemases é feita pela análise do perfil proteico gerado pelo MALDI-TOF MS (OVIAÑO; BOU, 2018). Previamente à detecção das carbapenemases, Camara & Hays (2007) foram os primeiros a detectar picos correspondentes à β -lactamases tipo TEM-1, analisando o espectro de proteínas em lisado bacteriano de *E. coli* suscetíveis e resistentes a ampicilina. Na sequência, Papagiannitsis e colaboradores (2014) detectaram CMY-2, uma β -lactamase capaz de hidrolisar cefalosporinas, em diferentes enterobactérias após extração de proteínas periplasmáticas utilizando um protocolo complexo. Mais recentemente, Espinosa e colaboradores (2018) otimizaram o protocolo de extração e detectaram um pico correspondente a CMY-2 analisando o espectro de proteínas diretamente obtido de lisado celular de *E. coli* e outras enterobactérias que apresentavam resistência às cefalosporinas de terceira geração.

Esses achados abriram caminho para que Figueroa-Espinosa e colaboradores (2019) desenvolvessem um protocolo para a detecção direta das carbapenemases do tipo KPC-2. De acordo com os autores, um pico característico de cerca de 28544 Da (Figura 8) foi observado em todos os isolados de enterobactérias previamente caracterizadas como KPC-2 positivas, ao passo que, para todas as bactérias não produtoras de KPC-2, tal pico não foi observado. Além disso, os autores propuseram a detecção da enzima diretamente de frascos de hemocultura positiva de pacientes com suspeita de bacteremia, sendo possível verificar o pico de 28544 Da em todos os isolados produtores de KPC-2, sendo necessária aproximadamente 1h para a obtenção do resultado. Entretanto, uma avaliação mais ampla se faz necessária, uma vez que os autores avaliaram apenas 39 amostras de hemoculturas e, somente 16 positivas com isolados produtores de KPC-2.

Posteriormente, Yoon e colaboradores (2020) determinaram que a massa molecular exata da proteína KPC-2 intacta é de 28718 Da e que as variantes da KPC têm massa entre 28708–28728 Da (Figura 9). Segundo os autores, foi possível verificar o pico característico da KPC e estabelecer um ponto de corte de intensidade dos íons ($i \geq 110$ unidades arbitrárias [u.a.]) para os mesmos, apresentando excelente sensibilidade e especificidade (91,8% e 99,5%, respectivamente).

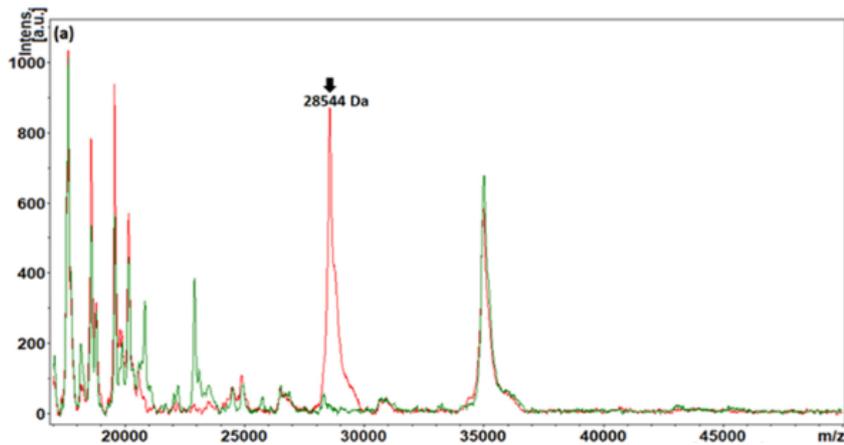


Figura 8: Espectro de massa do isolado produtor de KPC-2 e não-KPC-2. Detecção de pico de ~28544 Da em *E. coli* com plasmídeo recombinante (*E. coli* TOP10 + pKPC-2-4) é indicado pela linha vermelha; A ausência do pico de ~28544-m/z na cepa receptora (*E. coli* TOP10 + pK19) é indicada pela linha verde. O pico correspondente a KPC-2 está indicado com setas. Obtido de Figueroa-Espinosa e colaboradores (2019).

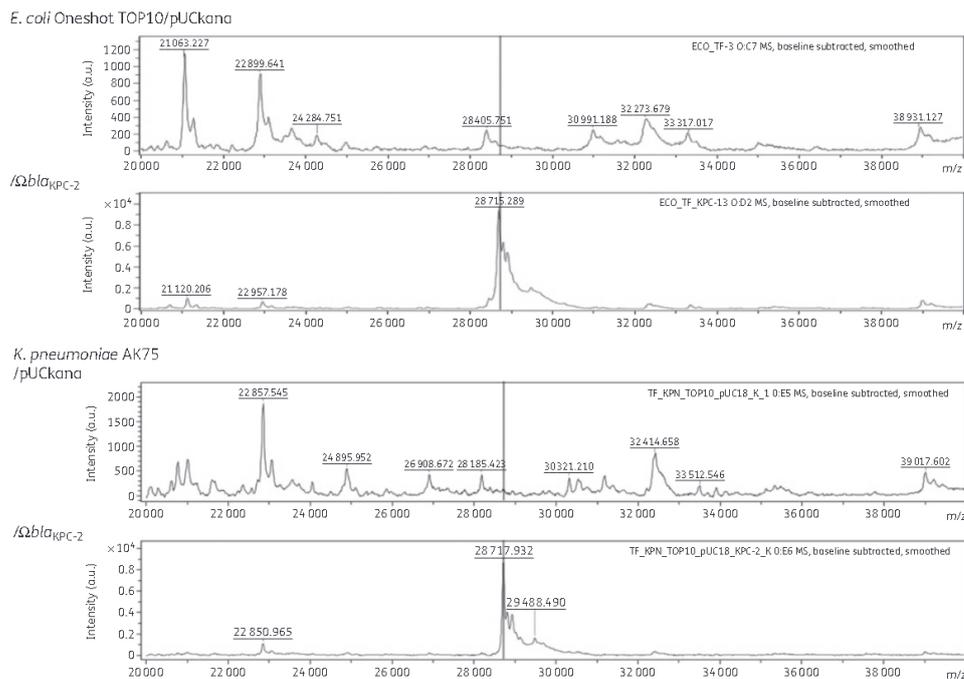


Figura 9: Espectro de massa da KPC transformante. O vetor pUCkana vazio e contendo o gene pUCkana Ω blaKPC-2 foram introduzidos nas cepas de *E. coli* TOP10 e *K. pneumoniae* AK75 e os espectros de massa foram obtidos usando MALDI-TOF. Os eixos x e y indicam valores de m/z e intensidades, respectivamente, e a linha vertical representa m/z 28718,13, a m/z teórica do polipeptídeo KPC-2. Obtido de Yoon e colaboradores (2020).

A metodologia para detecção direta da enzima KPC demonstrou excelentes resultados, entretanto necessita de uma avaliação mais ampla, para fins de padronização em diferentes equipamentos de diferentes laboratórios.

4 MANUSCRITOS

4.1 Manuscrito 1

Manuscrito a ser submetido ao periódico “Journal of Microbiological Methods”. Esse documento responde ao objetivo (a) do projeto original.

O texto completo do item 3.5, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 45 – 76, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da utilização da hidrólise de meropenem para detectar a produção de carbapenemases diretamente de hemoculturas positivas utilizando o logRQ para estabelecer uma medida quantitativa de hidrólise. As proteínas bacterianas obtidas a partir de uma alíquota de frascos de hemocultura positivos foram incubadas em solução de meropenem seguida de extração de proteínas para análise de MALDI-TOF MS. A intensidade dos picos das formas hidrolisada e não hidrolisada foi utilizada para calcular o valor logRQ.

4.2 Manuscrito 2

Manuscrito publicado no periódico “Brazilian Journal of Microbiology” Esse documento responde ao objetivo (b) do projeto original.

O Item 3.6 é constituído por artigo científico publicado (doi: 10.1007/s42770-022-00798-y, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 77 – 88.

4.3 Manuscrito 3

Manuscrito submetido ao periódico “Journal of Antimicrobial Chemotherapy”. Esse documento responde ao objetivo (c) do projeto original.

O texto completo do item 3.7, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 89 – 118, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da detecção da enzima KPC diretamente de frascos de hemocultura positivos, utilizando o MALDI-TOF MS. As proteínas foram extraídas com ácido fórmico, álcool isopropílico e água (17:33:50). O extrato de proteínas foi adicionado na placa do equipamento utilizando a técnica da dupla camada de ácido sinapínico, submetido à leitura e posterior análise.

5 DISCUSSÃO GERAL

As carbapenemases são o principal e o mais preocupante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacterales* (BUSH; BRADFORD, 2020; HUSSEIN *et al.*, 2022). No cenário atual, onde combater a resistência antimicrobiana é uma das 10 prioridades globais de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021), a rápida identificação bacteriana e detecção de resistência aos carbapenêmicos mediada por carbapenemases são fundamentais para estabelecer a antibioticoterapia mais adequada, visando otimizar o desfecho clínico do paciente, assim como controlar a disseminação de ERC, além de otimizar as estratégias de *stewardship* (NAUCLÉR *et al.*, 2021; RICE, 2018; TARIQ; RASOOL, 2016).

Nos últimos anos, tem sido demonstrada a possibilidade de prever a produção de carbapenemase com base na detecção da hidrólise de carbapenêmicos (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; YU *et al.*, 2018b), ou, mais recentemente, a detecção direta da enzima responsável pela resistência, através da metodologia de MALDI-TOF MS (FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020).

Os testes envolvendo hidrólise já estão mais consolidados na literatura científica mundial. No entanto, na maioria dos casos, a técnica foi realizada a partir de colônias bacterianas crescidas em meios de cultura sólidos. Assim, considerando a urgência de liberação de resultados de suscetibilidade aos antimicrobianos, imposta nos casos de infecções na corrente sanguínea, o experimento foi realizado diretamente de frascos de hemoculturas positivas, por ter sido observada uma escassez de dados referente a essa variação da metodologia de hidrólise dos carbapenêmicos utilizando MALDI-TOF MS. Ao invés de considerar a presença ou ausência dos picos referentes ao antimicrobiano ou aos seus produtos de degradação, o logRQ foi calculado, como medida de eficiência hidrolítica, afim de gerar uma forma de análise de resultado não-ambígua, o que pode facilitar a utilização mais ampla da metodologia em questão.

Assim, foi observada, de forma geral 89,5% de especificidade e 84,6% de sensibilidade. Cabe salientar que a sensibilidade variou consistentemente de acordo com o tipo de enzima avaliada (bla_{KPC} = 97,9%, bla_{NDM-1} = 58,8% e $bla_{OXA-48-like}$ = 60,0%). Resultados falsos negativos (CIM \leq 0,5 a 8 μ g/mL) podem ser consequência de uma baixa expressão de enzimas ou uma capacidade hidrolítica reduzida, o que já é bem

reconhecido, principalmente para OXA-48-like (DABOS *et al.*, 2022; OUESLATI; NORDMANN; POIREL, 2015) e foi reiterado pelos nossos resultados. Por outro lado, os isolados, para os quais foram observados resultados falso positivos, podem carrear genes de carbapenemase não incluídos na reação de HRM-qPCR, o que, à propósito, configura-se como uma limitação deste estudo. Da mesma forma, uma hidrólise inespecífica do carbapenêmico pode ocorrer, considerando a instabilidade dessas moléculas.

O tempo de incubação exigido para a observação da hidrólise também apresentou variação para os diferentes tipos enzimas, uma vez que a maioria dos isolados KPC-positivos apresentaram hidrólise do carbapenêmico em 2h, enquanto NDM e OXA-48-like exigiram 4h de incubação. Tais resultados corroboram com outros estudos já realizados (AKYAR; KAYA AYAS; KARATUNA, 2019; CARVALHAES *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2018b). Essa diferença também pode ser observada quando considerado o ao intervalo de variação do log RQ ($bla_{KPC} = 0,16$ a $1,79$, $bla_{NDM-1} = -1,73$ a $0,96$ e $bla_{OXA-48-like} = -1,37$ a $1,13$).

Deve-se mencionar as limitações da detecção da atividade das carbapenemases pela observação da hidrólise do carbapenêmico, quais sejam: possibilidade de hidrólise inespecífica do carbapenêmico, dificuldade de detecção de enzimas com baixa atividade hidrolítica e necessidade de incubação por, pelo menos, 2h para a obtenção dos resultados. Assim, metodologias destinadas a pesquisar o pico correspondente à enzima através do MALDI-TOF poderiam sobrepor, pelo menos parcialmente, tais limitações.

Até o momento, salvo engano, apenas 2 estudos foram realizados para a detecção do pico da KPC, enzima com maior importância epidemiológica atualmente, com abordagens diferentes (FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020). Para nosso estudo, foi utilizado o protocolo de extração de proteínas estabelecido por Figueroa-Espinosa e colaboradores (2019), por ser factível e rápido. Em relação à massa da KPC, foram utilizados como referência valores determinados por Yoon e colaboradores (2020). O experimento foi realizado, inicialmente, a partir de colônias bacterianas crescidas em meio de cultura sólido. Essa etapa teve como objetivo testar se a metodologia era factível e, também, padronizá-la para o nosso equipamento, modificando alguns parâmetros do MALDI-TOF MS.

Nesse primeiro momento foram avaliados 300 isolados, selecionados por conveniência, e estabelecido como parâmetro a presença do pico da KPC e a intensidade do mesmo. Para a intensidade, foi estabelecido um valor ponto de corte ≥ 120 (u.a.), referente ao pico proteico da enzima KPC, obtendo excelentes resultados (98,09% de sensibilidade e 97,90% de especificidade) em menos de uma hora, reiterando os resultados previamente publicados (FIGUEROA-ESPINOSA *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020).

Em um segundo momento, na tentativa de reduzir ainda mais o tempo necessário para a detecção desse mecanismo de resistência, 100 isolados foram selecionados para detecção da enzima diretamente de frascos de hemocultura, mimetizando hemoculturas positivas. Uma extração rápida a partir da hemocultura foi realizada para obtenção da massa bacteriana, a qual foi submetida à extração de proteínas. Os mesmos parâmetros previamente padronizados foram utilizados. Ao considerar a intensidade previamente estabelecida, com valor de corte ≥ 120 (u.a.), a sensibilidade foi de 94,9% e a especificidade de 95,3%. Além disso, propusemos uma zona “tampão”, com valores intermediários de intensidade (115 a 125 [u.a.]), a fim de criar uma medida não ambígua para discriminar entre produtores e não produtores de KPC.

Nossos resultados corroboram para uma futura implementação das metodologias analisadas na rotina dos laboratórios clínicos, já que a demora para liberação dos resultados é uma das principais questões a serem enfrentadas atualmente. De fato, a maioria dos métodos de detecção de carbapenemases implementados até o momento requer crescimento bacteriano e/ou não determina qual o tipo de carbapenemase presente, exceto pelos métodos moleculares, o que pode ter impacto clínico no contexto da utilização das novas combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases.

Nesse sentido, a detecção da hidrólise de carbapenêmico direto de garrafas de hemoculturas é uma metodologia rápida, porém, não é capaz de determinar o tipo de carbapenemase. Por outro lado, a detecção do pico referente a enzima KPC não é capaz de identificar a presença de outras enzimas, o que pode ser clinicamente relevante quando se considera isolados produtores de metalo- β -lactamases ou coprodutores de KPC e NDM, por exemplo. Entretanto, a decisão de realizar qualquer

ensaio diagnóstico, depende, de forma importante, da epidemiologia. Em países com alta prevalência de carbapenemases, informações adicionais sobre a produção do gene da carbapenemases são importantes e auxiliam no tratamento. Por outro lado, em um cenário de baixa endemicidade, o teste para carbapenemases específicas pode não ser necessário e pode ser reservado apenas para pacientes com fatores de risco, como pacientes colonizados por ERC ou aqueles que foram transferidos de uma região de alto risco.

Portanto, a detecção da hidrólise do carbapenêmico direto de frascos de hemoculturas através do MALDI-TOF MS, assim como a detecção do pico de KPC, são metodologias rápidas, de baixo custo uma vez adquirido o equipamento, e de fácil execução.

6 CONCLUSÃO GERAL

A metodologia de MALDI-TOF MS é, sem dúvidas, uma grande revolução no campo da microbiologia clínica moderna, permitindo uma rápida identificação microbiana. Além disso, está claro que essa metodologia pode ser ainda mais explorada, como para a detecção de mecanismos de resistência, seja pela hidrólise ou pela detecção direta da enzima que leva à resistência. Todos os objetivos propostos foram atingidos e, de acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que:

- ✓ É possível utilizar o logRQ como medida de eficiência hidrolítica para detecção da hidrólise do carbapenêmico diretamente de amostras hemoculturas.
- ✓ É possível detectar a presença da enzima KPC em isolados bacterianos crescidos em meio de cultura sólido, com ótimos resultados de sensibilidade e especificidade;
- ✓ É possível detectar a presença da enzima KPC diretamente de amostras de hemoculturas positivas, com ótimos resultados de sensibilidade e especificidade

7 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. *et al.* Rise and fall of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in New York City. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2945–2948, 2016.

ACMAN, M. *et al.* Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene *bla*_{NDM}. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1131, 2022.

ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

AKYAR, I.; KAYA AYAS, M.; KARATUNA, O. Performance evaluation of MALDI-TOF MS MBT STAR-BL versus in-house Carba NP testing for the rapid detection of carbapenemase activity in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 7, p. 985–990, 2019.

ALTAMIMI, M. *et al.* Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by *Enterobacteriaceae*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 155–161, 2017.

AMBLER, R. P. *et al.* A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal**, v. 276, n. 1, p. 269–270, 1991.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

ANDRADE, L. N. *et al.* Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII,

IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 01/2013**. Brasília, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/notas-tecnicas>. Acesso em: 20 mai. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 74/2022-CGLAB/DAEVS/SVS/MS**. Brasília, 2022. Disponível em: <http://brcast.org.br>. Acesso em: 04 out. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **RE Nº 1.635**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/>. Acesso em: 3 out. 2019.

AVLAMI, A. *et al.* Detection of metallo- β -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 185–187, 2010.

AZRAD, M. *et al.* Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 72, 2019.

BAEZA, L. L. *et al.* Comparison of five methods for detection of carbapenemases in *Enterobacteriales* with proposal of a new algorithm. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 10, p. 1286.e9-1286.e15, 2019.

BONOMO, R. A. *et al.* Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 8, p. 1290–1297, 2018.

BOUTAL, H. *et al.* A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 909–915, 2018.

BRADLEY, N.; LEE, Y. Practical implications of new antibiotic agents for the treatment of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Microbiology Insights**, v. 12, p. 1–4, 2019.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BRCAST. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica - Versão para o Português**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://brcast.org.br>. Acesso em: 04 out. 2022.

BRENNER, D. J. *et al.* **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 2005. 2 v.

BRINK, A. J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, p. 609–616, 2019.

BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. e00047-19, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CAMARA, J. E.; HAYS, F. A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 5, p. 1633–1638, 2007.

CARPENTER, J. *et al.* Activity of imipenem/relebactam against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high colistin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 11, p. 3260–3263, 2019.

CARVALHAES, C. G. *et al.* Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 8, p. 2132–2136, 2014.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. *et al.* Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and *qnrB4* -producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475–2476, 2014.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among *Enterobacteriaceae* isolates in 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S23–S33, 2019.

CHEN, L. *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla_{KPC}*) variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 579–585, 2011.

CORREA-MARTÍNEZ, C. L. *et al.* Development of a MALDI-TOF MS-based screening panel for accelerated differential detection of carbapenemases in *Enterobacterales* using the direct-on-target microdroplet growth assay. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4988, 2020.

CURTONI, A. *et al.* Rapid identification of microorganisms from positive blood culture by MALDI-TOF MS after short-term incubation on solid medium. **Current Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 97–102, 2017.

DA SILVA, I. R. *et al.* Distribution of clinical NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 394–399, 2019.

DABOS, L. *et al.* To be or not to be an OXA-48 carbapenemase. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 258, 2022.

DEGLMANN, R. C. *et al.* Earliest identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) in *Acinetobacter pittii* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180348, 2019.

DELPORT, J. A. *et al.* MALDI-TOF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 7, p. 1181–1186, 2017.

DI GAUDIO, F. *et al.* Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with SepsiTyper kit. **Journal of Microbiological Methods**, v. 155, p. 1–7, 2018.

DIAS, V. M. de C. H. *et al.* Active surveillance of carbapenem-resistant Gram-negative healthcare-associated infections in a low-middle-income country city. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 101540, 2021.

DORTET, L. *et al.* Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n.12, p. 3359–3367, 2018.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3773–3776, 2012.

DOYLE, D. *et al.* Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, 2012.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 2010.

EHMANN, D. E. *et al.* Kinetics of avibactam inhibition against class A, C, and D β -lactamases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 39, p. 27960–27971, 2013.

ESPINOSA, R. F. *et al.* Fast and easy detection of CMY-2 in *Escherichia coli* by direct MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 148, p. 22–28, 2018.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - EUCAST. **Website with MIC-distributions**. 2022. Disponível em: <https://mic.eucast.org/>. Acesso em: 20 maio 2022.

FIGUEROA-ESPINOSA, R. *et al.* MALDI-TOF MS based procedure to detect KPC-2 directly from positive blood culture bottles and colonies. **Journal of Microbiological Methods**, v. 159, p. 120–127, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Avycaz Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s)**. Maryland, 2015. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov>. Acesso em: 4 out. 2019.

GARCÍA-BETANCUR, J. C. *et al.* Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 2, p. 197–213, 2021.

GISKE, C. G. *et al.* 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. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 552–556, 2011.

HACKEL, M. A. *et al.* *In vitro* activity of meropenem-vaborbactam against clinical isolates of KPC-positive *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01904-17, 2018.

H Aidar, G. *et al.* Identifying spectra of activity and therapeutic niches for ceftazidime-avibactam and imipenem-relebactam against carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, p. e00642-17, 2017.

HANSEN, G. T. Continuous evolution: perspective on the epidemiology of carbapenemase resistance among *Enterobacterales* and other Gram-negative bacteria. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 75–92, 2021.

HO, S. *et al.* Recognizing and overcoming resistance to new beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, n. 39, 2019.

HOMBACH, M. *et al.* Evaluation of the rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3828–3833, 2015.

HUANG, T. D. *et al.* Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 252–254, 2014.

HUANG, A. M. *et al.* Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 9, p. 1237–1245, 2013.

HUANG, Y. *et al.* Rapid detection of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China based on MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 192, p. 106385, 2022.

HUSSEIN, K. *et al.* The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacterales*. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 13, n. 1, p. e0004, 2022.

IACONIS, J. P.; SANDERS, C. C. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 1, p. 44–51, 1990.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (Order: “*Enterobacterales*”): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. e00174-20, 2021.

JEAN, S.-S.; HARNOD, D.; HSUEH, P.-R. Global threat of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 823684, 2022.

JUNG, J. S. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 924–930, 2014.

KAWAMOTO, Y. *et al.* Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* using the MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance– β -Lactamase (MBT STAR-BL) assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 160, p. 154–156, 2019.

KAWAMOTO, Y. *et al.* Performance evaluation of the MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance– β -Lactamase (MBT STAR-BL) assay for the detection of IMP metallo- β -lactamase activity in *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 4, p. 275–278, 2018.

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Global dissemination of *bla*_{KPC} into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and *in vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4490–4500, 2016a.

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 1067–1078, 2016b.

KELLY, A. M.; MATHEMA, B.; LARSON, E. L. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the community: a scoping review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 127–134, 2017.

KHAN, A. U.; MARYAM, L.; ZARRILLI, R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 101, 2017.

KUWABARA, S.; ABRAHAM, E. P. Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. **Biochemical Journal**, v. 103, n. 3, p. 27C-30C, 1967.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e8041, 2009.

LEE, Y.-L. *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacterales* infections: recent advances in diagnosis and treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 2, p. 106528, 2022.

LEE, C.-R. *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 895, 2016.

LIM, H. M.; PÈNE, J. J.; SHAW, R. W. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 6, p. 2873–2878, 1988.

LIU, V. X. *et al.* The timing of early antibiotics and hospital mortality in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 196, n. 7, p. 856–863, 2017.

LODISE, T. P. *et al.* Antimicrobial resistance or delayed appropriate therapy—does one influence outcomes more than the other among patients with serious infections due to carbapenem-resistant versus carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae*? **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. ofz194, 2019.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S28–S36, 2017a.

LOMOVSKAYA, O. *et al.* Vaborbactam: spectrum of beta-lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. e01443-17, 2017.

MAGAGNIN, C. M. *et al.* Dissemination of *bla*_{OXA-370} gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1907–1910, 2017.

MAIRI, A. *et al.* OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 587–604, 2018.

MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 337, n. 1–2, p. 11–21, 2003.

MIRIAGOU, V. *et al.* Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated Class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1297–1300, 2003.

MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

MOREIRA, N. K.; CAIERÃO, J. Ceftazidime-avibactam: are we safe from class A carbapenemase producers' infections? **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 6, p. 879–896, 2021.

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.

MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2010.

NAAS, T. *et al.* Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4423–4424, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. **Taxonomy**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 29 ago. 2022.

NAUCLÉR, P. *et al.* Impact of time to antibiotic therapy on clinical outcome in patients with bacterial infections in the emergency department: implications for antimicrobial stewardship. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 2, p. 175–181, 2021.

NICOLETTI, A. G. *et al.* Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4563–4564, 2012.

NORDMANN, P. *et al.* Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 432–438, 2012.

NORDMANN, P. *et al.* NitroSpeed-Carba NP test for rapid detection and Differentiation between different classes of carbapenemases in *Enterobacterales*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. e00932-20, 2020.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–272, 2012.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1503–1507, 2012.

OCTAVIA, S.; LAN, R. The family *Enterobacteriaceae*. **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 225–286. *E-book*. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38922-1_167. Acesso em: 20 mar. 2022.

OKAMOTO, K. *et al.* Modifiable risk factors for the spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among long-term acute-care hospital patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 06, p. 670–677, 2017.

OUESLATI, S.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1059–1063, 2015.

OVIÑAÑO, M.; BOU, G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 1, p. e00037-18, 2018.

PALACIOS-BAENA, Z. R. *et al.* Risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 2, p. 228–235, 2021.

PAPAGIANNITSIS, C. C. *et al.* Identification of CMY-2-type cephalosporinases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2952–2957, 2014.

PATEL, G.; BONOMO, R. A. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 48, 2013.

PEIRANO, G. *et al.* Importance of clonal complex 258 and IncF_{K2}-like plasmids among a global collection of *Klebsiella pneumoniae* with *bla*_{KPC}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02610-16, 2017.

PEREIRA, P. S. *et al.* Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4453–4456, 2015.

PEREZ, F.; BONOMO, R. A. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: global action required. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 561–562, 2019.

PIRES, J.; NOVAIS, Â.; PEIXE, L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281–4283, 2013.

POGUE, J. M.; BONOMO, R. A.; KAYE, K. S. Ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, or both? Clinical and formulary considerations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 3, p. 519–524, 2019.

POIREL, L. *et al.* Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POIREL, L. *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 1, p. 119–123, 2011.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of Class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24–38, 2010.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597–1606, 2012.

POLLY, M. *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 50, n. 1, p. 32–38, 2022.

PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The epidemiology, evolution, and treatment of KPC-producing organisms. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 6, p. 13, 2018.

PORRES-OSANTE, N. *et al.* Use of avibactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48 β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 3, p. 399–400, 2014.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RICE, L. B. Antimicrobial stewardship and antimicrobial resistance. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 805–818, 2018.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. *et al.* Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 4, p. 1800193, 2019.

SABINO, S. *et al.* A Cohort study of the impact of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections on mortality of patients presenting with sepsis. **mSphere**, v. 4, n. 2, p. e00052-19, 2019.

SAINO, Y. *et al.* Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 564–570, 1982.

SANDALAKIS, V. *et al.* Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 3, p. 253–267, 2017.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**, v. 8, n. 1, p. 13, 2020.

SEKI, L. M. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274–277, 2011.

SHERWIN, R. *et al.* Does early and appropriate antibiotic administration improve mortality in emergency department patients with severe sepsis or septic shock? **The Journal of Emergency Medicine**, v. 53, n. 4, p. 588–595, 2017.

SIEVERT, D. M. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2013.

SMITH MOLAND, E. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711–714, 2003.

STEWARDSON, A. J. *et al.* Effect of carbapenem resistance on outcomes of bloodstream infection caused by *Enterobacteriaceae* in low-income and middle-income countries (PANORAMA): a multinational prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 601–610, 2019.

TAMMA, P. D. *et al.* Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1046–1055, 2017.

TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 11, p. e01140-18, 2018.

TARIQ, T. M.; RASOOL, E. Emerging trends of bloodstream infections: a six-year study at a paediatric tertiary care hospital in Kabul. **Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan: JCPSP**, v. 26, n. 11, p. 887–891, 2016.

THEURETZBACHER, U. *et al.* Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. e40–e50, 2019.

THOMSON, G. *et al.* High-stringency evaluation of the automated BD Phoenix CPO detect and rapidec Carba NP tests for detection and classification of carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3437–3443, 2017.

TIJET, N.; PATEL, S. N.; MELANO, R. G. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 274–276, 2016.

TIMSIT, J.-F.; PAIVA, J.-A.; BASSETTI, M. Focus on optimization of early antimicrobial therapy in ICU-acquired infections. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1658–1660, 2016.

TSUCHIDA, S.; UMEMURA, H.; NAKAYAMA, T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4775, 2020.

VADING, M. *et al.* Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 668–674, 2011.

VAN DER ZWALUW, K. *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**, v. 10, n. 3, p. e0123690, 2015.

VAN DUIN, D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 460–469, 2017.

VILLEGAS, M. V. *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: A diagnostic, epidemiological and therapeutic challenge. **Infectio**, v. 23, n. 4, p. 388, 2019.

VIVAN, A. C. P. *et al.* Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from a university hospital in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 05, p. 379–386, 2017.

WALSH, T. R. *et al.* Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–325, 2005.

WANG, L. *et al.* Evaluation of NitroSpeed-Carba NP test for rapid identification among different classes of carbapenemases in *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 106, p. 415–420, 2021.

WANG, Y. *et al.* Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 18–27, 2020.

WINK, P. L. *et al.* Increased frequency of *bla*_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 299–301, 2021.

WOODFORD, N. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing Class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4793–4799, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **10 global health issues to track in 2021**. Genebra, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>. Acesso em: 20 mar. 2022.

YAMADA, K. *et al.* Comparison of the modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 128, p. 48–51, 2016.

YI, J.; KIM, K.-H. Identification and infection control of carbapenem-resistant *Enterobacterales* in intensive care units. **Acute and Critical Care**, v. 36, n. 3, p. 175–184, 2021.

YIGIT, H. *et al.* Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3881–3889, 2003.

YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.

YOON, E.-J. *et al.* Direct detection of intact *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases produced by *Enterobacterales* using MALDI-TOF MS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 5, p. 1174–1181, 2020.

YOON, E.-J.; JEONG, S. H. MALDI-TOF mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 982, 2021.

YU, Jiajia *et al.* Rapid detection of carbapenemase activity of *Enterobacteriaceae* isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, n. 1, p. 22, 2018.

ZABBE, J.-B. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry for early identification of bacteria grown in blood culture bottles. **Journal of Microbiological Methods**, v. 115, p. 45–46, 2015.