

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS RÁPIDAS PARA DETECÇÃO DE
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA E DETERMINAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM *ENTEROBACTERALES* POR
MALDI-TOF MS**

CAMILA MÖRSCHBÄCHER WILHELM

Porto Alegre, 2023

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS RÁPIDAS PARA DETECÇÃO DE
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA E DETERMINAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM *ENTEROBACTERALES* POR
MALDI-TOF MS**

Tese apresentada por Camila Mörschbacher
Wilhelm para obtenção do GRAU DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Porto Alegre, 2023

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de doutorado acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de janeiro de 2023 pela banca examinadora, constituída por:

Prof. Dra. Ana Cristina Gales
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Beatriz Meurer Moreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Cecilia Godoy Carvalhaes
JMI Laboratories (EUA)

CIP - Catalogação na Publicação

Wilhelm, Camila Mörschbacher
Desenvolvimento de metodologias rápidas para
detecção de mecanismos de resistência bacteriana e
determinação da suscetibilidade a antimicrobianos em
Enterobacterales por MALDI-TOF MS / Camila
Mörschbacher Wilhelm. -- 2023.
155 f.
Orientador: Afonso Luís Barth.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Enterobacterales. 2. Resistência a
antimicrobianos. 3. Teste de sensibilidade. 4.
Detecção de mecanismos de resistência bacteriana. 5.
MALDI-TOF MS. I. Barth, Afonso Luís, orient. II.
Título.

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

Dedico esta tese a minha mãe, que sempre me incentivou, e ao futuro, que possa fazer uso dos trabalhos aqui desenvolvidos para melhorar a saúde humana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Marieta, pelo incentivo desde sempre a estudar, a trabalhar no que eu gosto e dizer que sempre posso fazer mais. Ao meu pai, Luiz (*in memoriam*) também pelo incentivo de sempre trabalhar e estudar, e ao meu irmão, por estar junto. Agradeço ao meu namorado, Reinaldo, também pelo incentivo e apoio.

A todas as amigas, do colégio, da faculdade e do apartamento, pelos momentos de descontração, que às vezes mesmo sem saber, auxiliaram a tornar diversos momentos mais leves.

Aos colegas e chefes do Laboratório Alfaálises, especialmente a Rafa, pela compreensão, parceria e confiança, além da amizade. Também aos ex-colegas do Laboratório Carlos Franco Voegeli da Irmandade Santa Casa de Porto Alegre.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), pelas palavras de incentivo, pelo companheirismo diário, pela ajuda e colaboração, em especial aos ICs Aymê, Richard e Kellen, e às colegas Dari e Fabi.

Agradeço com carinho a colaboração mais direta da Natalia e da Maiara nos trabalhos desenvolvidos e também aos demais colaboradores: Everton, Giovanna, Priscila, prof. Andreza e prof. Juliana.

Por fim, gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador, prof. Afonso, quem eu admiro muito pela orientação, pelas trocas de ideias e experiências, sempre me guiando de forma a evoluir.

RESUMO

Introdução: A demanda para a detecção rápida de mecanismos de resistência antimicrobiana e por métodos rápidos para a determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos vem crescendo, especialmente devido ao aumento da prevalência de isolados de *Enterobacterales* produtores de carbapenemases KPC e/ou NDM. Com esta problemática em vista, a tecnologia de *matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) vem se tornando uma opção de metodologia importante, pois permite o desenvolvimento de ensaios capazes de proverem um resultado rápido da presença de mecanismos de resistência e da suscetibilidade a antimicrobianos.

Objetivo: Desenvolver metodologias rápidas para a detecção de mecanismos de resistência e para a determinação da suscetibilidade através da metodologia de MALDI-TOF MS.

Métodos: Para a detecção de hidrólise por MALDI-TOF MS, as moléculas intactas de meropenem foram detectadas em um espectro de massa e relacionadas a um padrão interno de forma a calcular um índice quantitativo de hidrólise. Para a detecção da enzima KPC a partir de bactérias impregnadas em papel-filtro, uma suspensão bacteriana foi submetida a um protocolo de extração e posterior análise por MALDI-TOF MS, identificando o pico relativo à molécula intacta da enzima. Foi aplicada a metodologia *MALDI Biotyper – antibiotic susceptibility test rapid assay* (MBT-ASTRA), com simplificações, para a realização da avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos a partir de colônias bacterianas, a partir de hemoculturas positivas e para a detecção de sinergismo.

Resultados e conclusões: Um índice quantitativo para determinação da hidrólise ao meropenem foi desenvolvido, diferenciando *Enterobacterales* que possuíam os genes *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}* de isolados não produtores de carbapenemases. Foi possível identificar a enzima KPC de bactérias impregnadas em papel-filtro com alta especificidade, mas baixa sensibilidade. Foi possível desenvolver a técnica de MBT-ASTRA simplificada para determinação da suscetibilidade a meropenem a partir de colônia, para ceftazidima/avibactam e meropenem a partir de hemocultura e para a detecção de sinergismo da combinação de aztreonam e ceftazidima/avibactam.

Palavras-chave: *Enterobacterales*; Resistência bacteriana; Teste de sensibilidade; MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

Background: The need for rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and for rapid methods to determine antimicrobial susceptibility has been growing, especially due to the increasing prevalence of KPC and/or NDM carbapenemase-producing *Enterobacterales* isolates. With this problem in mind, the matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technology has become a valuable methodology because it allows the development of assays capable of providing a rapid result of the presence of resistance mechanisms and the antimicrobial susceptibility testing.

Objective: To develop rapid methodologies for antimicrobial susceptibility testing and for detection of resistance mechanisms through MALDI-TOF MS methodology.

Methods: For the detection of hydrolysis by MALDI-TOF MS, intact molecules of meropenem were detected in a mass spectrum related to an internal standard in order to calculate a hydrolysis quantitative index. For the detection of KPC enzyme from bacteria impregnated in filter-paper, a bacterial suspension was submitted to an extraction protocol and subsequent analysis by MALDI-TOF MS, identifying the peak related to the enzyme intact molecule. *MALDI Biotyper – antibiotic susceptibility test rapid assay* (MBT-ASTRA) was used, with simplifications, to perform antimicrobial susceptibility testing from bacterial colonies, from positive blood cultures and for synergism detection.

Results and conclusions: A quantitative index to determine meropenem hydrolysis was developed, differentiating *Enterobacterales* that had the *bla_{KPC}* or *bla_{NDM}* genes from non-carbapenemase-producing isolates. It was possible to identify the KPC enzyme from bacteria impregnated on filter-paper with high specificity, but low sensitivity. It was possible to develop the simplified MBT-ASTRA technique for determining susceptibility to meropenem from colony, to ceftazidime/avibactam and meropenem from blood culture and for synergism detection of aztreonam and ceftazidime/avibactam combination.

Keywords: *Enterobacterales*; Bacterial resistance; Susceptibility testing; MALDI-TOF MS.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATM – Aztreonam

AUC – Área sob a curva (do inglês *area under the curve*)

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CB – *Checkerboard*

CIM – Método de inativação do carbapenêmico (do inglês *carbapenem inactivation method*)

CRE – *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (do inglês *carbapenem resistant Enterobacterales*)

CZA – Ceftazidima/avibactam

eCIM – Método de inativação do carbapenêmico com EDTA (do inglês *EDTA-modified carbapenem inactivation method*)

ESBL – Beta-lactamases de espectro estendido (do inglês *extended-spectrum beta-lactamases*)

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

I – Sensível, aumentando exposição

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

MALDI-TOF MS – Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry*)

MBT-ASTRA – *MALDI Biotyper – antibiotic susceptibility test rapid assay*

mCIM – Método de inativação do carbapenêmico modificado (do inglês *modified carbapenem inactivation method*)

MIC – Concentração inibitória mínima (do inglês *minimum inhibitory concentration*)

NDM – *New Delhi Metallo-beta-lactamase*

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

R – Resistente

RAST – *Rapid antimicrobial susceptibility testing*

S – Sensível, dose padrão

TK – *Time-kill*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>ENTEROBACTEREALES</i>	17
2.2 AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>ENTEROBACTEREALES</i>	21
2.3 CARBAPENEMASES EM <i>ENTEROBACTEREALES</i>	25
2.4 IMPACTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>ENTEROBACTEREALES</i> PRODUTORES DE ESBL E CARBAPENEMASES	27
2.5 TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>ENTEROBACTEREALES</i> PRODUTORES DE KPC E NDM	29
2.6 ATUALIDADES EM ANTIBIOGRAMA.....	31
2.7 TESTES DE SINERGISMO	33
2.8 TESTES PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES.....	35
2.9 METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS	39
2.10 DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E ANTIBIOGRAMA POR MALDI-TOF MS	43
2.10.1 Metodologias de hidrólise	45
2.10.2 Detecção direta de KPC	49
2.10.3 Determinação da suscetibilidade por MBT-ASTRA	51
3 JUSTIFICATIVA	53
4 OBJETIVOS	55
4.1 OBJETIVO GERAL	55
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
5 MANUSCRITOS E RESULTADOS PARCIAIS	57
5.1 MANUSCRITO 1	57
5.2 MANUSCRITO 2.....	65
5.3 MANUSCRITO 3.....	81
5.4 MANUSCRITO 4.....	91
5.5 MANUSCRITO 5.....	103
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
7 TRABALHOS E ATIVIDADES COMPLEMENTARES	129

7.1 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS CO-PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES	129
7.2 PARTICIPAÇÃO EM OUTROS ESTUDOS PUBLICADOS	131
7.3 PUBLICAÇÃO DE RESUMOS EM ANAIS DE EVENTOS.....	133
7.4 APRESENTAÇÃO ORAL EM EVENTOS	135
7.5 PREMIAÇÕES	137
REFERÊNCIAS	139
ANEXOS.....	149
ANEXO A.....	149

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é atualmente uma das maiores preocupações para a saúde, com a tendência de agravar-se ainda mais tendo em vista o lento desenvolvimento de novos fármacos para combatê-la. A resistência bacteriana ocorre quando uma bactéria não é inibida ou sua morte não ocorre na presença de um antimicrobiano, considerando uma adequada administração. Em consequência, a infecção continua, podendo levar o paciente à morte (CDC, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2022).

O aumento da resistência bacteriana é resultado de uma soma de fatores: populações bacterianas expostas a antimicrobianos, o que resulta na seleção natural de subpopulações (cepas) resistentes e a disseminação destas cepas e seus genes de resistência. Primariamente, devem ser buscadas formas de retardar essa disseminação, através, por exemplo, da prescrição correta de antimicrobianos e de medidas de precauções. Contudo, após instalada a infecção bacteriana, esta deve ser tratada com fármacos que tenham atividade contra o patógeno. Desta forma, para determinar a suscetibilidade de uma bactéria a determinados antimicrobianos, é necessário realizar o teste de suscetibilidade aos antibióticos (antibiograma) (CDC, 2019).

O antibiograma é realizado principalmente pelas metodologias de disco-difusão (Kirby-Bauer) e/ou microdiluição em caldo, as quais são padronizadas, mas somente a segunda é considerada a técnica padrão-ouro para testes de suscetibilidade (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Ambas levam em torno de 24 horas para fornecer um resultado quando realizadas de colônias bacterianas crescidas em ágar. Mais atualmente foi validado um método de disco-difusão denominada *rapid antimicrobial susceptibility testing* (RAST), o qual permite a leitura após incubação a partir de 4 horas, contudo este método foi padronizado apenas para ser realizado de hemocultura (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2022). Desta forma, além do tempo necessário para a liberação do resultado do antibiograma, previamente a ele ainda são necessários mais um a dois dias para o crescimento da bactéria, totalizando em torno de dois a três dias para se obter o resultado final do exame cultural com o perfil de suscetibilidade. Além disso, dependendo do teste realizado para a determinação do mecanismo de resistência,

pode-se acrescentar mais um dia no *turnaround time* deste exame (VERROKEN et al., 2016).

Recentemente, uma tecnologia que vem revolucionando a rotina de laboratórios de microbiologia é a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry*). Esta metodologia é empregada para a identificação bacteriana a nível de espécie e/ou gênero, fornecendo resultados em poucos minutos. Além disso, alguns estudos vêm demonstrando sua aplicabilidade para a determinação da suscetibilidade a antimicrobianos e para a detecção de mecanismos de resistência bacteriana, resultados que também poderiam ser obtidos em poucos minutos ou horas (HRABÁK; CHUDÁČKOVÁ; WALKOVÁ, 2013).

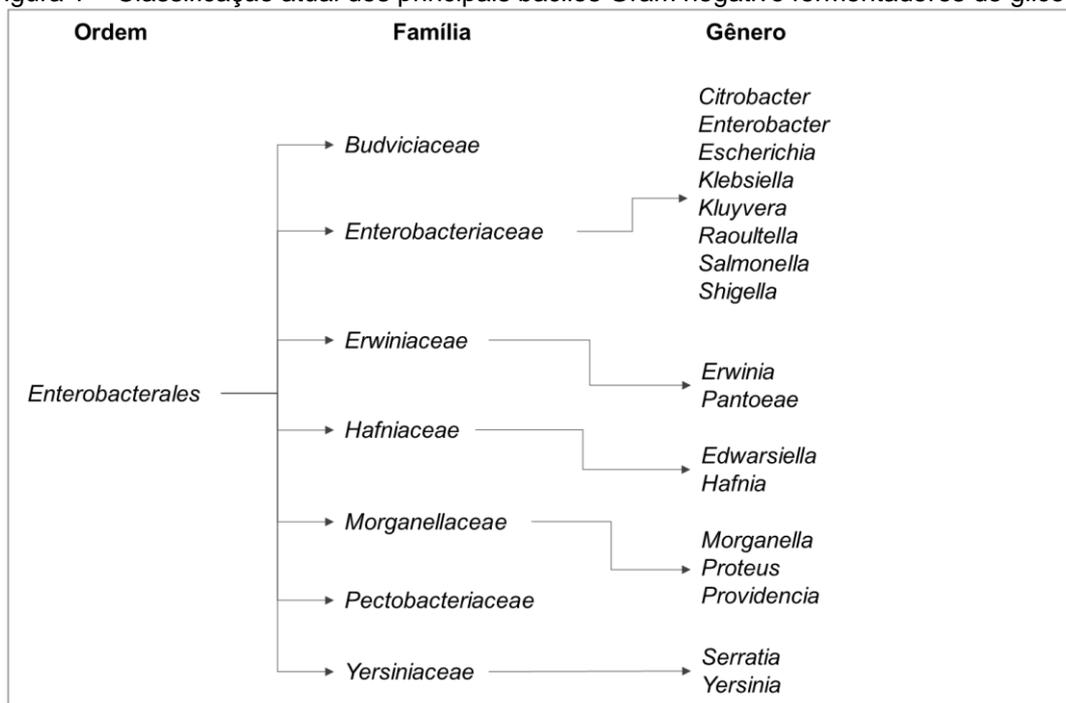
Os testes desenvolvidos em MALDI-TOF MS até o momento incluem a detecção de moléculas hidrolisadas ou intactas de antimicrobianos, a detecção direta de enzimas beta-lactamases e a determinação da taxa de crescimento relativo bacteriano. As técnicas que utilizam MALDI-TOF apresentam protocolos variados os quais, contudo, utilizam materiais comumente não disponíveis no laboratório, softwares específicos e/ou expertise em informática para serem realizados, tornando difícil o seu uso em laboratórios de rotina de microbiologia (HRABÁK; CHUDÁČKOVÁ; WALKOVÁ, 2013). O desenvolvimento de técnicas mais simplificadas por MALDI-TOF MS, de forma que possam ser utilizadas mais facilmente, seria de grande valia para o tratamento de pacientes com infecções bacterianas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENTEROBACTERALES

Bactérias da ordem *Enterobacterales* são bacilos Gram negativo, com alta disseminação em diversos ecossistemas, podendo ser não-patogênicas ou estar associadas a infecções de origem alimentares e zoonóticas entre outras, afetando tanto humanos quanto animais (JANDA; ABBOTT, 2021). É importante mencionar que em 2019 houve uma atualização na taxonomia de algumas bactérias anteriormente incluídas na família *Enterobacteriaceae*, que foram reclassificadas em outras famílias. Desta forma, passou a ser necessário referir-se à ordem *Enterobacterales* a fim de englobar as famílias reclassificadas (Figura 1) (ADEOLU et al., 2016).

Figura 1 – Classificação atual dos principais bacilos Gram negativo fermentadores de glicose.



Fonte: adaptado de (JANDA; ABBOTT, 2021).

Embora a grande maioria das bactérias da ordem *Enterobacterales* faça parte da microbiota normal entérica de humanos, algumas espécies apresentam maior importância clínica, podendo ser tanto colonizantes quanto causarem infecção. Entre as bactérias da ordem *Enterobacterales*, as mais frequentes causadoras de infecção

são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (AMANATI et al., 2021; VINK; EDGEWORTH; BAILEY, 2020), portanto estas espécies serão abordadas a seguir.

A patogenicidade de *E. coli* está principalmente relacionada a perda ou ganho de ilhas de patogenicidades e a outros materiais genéticos acessórios. Assim, dependendo dos genes carregados, esta espécie pode se tornar mais patogênica afetando o sistema urinário, intestinal e até mesmo o sistema nervoso (CROXEN; FINLAY, 2010).

Da mesma forma que *E. coli*, bactérias da espécie *K. pneumoniae* podem sobreviver em diversos nichos, tendo sido encontradas em solo, água, em diversas espécies de plantas, insetos, aves, répteis e diversos mamíferos. Esta espécie e/ou espécies do Complexo *K. pneumoniae* (que engloba *K. pneumoniae*, *K. quasivariicola*, *K. africana*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *tropica*, *K. variicola* subsp. *variicola*) foram reportadas como comensais do trato intestinal com uma prevalência de aproximadamente 4 a 6% em indivíduos da comunidade, mas, em indivíduos que tiveram contato com serviços de saúde, a taxa foi de aproximadamente 25%. Assim, *K. pneumoniae* é considerado um patógeno oportunista associado a infecções relacionadas a serviços de saúde, com as principais infecções ocorrendo na forma de pneumonia, no trato urinário e em feridas, as quais podem progredir para bacteremia (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Essa espécie pode apresentar alguns fatores de virulência que podem dificultar o tratamento de infecções, como: hiperprodução da cápsula de polissacarídeo, o que pode levar a supressão do processo inflamatório, resistência à fagocitose e a peptídeos antimicrobianos; alguns sorotipos do antígeno O e modificações do lipídio A do LPS, que diminuem a resposta imune inata do hospedeiro; alguns tipos de fimbrias que podem aumentar a adesão da bactéria ou propiciar a formação de biofilme; e outros mecanismos, como proteínas de membrana e fatores que interferem na aquisição de ferro e na utilização de nitrogênio (LI et al., 2014).

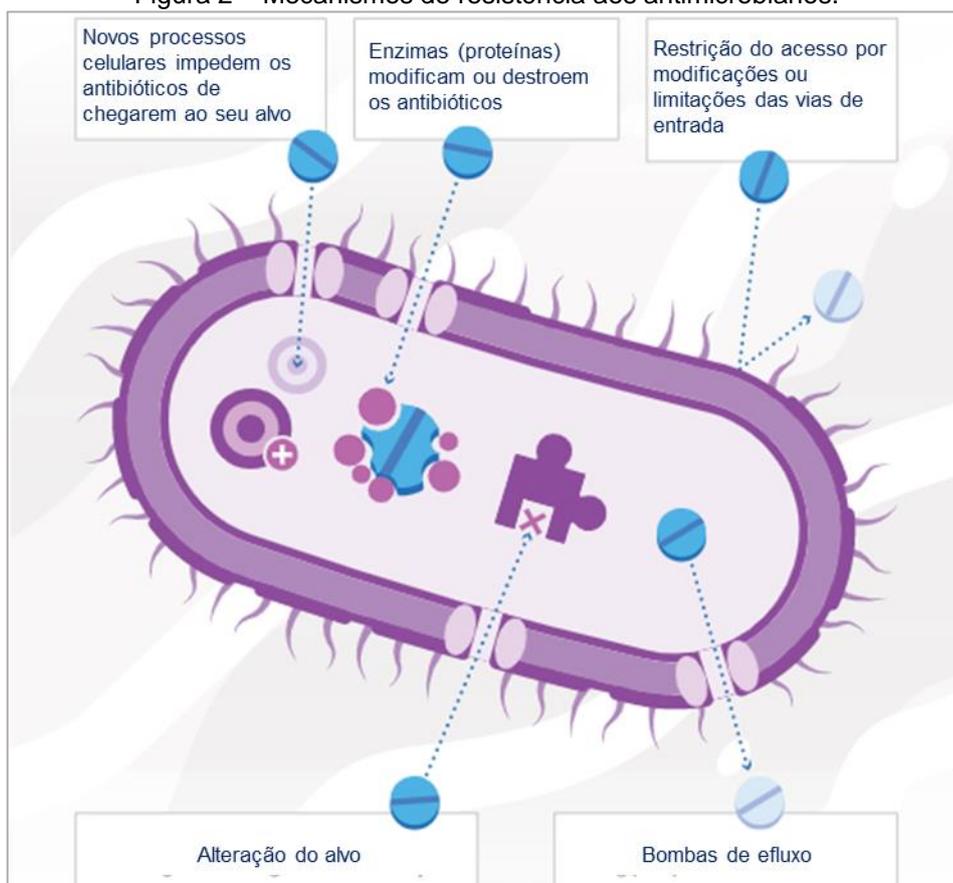
Interessantemente, um estudo demonstrou que *E. coli* é a bactéria causadora de infecção da corrente sanguínea mais prevalente sem a associação de resistência aos carbapenêmicos (DIEKEMA et al., 2019), enquanto uma meta-análise estimou que a taxa de mortalidade devido a infecções hospitalares por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi de 42%, em comparação a 21% quando as cepas eram sensíveis a esta classe (XU; SUN; MA, 2017). Assim, pode-se observar que a

dificuldade de tratamento de infecções causadas, de forma geral, por *Enterobacterales* deve-se principalmente à aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos, especialmente aos beta-lactâmicos, e que isto ocorre mais frequentemente em serviços da saúde.

2.2 AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *ENTEROBACTERALES*

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. Na resistência intrínseca, a bactéria naturalmente possui algum mecanismo de resistência. Já na adquirida, a bactéria se torna resistente ao adquirir genes de resistência ou ao sofrer mutações. Os mecanismos de resistência incluem: modificação ou inativação do antimicrobiano, alteração do alvo do antimicrobiano, aumento do efluxo do antimicrobiano e/ou redução da sua entrada na célula bacteriana (Figura 2) (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017). Por exemplo, a resistência à classe dos aminoglicosídeos comumente ocorre devido à produção de enzimas que modificam o antimicrobiano; na resistência às quinolonas, ocorre alteração do alvo (enzimas DNA girase e topoisomerase); a resistência a sulfonamidas e trimetoprim, também ocorre devido a alterações no alvo; na resistência às polimixinas, que desestabilizam a membrana plasmática, ocorre alterações do LPS; e a resistência aos beta-lactâmicos, considerada a de maior importância clínica em *Enterobacterales*, ocorre principalmente devido à produção de enzimas beta-lactamases, que inativam os antimicrobianos desta classe (CDC, 2019; MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003; PARTRIDGE, 2015).

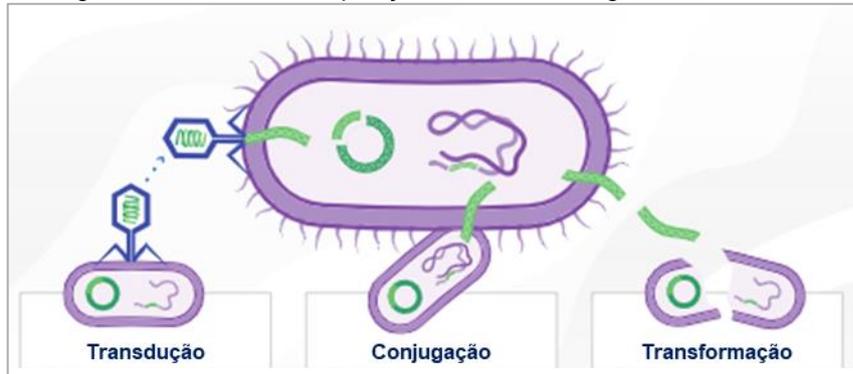
Figura 2 – Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.



Fonte: adaptado de (CDC, 2019).

A resistência antimicrobiana em *Enterobacterales* está geralmente relacionada à aquisição de genes através de diferentes elementos genéticos móveis, sendo os principais as sequências de inserção, os transposons e o sistema cassete/integron. Estes podem capturar os genes de resistência e transferi-los entre moléculas de DNA, por exemplo do cromossomo para um plasmídeo ou entre plasmídeos dentro de uma mesma célula. O plasmídeo, carregando algum elemento genético móvel com algum gene de resistência, pode ser transferido entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes ou até mesmo entre gêneros diferentes (PARTRIDGE, 2015). A aquisição de elementos genéticos móveis pode ocorrer pelos processos de: transdução, quando um fago insere material genético em uma bactéria; conjugação, no qual ocorre a transferência de uma célula bacteriana para outra via pili sexual; e transformação, quando o material genético presente no ambiente é diretamente absorvido pela bactéria (Figura 3) (ANDERSSON; HUGHES, 2017).

Figura 3 – Formas de aquisição de elementos genéticos móveis.



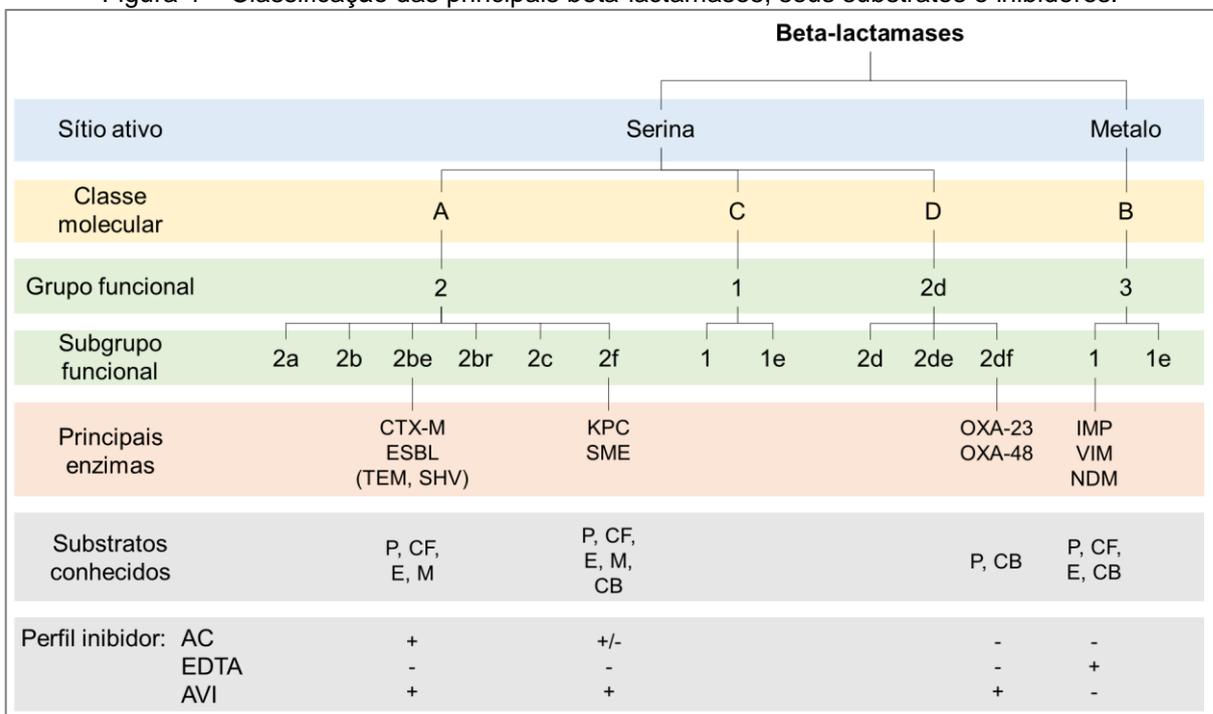
Fonte: adaptado de (CDC, 2019).

Os plasmídeos geralmente possuem uma região conservada (*backbone*), que codifica as funções próprias do plasmídeo, como replicação, estabilidade e conjugação. As regiões conservadas foram originalmente classificadas em grupos de incompatibilidade (*Inc*, do inglês *incompatibility*). Já as regiões acessórias, inseridas entre as regiões conservadas, são variáveis e podem conter os genes de resistência aos antimicrobianos. A inserção de um elemento genético móvel em um plasmídeo, sem que este perca suas funções essenciais, pode se tornar um alvo para a inserção de mais elementos genéticos móveis e de genes de resistência a antimicrobianos. Isto pode levar a uma complexa região com diversos genes de resistência que são transferidos em conjunto, fazendo com que frequentemente cepas demonstrem resistência a diversas classes de antimicrobianos não relacionadas (PARTRIDGE, 2015).

2.3 CARBAPENEMASES EM *ENTEROBACTERALES*

Entre os principais mecanismos de resistência em *Enterobacterales* está a produção de beta-lactamases, enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar os antibióticos que contêm um anel beta-lactâmico. As beta-lactamases podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com o mecanismo pelo qual realizam hidrólise: formação de uma enzima acil com um sítio ativo que contém serina (grupo serina) e reação de hidrólise facilitada por um ou dois íons de zinco essenciais no sítio ativo (grupo metala). Os grupos serina e metala-beta-lactamase (MBL) ainda podem ser classificados quanto à classe molecular e ao grupo funcional (Figura 4). Resumidamente, as beta-lactamases podem ser denominadas como penicilinases quando degradam penicilinas, cefalosporinases quando degradam cefalosporinas das primeiras gerações, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended-spectrum beta-lactamases*) quando degradam cefalosporinas de 3ª e/ou 4ª geração e carbapenemases quando degradam carbapenêmicos (BUSH, 2018).

Figura 4 – Classificação das principais beta-lactamases, seus substratos e inibidores.



Fonte: adaptado de (BUSH, 2018). AC: ácido clavulânico. AVI: avibactam. CB: carbapenêmicos. CF: cefalosporinas. E: cefalosporinas de espectro estendido. M: monobactâmicos. P: penicilinas.

As principais enzimas de preocupação clínica e epidemiológica atualmente são as carbapenemases, sendo que entre elas se destacam, em *Enterobacterales*, a

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) e a *New Delhi Metallo-beta-lactamase* (NDM) (BONOMO et al., 2018). A KPC foi primeiramente identificada em *K. pneumoniae*, isolada em 1996 de um paciente nos Estados Unidos, apresentando resistência a imipenem e meropenem (YIGIT et al., 2001). Ela foi chamada de KPC-1 e logo em seguida outras variantes foram descritas, sendo numeradas KPC-2, -3 e assim por diante. Contudo, foi identificado um erro em um nucleotídeo da sequência da KPC-1, que era idêntica à KPC-2, prevalecendo desta forma o nome KPC-2 (YIGIT et al., 2008). Em dezembro de 2022, ao pesquisar “KPC” na base de dados *National Database of Antibiotic Resistant Organisms* (NDARO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>), pôde-se verificar que foram descritas variantes até a KPC-144. Entretanto, a variante mais frequentemente detectada em isolados clínicos e mundialmente disseminada é a KPC-2 (BONOMO et al., 2018). A KPC é capaz de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, não é inibida por EDTA, mas é inibida por avibactam (BUSH, 2018).

Já a NDM, foi isolada pela primeira vez em 2008 de um paciente na Suíça, mas que havia sido internado em um hospital na Índia previamente. Esta enzima foi então nomeada NDM-1 (YONG et al., 2009). No banco de dados NDARO, ao pesquisar NDM em dezembro de 2022, puderam ser identificadas variantes até a NDM-44, mas a NDM-1 permanece a mais relevante (BONOMO et al., 2018). A NDM, assim como as demais MBL, também hidrolisa todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, porém não os monobactâmicos, como o aztreonam. Ao contrário da KPC, as MBL são inibidas por EDTA, mas não por avibactam (BUSH, 2018).

2.4 IMPACTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *ENTEROBACTERALES* PRODUTORES DE ESBL E CARBAPENEMASES

De acordo com o relatório publicado pelo CDC em 2019, *Enterobacterales* produtoras de ESBL foram responsáveis por mais de 197 mil casos de infecção e por mais de 9,1 mil mortes no Estados Unidos naquele ano, sendo que em 2013, foram em torno de 131 mil casos e 6,3 mil mortes. Quanto a *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, os dados demonstraram 11,8 mil casos e 1 mil mortes em 2013 e 13,1 mil casos e 1,1 mil mortes em 2019 (CDC, 2019).

Em um estudo de 2016 a 2018, realizado na Suíça, *Enterobacterales* produtoras de ESBL foram reportadas como o patógeno causador de infecção em 45% dos pacientes (VOCK et al., 2021). Em outro estudo realizado na Europa, de 2007 a 2019, *E. coli* resistentes a cefalosporinas de 3ª geração foram reportadas como a principal causa de infecção e de morte. Já em relação a *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, a principal espécie foi *K. pneumoniae* (CASSINI et al., 2019). Quanto às carbapenemases, a mortalidade devido a infecções causadas por bactérias produtoras de KPC mostrou-se mais elevada em relação àquelas causadas por produtoras de NDM (SEO et al., 2021).

Além do impacto na saúde do paciente, infecções por bactéria produtoras de carbapenemases também levam a um impacto social e econômico. Um estudo realizado nos Estados Unidos estimou um gasto anual de mais US\$ 78 milhões em decorrência de infecções causadas por *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (NELSON et al., 2021). Mais especificamente, no Brasil, foi estimado um gasto de US\$ 4.100,00 por paciente tratado contra uma infecção causada por bactéria produtora de KPC (SANTOS; SECOLI, 2019). Estes dados são extremamente preocupantes considerando o impacto que pode causar no sistema único de saúde (SUS), tendo em vista, por exemplo, o custo aproximado de R\$ 3.000,00 por dia de um dos medicamentos aplicados para combater uma infecção causada por KPC, o Torgena®, cujo princípio ativo é ceftazidima/avibactam (CZA).

2.5 TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *ENTEROBACTERALES* PRODUTORES DE KPC E NDM

Uma das estratégias de combate às infecções causadas por CRE devido a produção de carbapenemases é o uso de inibidores de beta-lactamases associados a antibióticos beta-lactâmicos. Os inibidores mais antigos já utilizados na prática clínica são o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, em combinação com amoxicilina, ampicilina e piperacilina, respectivamente. Estes inibidores possuem um anel beta-lactâmico e, por isso, normalmente não apresentam efeito inibidor significativo contra bactérias produtoras de carbapenemases como KPC e NDM. Por outro lado, inibidores de beta-lactamases mais recentes, como avibactam e relebactam, por serem compostos diazabiciclooctanos, e vaborbactam, um composto de ácido borônico, não possuem o anel beta-lactâmico e, portanto, demonstram atividade inibitória quando combinados com ceftazidima, imipenem e meropenem respectivamente, contra KPC (e outras serina carbapenemases), porém não sobre NDM (BUSH, 2018; BUSH; BRADFORD, 2016). É importante mencionar que, no Brasil, somente está disponível a combinação de CZA, conforme consulta realizada em dezembro de 2022 no site da ANVISA (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/>).

Anteriormente ao desenvolvimento destes novos antimicrobianos, a terapia antimicrobiana contra CRE por KPC invariavelmente incluía as polimixinas, um lipopolipeptídeo com atividade contra a maioria dos bacilos Gram negativos (RIGATTO; FALCI; ZAVASCKI, 2019; TRAN et al., 2016). Uma revisão, que traz as polimixinas como uma das opções de tratamento contra infecções por CRE produtores de KPC, coloca como pontos positivos a alta taxa de suscetibilidade dos isolados bacterianos a esta classe e o baixo custo; contudo nos pontos negativos estão a imprevisibilidade da farmacocinética da colistina, o alto risco de nefrotoxicidade e as altas taxas de mortalidade em pacientes recebendo colistina em comparação com pacientes recebendo tratamento que incluía inibidores de beta-lactamase (PORRECA; SULLIVAN; GALLAGHER, 2018). Mais recentemente, CZA tem sido a droga preferencial contra KPC, conforme recomendações da *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) e da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) (PAUL et al., 2022; TAMMA et al., 2022). Ainda que KPC continue sendo a carbapenemase mais frequentemente identificada em isolados clínicos, a prevalência de NDM e, ainda mais preocupantemente, da coprodução de KPC e NDM

por um mesmo isolado bacteriano vem aumentando (DONG et al., 2017; DU et al., 2017; GAO et al., 2020; LIU et al., 2019; PEREIRA et al., 2015; QUILES et al., 2015; SEIFFERT et al., 2014). No entanto, contra infecções por CRE produtores de NDM, CZA não seria uma opção viável, visto que, como já mencionado, o avibactam não inibe MBL. Outro antimicrobiano recentemente desenvolvido é o cefiderocol, uma cefalosporina siderófora, que apresenta atividade contra MBL, porém este antibiótico ainda não foi liberado no Brasil e, além disso, uma revisão sistemática sobre a atividade deste antimicrobiano demonstrou uma taxa de suscetibilidade (considerando sensível ≤ 4 mg/L) de apenas 83,4% frente a *Enterobacterales* produtores de NDM (WANG et al., 2022). Devido ao desenvolvimento destes novos antimicrobianos, especialmente aqueles que são combinados com novos inibidores de beta-lactamases, passou a ser necessário o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico *in vitro* que identifiquem de forma diferencial isolados produtores de KPC de isolados produtores de NDM, além de isolados co-produtores.

Com opções limitadas para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos, que em sua grande maioria são multirresistentes, pode-se optar por terapias combinadas de antimicrobianos. De encontro a isto, a ESCMID e a IDSA recomendam a combinação de ATM com CZA para o tratamento de CRE produtores de MBL, havendo ou não a presença concomitante de uma serina beta-lactamase (PAUL et al., 2022; TAMMA et al., 2022). Assim, métodos para identificar um possível sinergismo de antibióticos combinados *in vitro*, que pudessem ser executados em uma rotina laboratorial, seriam importantes para confirmar o efeito sinérgico esperado e auxiliar no tratamento.

2.6 ATUALIDADES EM ANTIBIOGRAMA

As principais metodologias para determinação da suscetibilidade de uma bactéria a um determinado antimicrobiano são as técnicas de disco-difusão (Kirby-Bauer) e microdiluição em caldo. A técnica de disco-difusão classicamente determina se a bactéria é sensível, intermediária ou resistente a um determinado antimicrobiano, de acordo com pontos de corte estabelecidos por uma padronização. A microdiluição em caldo, da mesma forma, também determina a classificação qualitativa da suscetibilidade bacteriana, mas também fornece um dado quantitativo – a concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*), capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os pontos de corte estão definidos nas padronizações publicadas por comitês ou instituições, sendo que atualmente a recomendada no Brasil é a do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), derivada da padronização do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2015; EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2003; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2019; MATUSCHEK; BROWN; KAHLMETER, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Tanto a técnica de disco-difusão quanto a de microdiluição em caldo necessitam em torno de 16 a 20 horas de incubação para a leitura do resultado final. Visando diminuir o tempo necessário para liberação do resultado do antibiograma, outras metodologias vêm sendo propostas, entre elas o teste de suscetibilidade antimicrobiana rápido (RAST, do inglês *rapid antimicrobial susceptibility testing*). Esta metodologia consiste em realizar o antibiograma por disco-difusão diretamente de frascos de hemocultura positivos e é o único teste rápido, para determinação da suscetibilidade, padronizado e validado pelo EUCAST. Os tempos de incubação variam entre 4, 6 e 8 horas, porém possui pontos de corte somente para as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2022).

É importante salientar que recentemente houve uma mudança na definição da categoria intermediária, que indicava que o efeito terapêutico era incerto. Este efeito

incerto significava que a infecção poderia ser tratada em sítios anatômicos nos quais o fármaco fica concentrado ou com a aplicação de uma dosagem mais alta, mas o efeito incerto poderia também indicar uma zona tampão, na qual alguns fatores técnicos incontroláveis seriam prevenidos, evitando discrepâncias maiores nas interpretações. Atualmente, conforme o EUCAST, o significado tradicional do intermediário foi dividido em “sensível, aumentando exposição” e “área de incerteza técnica” (AIT). O primeiro indica que há probabilidade de sucesso terapêutico quando houver aumento da exposição da bactéria ao antibiótico, que é dependente do modo de administração, dosagem, intervalo de dosagem, tempo de infusão, distribuição e metabolismo do antimicrobiano. Desta forma, o conceito atual de intermediário (sensível, aumentando exposição), não engloba eventuais fatores técnicos que interfiram no resultado. As questões relacionadas a problemas técnicos estão atualmente englobadas na classificação “AIT”, que também possui pontos de corte, porém é independente da categorização do isolado em “sensível, dose padrão” (S), “sensível, aumentando exposição” (I) e “resistente” (R). As categorias S e R permaneceram essencialmente com o mesmo significado, contudo a “nova” categoria “I” não pode mais ser considerada como não sensível (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2020; KAHLMETER; EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2019).

2.7 TESTES DE SINERGISMO

Tendo em vista a baixa produção de novos antimicrobianos, terapias combinadas vêm sendo utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas por bactérias multirresistentes. No entanto, as terapias combinadas são utilizadas de forma empírica, pois não há métodos práticos para determinação de sinergismo realizados em rotina de laboratórios de microbiologia. Considera-se o teste curva de tempo-morte (TK, do inglês *time-kill*) o teste padrão que pode identificar *in vitro* a ocorrência de sinergismo e efeito bactericida na combinação de antimicrobianos. Nesta metodologia, é realizada uma macrodiluição em caldo com antimicrobianos isolados e combinados, geralmente em concentrações de 0,5x, 1x e 2x a MIC. Em cada tubo, que é incubado por 24 horas, é adicionada uma suspensão bacteriana em fase de crescimento (fase *log*) e, nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas, alíquotas são retiradas de cada tubo e diluídas em série. Cada diluição é inoculada em placa contendo meio de cultura, que é incubada *overnight*. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) são contadas e plotadas em um gráfico que relaciona \log_{10} de UFC/mL com os tempos de incubação dos tubos, formando as curvas de tempo-morte. Uma redução $\geq 2 \log_{10}$ na contagem de UFC da combinação de antimicrobianos em relação ao antimicrobiano individualmente mais ativo caracteriza a ocorrência de sinergismo, enquanto que um aumento $\geq 2 \log_{10}$ de UFC determina antagonismo. Já uma redução $\geq 3 \log_{10}$ na contagem de UFC no tempo de 24 horas, em relação ao tempo 0 (zero), indica um efeito bactericida (LEBER, 2016).

Outro método bastante utilizado é o *checkerboard* (CB), no qual é realizada uma microdiluição em caldo, semelhante à realizada para antibiograma, com variadas concentrações de antimicrobianos isoladamente e combinados. Após a adição de uma suspensão bacteriana e incubação, determina-se a MIC dos dois antimicrobianos (hipoteticamente denominados A e B) isoladamente e combinados e calcula-se o índice de concentração inibitória fracionada (FICI, do inglês *fractional inhibitory concentration index*), de forma que $FICI = (MIC_{A+B} / MIC_A \text{ individualmente}) + (MIC_{B+A} / MIC_B \text{ individualmente})$. Uma $FICI \leq 0,5$ indica sinergismo, uma $FICI > 0,5$ e ≤ 4 é considerada indiferente e uma $FICI > 4$ caracteriza antagonismo (LEBER, 2016).

Cabe mencionar que os métodos TK e CB são trabalhosos, demandam tempo e expertise técnica, o que os torna inviáveis para serem executados em um laboratório de rotina de microbiologia. Desta forma, outros métodos mais simples também foram

propostos, como o método de disco-aproximação. Neste, observa-se uma inibição do crescimento bacteriano, comumente chamada de “zona fantasma”, na região entre dois discos que são colocados próximos na placa do antibiograma. A presença da zona fantasma indica a ocorrência de sinergismo. É interessante mencionar que esta metodologia fornece um resultado qualitativo, sendo mais indicada como um teste de *screening* (LEBER, 2016). Outro método é o disco-combinado, no qual combina-se os dois antimicrobianos no mesmo disco e compara-se o tamanho do halo deste disco com os discos dos antimicrobianos testados isoladamente. Ocorrendo uma diferença no tamanho dos halos, supõe-se a ocorrência de sinergismo (MARSHALL et al., 2017). Além destes, métodos utilizando fitas de gradiente de concentração, como a razão MIC:MIC (técnica de utilização de duas fitas de gradiente com sobreposição das MIC de cada um dos antimicrobianos no mesmo local), sobreposição direta de fitas e fitas cruzadas, foram propostos. No entanto, estes três métodos apresentaram baixas taxas de concordância em relação ao teste de TK (PANKEY; ASHCRAFT; DORNELLES, 2013).

Considerando o aumento da prevalência de NDM e da co-produção de serina e MBL, testes simples, como os de disco-aproximação (FALCONE et al., 2020) e de disco-combinado (MARSHALL et al., 2017), têm sido avaliados para a detecção de sinergismo para a combinação de ATM e CZA. Estes estudos demonstraram a ocorrência de sinergismo e a recuperação do tamanho de halo de inibição que indicava suscetibilidade no antibiograma para os dois antimicrobianos, supondo uma atividade sinérgica. Já com o uso de fitas de gradiente de concentração, um estudo que realizou os métodos razão MIC:MIC e fitas cruzadas demonstrou sinergismo para ATM com CZA em cepas co-produtoras de serina e MBL, porém não relacionou estes achados com testes de TK (AVERY; NICOLAU, 2018). Por outro lado, outros estudos demonstraram haver sinergismo desta mesma combinação, mas com a técnica de TK, para cepas produtoras de NDM ou co-produtoras de serina e MBL (BIAGI et al., 2019; ZHANG et al., 2018). O sinergismo para cepas co-produtoras de serina e MBL pode ser esperado quando não houver nenhum outro mecanismo de resistência presente. Entretanto, a resistência à CZA por outros mecanismos, que não a produção de carbapenemases, já foi relatada em diversos países (WANG et al., 2020), tornando importante a realização de um teste de sinergismo em laboratório de rotina de microbiologia.

2.8 TESTES PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES

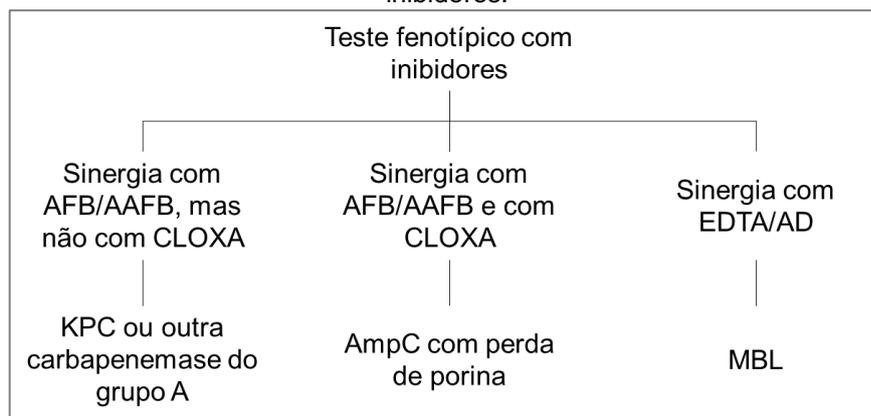
Testes para a detecção de mecanismos de resistência podem ser fenotípicos ou genotípicos. Os fenotípicos detectam a expressão do gene, enquanto os genotípicos detectam o gene, independentemente de estar sendo expresso ou não. Em laboratório de rotina de microbiologia, a detecção de resistência devido à produção de carbapenemases em *Enterobacterales* inicia com a triagem da suscetibilidade aos carbapenêmicos no antibiograma. De acordo com as recomendações do EUCAST, se a bactéria apresentar um tamanho de halo para o disco de meropenem menor que 25 mm ou meropenem com halo entre 25-27 mm e piperacilina/tazobactam resistente, ou ertapenem resistente, ou MIC de meropenem ou ertapenem > 0,125 mg/L, deve ser realizado algum teste adicional para a confirmação da produção de carbapenemase. Cabe enfatizar que os pontos de corte utilizados como triagem para detecção de resistência são diferentes dos pontos de corte clínicos para determinar a suscetibilidade ao meropenem. Outro aspecto importante é que o meropenem é o antimicrobiano com o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade para triagem de genes de carbapenemases em contraste com o ertapenem, o qual apresenta maior sensibilidade, mas menor especificidade (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST), 2017).

Os principais testes fenotípicos utilizados para confirmar a produção de carbapenemases incluem o Carba NP, Blue Carba, método de inativação do carbapenêmico (CIM, do inglês *carbapenem inactivation method*), método de inativação do carbapenêmico modificado (mCIM, do inglês *modified carbapenem inactivation method*), teste fenotípico com inibidores e testes imunocromatográficos. O teste Carba NP se baseia em incubar a bactéria com uma solução de imipenem; havendo a presença de alguma carbapenemase, ocorre a hidrólise do anel beta-lactâmico do carbapenêmico, o que leva a uma diminuição do pH e conseqüente mudança de cor do indicador vermelho de fenol de vermelho para amarelo (NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012). O teste Carba NP II, que derivou do Carba NP, utiliza os inibidores tazobactam e EDTA, possibilitando a diferenciação das classes de carbapenemases: serina e MBL (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012). O Blue Carba é baseado no mesmo princípio do Carba NP, porém utiliza o indicador de pH azul de bromotimol, que muda a cor de azul para verde ou amarelo, ou de verde

para amarelo, e é realizado diretamente de colônias (PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013). Uma grande vantagem destes dois métodos é o curto tempo necessário para reportar o resultado, que pode variar de aproximadamente 30 minutos a 2 horas, porém uma desvantagem é que a mudança de cor do indicador pode ser muito sutil se a expressão do gene da carbapenemase for baixa, levando a um resultado dúbio ou até falso negativo. Uma técnica que utiliza outro princípio, o método CIM, se baseia na colocação de um disco de meropenem por 2 horas em uma suspensão bacteriana em água; posteriormente, o disco é removido e colocado em uma placa de ágar Müeller-Hinton previamente inoculada com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, cepa sensível a meropenem. Se o isolado em teste for produtor de carbapenemase, o antimicrobiano será degradado e a *E. coli* ATCC 25922 irá crescer ao redor do disco; se o isolado não produzir carbapenemase, haverá uma zona de inibição do crescimento ao redor do disco. Este método necessita uma incubação de pelo menos 6 horas ou *overnight* (VAN DER ZWALUW et al., 2015). A diferença do método CIM em relação ao mCIM é que este utiliza meio de cultura ao invés de água e obrigatoriamente necessita incubação *overnight* (PIERCE et al., 2017). Quando realizado em conjunto com o mCIM, o eCIM (do inglês *EDTA-modified carbapenem inactivation method*) pode diferenciar a enzima carbapenemase no grupo serina ou no grupo MBL por incubar mais um tubo contendo EDTA (SFEIR et al., 2019).

O teste fenotípico com bloqueadores de carbapenemases é baseado em teste de disco-difusão do isolado suspeito de ser produtor de carbapenemase contendo pelo menos 4 discos de um ou dois carbapenêmicos (meropenem e imipenem): 1 disco contendo o antibiótico isoladamente, 1 disco contendo o antibiótico com ácido fenilborônico ou aminofenilborônico, 1 disco contendo o antibiótico com EDTA ou ácido dipicolínico e 1 disco contendo o antibiótico com cloxacilina. Para a interpretação dos resultados, considera-se a avaliação de eventual sinergia, ou seja, o aumento no tamanho do halo ≥ 5 mm no disco com algum inibidor em relação ao disco sem inibidor, sendo que os resultados são determinados conforme fluxo na figura 5 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; GISKE et al., 2011; POURNARAS et al., 2013). Os métodos apresentados até aqui, quando realizados com inibidores, podem identificar a classe da enzima que leva à resistência, porém não a enzima específica.

Figura 5 – Fluxograma para identificação da classe da carbapenemase pelo teste fenotípico com inibidores.



Fonte: adaptado de (GISKE et al., 2011; POURNARAS et al., 2013). AFB: ácido fenilborônico. AAFB: ácido aminofenilborônico. AD: ácido dipicolínico. CLOXA: cloxacilina.

Mais recentemente, foram desenvolvidos os testes imunocromatográficos, os quais são capazes de detectar enzimas específicas, como KPC, NDM, OXA-48 like, VIM e IMP, provavelmente, suas diversas variantes. De forma geral, os testes imunocromatográficos apresentam altas sensibilidade e especificidade e o tempo para execução e leitura do resultado fica em torno de até 20 minutos, porém também é um método que depende da expressão do gene e, por ser um produto comercial, possui um custo bastante elevado (GLUPCZYNSKI et al., 2017; MEUNIER et al., 2016; RÖSNER et al., 2019).

Da mesma forma, metodologias de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), também costumam apresentar alto custo, porém são considerados os métodos de referência para a confirmação de carbapenemases, visto que independe da expressão gênica. Na PCR, fragmentos de DNA são amplificados, chamados de amplicons, que são posteriormente detectados por algum sistema, sendo a eletroforese em gel de agarose o mais utilizado. A PCR seguida de um sistema de detecção costuma ser chamada “PCR convencional”, enquanto a variação da PCR que permite o monitoramento da amplificação em tempo real através da marcação com moléculas fluorescentes é denominada “em tempo real” ou “quantitativa” (qPCR), ou seja, nesta não há a necessidade de um sistema para sua detecção após amplificação. Além disso, após a realização da qPCR, é possível realizar uma análise quantitativa das curvas de dissociação dos fragmentos de DNA amplificados, chamada *high resolution melting* (HRM). Este tipo de análise pode ser aplicado para a detecção concomitante de vários genes de carbapenemases, o que caracteriza um ensaio multiplex. Apesar dos

métodos de PCR serem bastante sensíveis, não são capazes de detectar outros tipos de resistência além do gene específico que está sendo pesquisado (ARYA et al., 2005; BILOZOR et al., 2019; MACKAY, 2004; MONTEIRO et al., 2012).

As principais características dos métodos descritos até aqui estão resumidas na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos principais testes para detecção de carbapenemases.

Testes	Princípio	Tempo final para o resultado	Outras características
Carba NP	Detecção da hidrólise pela mudança de cor do indicador de pH vermelho de fenol	~30 min a 2 h	Não identifica a classe da carbapenemase
Carba NP II	Detecção da hidrólise pela mudança de cor do indicador de pH vermelho de fenol	~30 min a 2 h	Identifica a classe da carbapenemase
Blue Carba	Detecção da hidrólise pela mudança de cor do indicador de pH azul de bromotimol	Até ~2 h	Não identifica a classe da carbapenemase
CIM e mCIM	Detecção da hidrólise pela ausência de halo de inibição no antibiograma	6 h ou <i>overnight</i>	Não identifica a classe da carbapenemase
eCIM	Detecção da hidrólise pela ausência de halo de inibição no antibiograma	<i>Overnight</i>	Identifica a classe da carbapenemase
Imunocromatográfico	Detecção da enzima	~20 min	Identifica enzimas específicas
PCR	Detecção do gene	~4 h	Identifica genes específicos

Fonte: da autora.

2.9 METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS

O uso da tecnologia de MALDI-TOF MS revolucionou a rotina de laboratórios de microbiologia, pois permite a identificação bacteriana a nível de espécie e/ou gênero em poucos minutos. Para a identificação bacteriana, a colônia pode ser diretamente aplicada em um *spot* na placa do espectrômetro de massa ou pode passar por um processo de extração proteica prévia a sua aplicação na placa. Após a aplicação da bactéria ou de seu extrato proteico na placa, é acrescentada uma matriz, que é uma solução quimicamente saturada de um composto de baixa massa orgânica. Alguns exemplos de matriz são: α -ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico (HCCA, do inglês *α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*), 4-cloro- α -ácido cianocinâmico, ácido sinapínico (AS, do inglês *sinapinic acid*) e 2,5-dihidroxi ácido benzoico. (CHONG et al., 2018; JANG; KIM, 2018; VAN BELKUM et al., 2017; WOLK; CLARK, 2018).

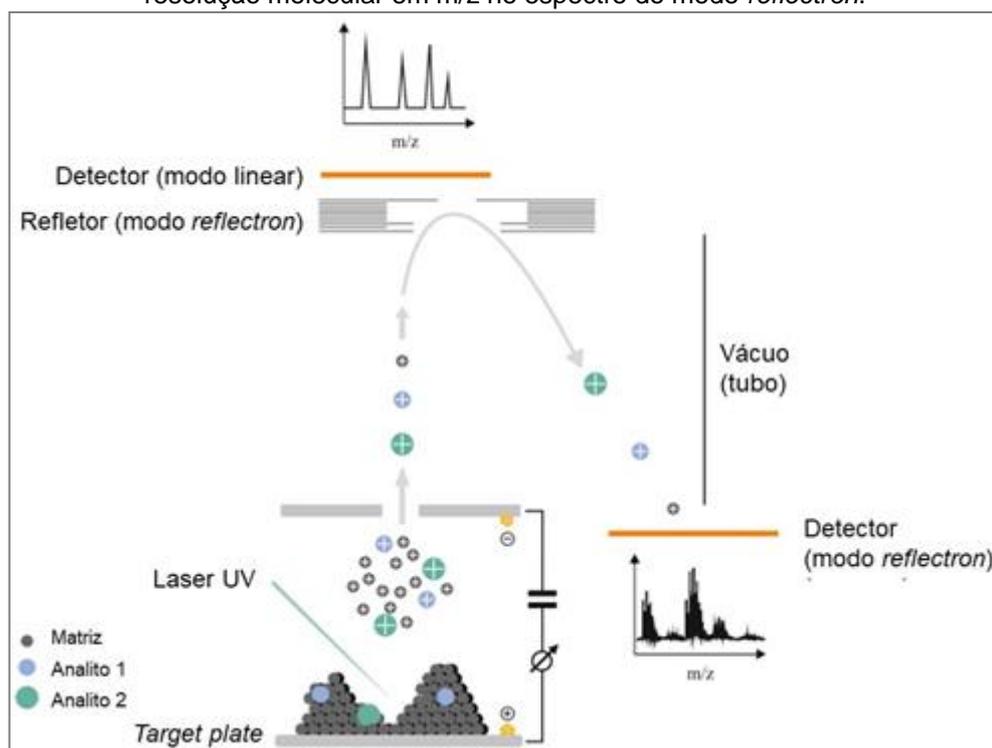
Na parte “MALDI” da metodologia um laser é incidido sobre o analito e a matriz orgânica, transferindo energia a estes para gerar moléculas (proteínas) ionizadas. Este laser provoca uma ionização leve, pois não rompe as ligações moleculares covalentes, ao contrário da ionização forte. Imediatamente após a ionização, que ocorre em nanosegundos após a incidência do laser, ocorre a sublimação e dessorção do analito e da matriz formando uma mistura gasosa que contém íons. Essa mistura gasosa é submetida a um campo eletrostático que provoca a aceleração destes íons em direção a um tubo onde há vácuo, iniciando neste momento a parte “TOF” da metodologia. Ao longo do tubo, onde não há nenhuma outra força atuando devido ao vácuo, os íons movem-se devido à energia cinética recebida do campo eletrostático e o tempo que as moléculas ionizadas levam para chegar no detector ao final do tubo é denominado de tempo de voo (TOF). O tempo que os íons levam para passar pelo campo de vácuo é diretamente proporcional à carga da partícula, bem como a sua massa, ou seja, quanto menor a molécula, mais rapidamente ela chegará ao detector (menor o seu tempo de voo). Assim, é possível calcular a razão m/z , a qual será plotada em um espectro em relação a sua intensidade, gerando um espectro de massa, caracterizando a parte “MS” (CHONG et al., 2018; WOLK; CLARK, 2018).

Para a identificação bacteriana, o espectro gerado é comparado a um banco de dados de espectros, possibilitando a identificação do microrganismo. As principais proteínas avaliadas para identificação são as ribossômicas, que são as proteínas mais conservadas na evolução das espécies bacterianas. As proteínas ribossomais são,

portanto, únicas para cada espécie e apresentam tamanho entre 2.000 e 20.000 Da. (CHONG et al., 2018; WOLK; CLARK, 2018).

O modo de funcionamento da metodologia descrita acima denomina-se modo linear, pois as moléculas passam apenas por um caminho linear até o detector. Existe o modo *reflectron* ou TOF/TOF, no qual as moléculas, ao chegarem no final do tubo linear, são refletidas e direcionadas em outro sentido no qual está o detector (Figura 6). O modo *reflectron* faz com que as moléculas percorram um caminho maior até o detector, o que permite que elas se distanciem melhor entre si, resultando em uma melhor diferenciação entre moléculas com m/z muito similares, ou seja, há uma melhora na resolução dos picos. O campo elétrico também possui os modos de íon positivo e negativo, de forma que o primeiro apresenta um campo que irá mover íons positivos e o segundo, íons negativos (LEOPOLD et al., 2018).

Figura 6 – Funcionamento de um equipamento de MALDI-TOF/MS. Pode-se visualizar a melhor resolução molecular em m/z no espectro do modo *reflectron*.



Fonte: adaptado de (LEOPOLD et al., 2018).

Apesar de ter um elevado custo inicial para aquisição do equipamento, o custo dos insumos por análise na metodologia de MALDI-TOF MS é bastante baixo. Além disso, a maior vantagem desta metodologia, como já mencionado, é a rapidez da

análise, pois permite a identificação do microrganismo em apenas alguns minutos (JANG; KIM, 2018).

2.10 DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E ANTIBIOGRAMA POR MALDI-TOF MS

A utilização da metodologia de MALDI-TOF MS com outras finalidades além da identificação microbiana começou a ser avaliada em 2000, com a utilização da metodologia para detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (EDWARDS-JONES et al., 2000). Contudo, somente a partir de 2007 que houve um incremento de estudos de detecção de resistência e testes de suscetibilidade por MALDI-TOF MS com trabalhos que demonstraram as seguintes possibilidades: a utilização da técnica para a identificação de beta-lactamase que leva à resistência à ampicilina (CAMARA; HAYS, 2007), a realização de teste de suscetibilidade ao fluconazol para *Candida albicans* (MARINACH et al., 2009), a detecção da atividade hidrolítica de carbapenemases (HRABÁK et al., 2011), teste de suscetibilidade bacteriana com e sem marcação de isótopos estáveis (DEMIREV et al., 2013; LANGE et al., 2014), entre outros. De forma geral, os testes com a metodologia de MALDI-TOF MS propostos até o momento podem ser agrupados conforme seu objetivo, ou seja, uma abordagem relacionada especificamente ao mecanismo/antimicrobiano ou uma abordagem universal. Na primeira, pode-se determinar mudanças do composto antimicrobiano devido à presença de algum mecanismo de resistência ou identificar picos específicos no espectro relacionados a um determinado mecanismo de resistência. Na segunda abordagem, analisa-se o crescimento microbiano na presença de antimicrobianos (IDELEVICH; BECKER, 2021).

2.10.1 Metodologias de hidrólise

As metodologias para detecção de hidrólise do antimicrobiano por MALDI-TOF MS se baseiam na incubação da bactéria com uma solução contendo antibiótico por um determinado período e, posteriormente, o sobrenadante é analisado no espectrômetro de massa. No espectro gerado, verifica-se a presença ou ausência de picos com massa/carga (m/z) que são específicos da molécula intacta do antimicrobiano ou de seus metabólitos. A presença de picos do antimicrobiano intacto, bem como de eventuais picos referentes aos seus metabólitos não-hidrolisados (moléculas naturalmente hidrogenadas, por exemplo), indica a ausência de hidrólise, no caso de enzima beta-lactamase se for um antibiótico beta-lactâmico. Por outro lado, a ausência do pico referente ao antimicrobiano intacto e a presença de metabólitos hidrolisados evidencia uma atividade hidrolítica, ou seja, a presença de uma beta-lactamase (HRABÁK; CHUDÁČKOVÁ; WALKOVÁ, 2013).

Cada antimicrobiano apresenta diferentes picos e, portanto, diferentes m/z , referentes a sua molécula intacta ou a seus metabólitos ionizados empregados em testes de hidrólise por MALDI-TOF MS (Tabela 2). A hidrólise de cefalosporinas de 3ª geração pode indicar a presença de ESBL e/ou carbapenemases, enquanto que a hidrólise de carbapenêmicos indica a presença de carbapenemases (OVIAÑO et al., 2017).

Tabela 2 – Moléculas intactas não ionizadas e ionizadas e seus metabólitos ionizados.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Moléculas intactas</i>	<i>Metabólitos</i>
Cefotaxima	455,5 g/mol [M]	
	456,5 m/z [M + H] ⁺	414,5 [M _{Hidrol.} -X + H] ⁺
	478,5 m/z [M + Na] ⁺	370,5 [M _{Hidrol.} Descarb. -X + H] ⁺
	396,5 m/z [M-X + H] ⁺	
Ceftazidima	546,6 g/mol [M]	
	547,6 m/z [M + H] ⁺	486,6 [M _{Hidrol.} -X + H] ⁺
	468,6 m/z [M-X + H] ⁺	442,6 [M _{Hidrol.} Descarb. -X + H] ⁺
Ertapenem	475,5 g/mol [M]	494,5 m/z [M _{Hidrol.} + H] ⁺
	476,5 m/z [M + H] ⁺	516,5 m/z [M _{Hidrol.} + Na] ⁺
	498,5 m/z [M + Na] ⁺	538,5 m/z [M _{Hidrol.} + 2 Na] ⁺
	514,5 m/z [M + K] ⁺	554,5 m/z [M _{Hidrol.} + Na + K] ⁺
	520,5 m/z [M + 2 Na] ⁺	450,5 m/z [M _{Hidrol.} Descarb. + H] ⁺
	536,5 m/z [M + Na + K] ⁺	472,5 m/z [M _{Hidrol.} Descarb. + Na] ⁺
Meropenem	542,5 m/z [M + 3 Na] ⁺	488,5 m/z [M _{Hidrol.} Descarb. + K] ⁺
	383,4 g/mol [M]	
	384,5 m/z [M + H] ⁺	358,5 m/z [M _{Hidrol.} Descarb. + H] ⁺
	406,5 m/z [M + Na] ⁺	380,5 m/z [M _{Hidrol.} Descarb. + Na] ⁺
	428,5 m/z [M + 2 Na] ⁺	

X: acetil para cefotaxima, piridina para ceftazidima. Hidrol.: hidrolisada. Descarb.: descarboxilada. Fonte: adaptado de (BRUKER, 2015).

Para a detecção de carbapenemases, diversos estudos foram realizados com a técnica de hidrólise, com diferentes tempos de incubação (de 20 minutos a 4 horas), avaliando diversos antimicrobianos (ertapenem, imipenem e meropenem) e várias espécies (*Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.). Além disso, também foram desenvolvidas e avaliadas diferentes formas de interpretação da análise do espectro para determinar a ocorrência de hidrólise. Inicialmente, foi proposta a análise visual, baseada apenas na observação da presença ou ausência dos picos da molécula intacta e de seus metabólitos e, portanto, classificando a bactéria em hidrolítica ou não-hidrolítica. Entretanto, da mesma forma que os métodos fenotípicos para detecção da hidrólise citados anteriormente, este método de avaliação também pode acabar sendo subjetivo, principalmente se a bactéria testada possui uma fraca expressão do gene da beta-lactamase. Assim, como é possível avaliar a intensidade do pico que é relativa à quantidade da molécula, os valores das intensidades podem ser aplicados em cálculos para determinar quantitativamente se há ou não hidrólise, a partir da determinação de um ponto de corte (BURCKHARDT; ZIMMERMANN, 2011; GHEBREMEDHIN et al., 2016; HRABÁK et al., 2011; JUNG et al., 2014; KOST et al., 2017; LASSERRE et al., 2015; LEE et al., 2018; MILTGEN et al., 2018; OVIAÑO et al., 2016; YU et al., 2018).

Um método automatizado para calcular a hidrólise foi desenvolvido pela empresa Bruker, o módulo MBT STAR-BL, que é implementado ao software de identificação Compass (Bruker Daltonics). As intensidades dos picos são utilizadas para calcular o logRQ, que é o logaritmo da razão da soma das intensidades das formas hidrolisadas em relação à soma das intensidades das formas não-hidrolisadas. Assim, um alto valor de logRQ indica alta atividade hidrolítica e um baixo valor de logQR indica baixa ou ausência de atividade hidrolítica (BRUKER, 2015; KAWAMOTO et al., 2018).

Apesar destas metodologias para detecção de hidrólise descritas acima não conseguem identificar especificamente qual é a enzima responsável pela hidrólise, a realização em um curto espaço de tempo e uma medida quantitativa 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 (HRABÁK et al., 2011).

2.10.2 Detecção direta de KPC

A detecção direta, a partir de colônias crescidas em ágar, de carbapenemases como a enzima KPC, por MALDI-TOF MS foi avaliada em diversos estudos. A KPC seria identificada por esta metodologia quando fosse possível observar um pico aproximado de 11.109 m/z, o qual representa um produto clivado da proteína pKpQIL_p019 (p019), cuja massa molecular hipotética é 11.107,8 Da. Esta proteína foi relacionada a plasmídeos carreadores do gene *bla_{KPC}*, que leva à produção da enzima KPC. Assim, o produto da proteína p019, de tamanho 11.109 m/z, é considerado um marcador de plasmídeos que contêm o gene (LAU et al., 2014). Alguns estudos, utilizando o pico 11.109 m/z, apresentaram resultados variáveis quanto à sensibilidade do método, pois isolados que não apresentam o pico 11.109 m/z poderiam ter uma baixa expressão do gene ou o plasmídeo simplesmente não possuía o gene que leva à produção da p019 (FIGUEROA-ESPINOSA et al., 2019; GAIBANI et al., 2016; LAU et al., 2014; ROCCO et al., 2019; YOUN et al., 2016).

Outros estudos foram capazes de detectar a molécula intacta da KPC-2, que possui tamanho hipotético de 28.477 Da. A molécula da KPC-2 foi identificada com tamanhos aproximados de 28.544 m/z (FIGUEROA-ESPINOSA et al., 2019) e de 28.719 m/z (YOON et al., 2020). Para a identificação inicial do pico referente à molécula da KPC, foi construído um plasmídeo recombinante sendo que para esta construção, o gene da KPC-2 foi amplificado por PCR e clonado em um vetor pK19, que foi transformado em uma *Escherichia coli* TOP10. Após seleção da *E. coli* TOP10 em meio contendo imipenem, seu extrato proteico foi analisado por MALDI-TOF MS em um range que abrangia a massa hipotética da KPC. Através de um software, foi possível detectar a presença de um pico próximo ao tamanho hipotético da KPC. Posteriormente, este pico se mostrou presente em todos os isolados que haviam sido previamente identificados como produtores de KPC por métodos moleculares e estava ausente nos isolados negativos para KPC (FIGUEROA-ESPINOSA et al., 2019).

Quanto a outras enzimas, estudos identificaram picos marcadores de uma beta-lactamase produzida por *E. coli* resistente à ampicilina (CAMARA; HAYS, 2007), da cefalosporinase CMY-2-like (PAPAGIANNITSIS et al., 2014), de TEM-1, do grupo CTX-M-1 e de VIM-1 (HART et al., 2015). Interessantemente, até o momento, não foram encontrados estudos publicados que tenham buscado a identificação de picos marcadores para NDM.

2.10.3 Determinação da suscetibilidade por MBT-ASTRA

A metodologia chamada *MALDI Biotyper – antibiotic susceptibility test rapid assay* (MBT-ASTRA) tem como princípio avaliar diferenças nos espectros de uma mesma bactéria que foi incubada na presença e na ausência de antimicrobiano. Nesta metodologia, a bactéria é incubada em 2 tubos: (1) um tubo contendo apenas meio de cultura; e (2) outro tubo com meio de cultura e antimicrobiano. Após um tempo de incubação, é realizada a extração proteica sendo que durante o processo de extração, adiciona-se um padrão interno, geralmente RNase B, aos dois tubos. Em seguida, estes extratos proteicos bacterianos com o controle interno são analisados por MALDI-TOF MS. Na análise de um espectro de massa, após subtrair a *baseline* (ruído), todos os picos têm suas intensidades arbitrárias (a.u., do inglês *arbitrary units*) transformadas em intensidades relativas de 0 a 1 em comparação à intensidade do maior pico. Após a normalização dos espectros, a área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) do espectro da bactéria incubada com o antimicrobiano é comparada com a AUC do espectro da bactéria incubada sem o antimicrobiano. Esta comparação é expressa pela razão $AUC_{\text{Com antibiótico}} / AUC_{\text{Sem antibiótico}}$, gerando um valor que é denominado de crescimento relativo (CR). Assim, uma razão $AUC_{\text{Com antibiótico}} / AUC_{\text{Sem antibiótico}}$, ou seja, um valor de CR, próximo a 1 indica que a bactéria é resistente ao antimicrobiano, já que não houve alteração na sua taxa de crescimento no tubo com antimicrobiano em comparação ao tubo sem o antimicrobiano. Por outro lado, um CR próximo à zero indica sensibilidade ao antimicrobiano (LANGE et al., 2014).

Alguns estudos de MBT-ASTRA já realizados demonstraram bons resultados para as combinações cefotaxima-*E. coli*, meropenem-*Klebsiella pneumoniae*, meropenem-*Pseudomonas aeruginosa*, tobramicina-*K. pneumoniae*, tobramicina-*P. aeruginosa*, tobramicina-*Acinetobacter baumannii* (LANGE et al., 2014; SPARBIER; SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2016). A técnica também foi desenvolvida para *Pasteurella multocida* (VAN DRIESSCHE et al., 2018), *Bacteroides fragilis* (JUSTESEN et al., 2018) e micobactérias (CEYSSSENS et al., 2017). Além destes estudos, que realizaram a técnica a partir da colônia crescida em ágar, outros também conseguiram realizá-la diretamente a partir do crescimento bacteriano em frascos de hemocultura (AXELSSON; REHNSTAM-HOLM; NILSON, 2019; JUNG et al., 2016; SAUGET; BERTRAND; HOCQUET, 2018).

Os estudos citados acima utilizam, para a análise dos espectros e cálculo do CR, um software protótipo da empresa Bruker, fabricante de espectrômetros de massa, ou o software R com o pacote MALDIquant, disponível gratuitamente. No entanto, o software protótipo não está disponível comercialmente, enquanto o R necessita conhecimento aprofundado em informática. Uma alternativa ao uso destes softwares é a análise dos espectros de forma manual, ainda pouco explorada, já que não há estudos publicados com esta adaptação. Na análise manual, conforme sugerido por um trabalho (dados não publicados) realizado no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, os valores da AUC ou da intensidade de 3 picos da bactéria e de 3 picos do padrão interno são inseridos em um cálculo (Figura 7) que também fornece o CR.

Figura 7 – Cálculo do crescimento relativo (CR). A razão da área sob a curva (AUC) da bactéria pela AUC da RNase B representa a normalização.

$$CR = \frac{\left(\frac{AUC_{\text{Bactéria com ATB}}}{AUC_{\text{RNase com ATB}}} \right)}{\left(\frac{AUC_{\text{Bactéria sem ATB}}}{AUC_{\text{RNase sem ATB}}} \right)}$$

Fonte: da autora.

As principais vantagens do MBT-ASTRA consistem na rapidez do resultado e na determinação da suscetibilidade, que poderia ser detectada, a princípio, para qualquer bactéria frente a qualquer antimicrobiano, já que utiliza a taxa de crescimento bacteriano independentemente do mecanismo de resistência (HRABÁK; CHUDÁČKOVÁ; PAPAGIANNITSIS, 2014). É interessante mencionar que, considerando que métodos para avaliação de sinergismo se baseiam em princípios do antibiograma, ou seja, determinam de certa forma a taxa de crescimento bacteriano, ainda não há estudos avaliando, por MALDI-TOF MS, o sinergismo de antimicrobianos combinados.

3 JUSTIFICATIVA

Bactérias da ordem *Enterobacterales*, como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, são os principais bacilos Gram negativos responsáveis por diversos tipos de infecções. Isolados dessas espécies resistentes a carbapenêmicos estão relacionados com taxas aumentadas de morbidade e mortalidade, cuja principal causa é a terapia antimicrobiana inadequada (CIZMAN; SROVIN, 2018; THEURETZBACHER, 2017). A resistência bacteriana é uma ameaça que vem crescendo, primeiramente pela alta disseminação das carbapenemases KPC e, mais recentemente, da NDM, que levam à resistência aos carbapenêmicos (BONOMO et al., 2018; WINK et al., 2020).

O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), em 2013, classificou as bactérias da ordem *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos como ameaça urgente (de maior risco) à saúde humana, mantendo esta classificação também em 2019 (CDC, 2019). Isso significa que são consideradas ameaças à saúde pública, necessitando ações urgentes e imediatas. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma lista de prioridade global de bactérias resistentes a antimicrobianos para guiar a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos, colocando as bactérias da ordem *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de 3ª geração, *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos como as bactérias de prioridade “Crítica” (Prioridade 1). A OMS lançou, em 2015, um plano de ação global contra a resistência microbiana, colocando, entre outros, objetivos estratégicos de fortalecer o conhecimento e evidências através de vigilância e pesquisa e aumentar o investimento em ferramentas de diagnóstico (WHO, 2015).

No Brasil, em 2017, a ANVISA publicou o Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde, seguindo a mesma linha do plano de ação global da OMS. Neste plano, segundo o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14, de dezembro de 2016, foram reportadas taxas de resistência aos carbapenêmicos para *K. pneumoniae* de 43,3%, *E. coli* de 9,7% e *Enterobacter* spp. de 21,6%. Foi lançado, mais recentemente, o Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2020 (PAN-BR), com diversos objetivos estratégicos, sendo um deles o de fortalecer os conhecimentos e a base científica por meio da

vigilância e pesquisa, de modo que pesquisas em resistência microbiana sejam fomentadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Além da preocupação mundial sobre o aumento da disseminação de mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos, devido ao desenvolvimento das novas combinações de antimicrobianos com inibidores de beta-lactamase que possuem efeito somente sobre determinadas enzimas, como por exemplo ceftazidima/avibactam que possui efeito sobre KPC, mas não sobre NDM, tornou-se necessária a identificação destas enzimas (BUSH, 2018).

Assim, tendo em vista os objetivos da OMS, Ministério da Saúde e ANVISA e a necessidade da detecção e identificação dos mecanismos de resistência para o tratamento adequado imediato de infecções causadas por bactérias resistentes, a detecção de mecanismos de resistência e a determinação da suscetibilidade a antimicrobianos que forneçam resultados em poucas horas trariam enorme benefício para a saúde do paciente e diminuiria os custos de uma estadia hospitalar prolongada. Para o desenvolvimento desses ensaios rápidos, a metodologia de MALDI-TOF MS torna-se promissora. Existem estudos com protocolos variados utilizando as técnicas de detecção de hidrólise, de enzimas beta-lactamases e MBT-ASTRA, porém mais estudos devem ser realizados a fim de comprovar a sua aplicação em laboratórios de microbiologia de rotina, bem como encontrar formas mais acessíveis para sua utilização.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias rápidas para a detecção de mecanismos de resistência e determinação da suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos por MALDI-TOF MS.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar um índice quantitativo para a metodologia de detecção da hidrólise de meropenem em isolados de *Klebsiella pneumoniae* por MALDI-TOF MS.
- 2) Avaliar a detecção da enzima KPC, por MALDI-TOF MS, de bactérias impregnadas em papel-filtro.
- 3) Avaliar uma adaptação da metodologia MBT-ASTRA para determinação da suscetibilidade de isolados de *Enterobacterales* a meropenem por MALDI-TOF MS.
- 4) Adaptar a técnica de MBT-ASTRA realizada a partir de hemocultura positiva com isolados *Enterobacterales*.
- 5) Desenvolver a técnica de MBT-ASTRA para a detecção de sinergismo antimicrobiano de aztreonam associado a ceftazidima/avibactam em isolados de *K. pneumoniae*, relacionando com a técnica de *time-kill* e a metodologia de disco-aproximado.

5 MANUSCRITOS E RESULTADOS PARCIAIS

5.1 MANUSCRITO 1

Considerando a necessidade de identificação rápida da presença de carbapenemases e a subjetividade na interpretação dos testes de BlueCarba e Carba NP quando há uma baixa atividade hidrolítica das carbapenemases, buscou-se avaliar as metodologias já publicadas que avaliavam a atividade hidrolítica de carbapenemases por MALDI-TOF MS. Também observando o princípio de normalização dos espectros com um padrão interno, utilizado nos testes de MBT-ASTRA (LANGE et al., 2014), supôs-se que se a utilização de um padrão interno poderia fornecer uma avaliação quantitativa mais adequada para a detecção da atividade hidrolítica das carbapenemases.

Desta forma, a fim de atingir o objetivo 1, realizou-se o estudo que se encontra concluído na forma de um artigo, publicado em 2021 no *Journal of Microbiological Methods*, sob o título *Establishing a quantitative index of meropenem hydrolysis for the detection of KPC- and NDM-producing bacteria by MALDI-TOF MS* (<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106268>). Este manuscrito encontra-se a seguir.

O capítulo 5.1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 58 – 64.

Wilhelm CM, Forni GR, Carneiro MS, Barth AL. Establishing a quantitative index of meropenem hydrolysis for the detection of KPC- and NDM-producing bacteria by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**. v. 187, p. 1–6, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106268>

5.2 MANUSCRITO 2

Dentre as novas combinações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases, como ceftazidima/avibactam (CZA), meropenem/vaborbactam e imipenem/relebactam, somente CZA foi liberada no Brasil pela ANVISA, em 2018. Contudo, começou a ser utilizada com mais frequência por volta de 2020, quando houve uma limitação dos antimicrobianos disponíveis para tratamento de bactérias multirresistentes durante a pandemia da COVID-19. Assim, lembrando que CZA tem ação sobre KPC e outras serina-carbapenemases, mas não sobre MBL, apenas a detecção da hidrólise dos carbapenêmicos, sem identificação da enzima, já não é mais suficiente para guiar o tratamento antimicrobiano.

Um estudo desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS aprimorou um protocolo que é capaz de identificar o pico específico da enzima KPC por MALDI-TOF MS (MOREIRA et al., 2022). Paralelamente, outro estudo, também desenvolvido no LABRESIS, demonstrou a capacidade de identificação da bactéria, impregnada em papel de filtro, a nível de gênero e/ou espécie de isolados bacterianos (CARNEIRO et al., 2020). Assim, da mesma forma que as proteínas bacterianas são extraídas do papel-filtro para a identificação por MALDI-TOF MS, supôs-se que a molécula proteica da KPC também poderia ser identificada a partir da bactéria impregnada em papel de filtro.

Assim, foi desenvolvido o manuscrito apresentado a seguir, a fim de atingir o objetivo 2.

O texto completo do capítulo 5.2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 66 – 80, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Apresenta uma avaliação da detecção da enzima KPC a partir de bactéria impregnada em papel-filtro.

5.3 MANUSCRITO 3

Como mencionado anteriormente, a indicação da pesquisa de carbapenemase é recomendada quando houver um halo de meropenem < 28 mm ou MIC de meropenem > 0,125 mg/L. Isto implica no fato de que é possível haver isolados produtores de carbapenemases e sensíveis a meropenem. Mesmo havendo a produção de carbapenemases, se houver suscetibilidade ao meropenem, por exemplo, este ainda poderia ser uma opção terapêutica, o que torna a realização do antibiograma extremamente importante.

Assim, buscando facilitar a execução da metodologia para determinação da suscetibilidade a antimicrobianos por MALDI-TOF MS, conforme estudos já publicados, desenvolveu-se o estudo a seguir, para atingir o objetivo 3. O manuscrito foi publicado pelo *Microbiology Spectrum* em janeiro de 2023, sob o título *A Rapid and Easy Method of MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay To Provide Early Meropenem Susceptibility Profile in Enterobacterales* (<https://doi.org/10.1128/spectrum.04375-22>).

O capítulo 5.3 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 82 – 92.

Wilhelm CM, Carneiro MS, Inamine E, Barth AL. A Rapid and Easy Method of MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay To Provide Early Meropenem Susceptibility Profile in Enterobacterales. **Microbiology Spectrum**. v. 11, n. 1, p. 1–10, 2023. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04375-22>

5.4 MANUSCRITO 4

Com o objetivo de desenvolver testes de suscetibilidade rápidos e considerando que os estudos que avaliaram a metodologia de MBT-ASTRA realizaram pré-processamentos variados previamente à incubação com antimicrobianos, avaliou-se essa metodologia diretamente a partir de hemocultura para meropenem e ceftazidima/avibactam. É importante notar que ainda não foram encontrados estudos que tenham avaliado a metodologia MBT-ASTRA com ceftazidima/avibactam. Assim, para contemplar o objetivo 4, foi desenvolvido um protocolo de MBT-ASTRA para ser utilizado diretamente de frascos de hemocultura conforme o manuscrito a seguir.

O texto completo do capítulo 5.4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 94 – 102, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Demonstra a aplicabilidade da metodologia de MBT-ASTRA para determinar o perfil de suscetibilidade a ceftazidima/avibactam e a meropenem diretamente de frascos positivos de hemocultura.

5.5 MANUSCRITO 5

Da mesma forma que testes de sinergismo se baseiam em princípios de antibiograma e taxa de crescimento bacteriano, supôs-se que a metodologia de MBT-ASTRA também poderia ser empregada para tal finalidade. Considerando o aumento da disseminação da enzima NDM e da produção concomitante desta enzima e da KPC, foi desenvolvido um estudo com MALDI-TOF MS para a determinação de sinergismo da combinação de aztreonam e ceftazidima/avibactam.

Os resultados deste estudo estão apresentados no manuscrito a seguir, com a finalidade de atingir o objetivo 5.

O texto completo do capítulo 5.5, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 104 – 126, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Demonstra a aplicabilidade da metodologia de MBT-ASTRA para determinar sinergismo da combinação de aztreonam com ceftazidima/avibactam.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A utilização da metodologia de MALDI-TOF MS revolucionou o campo da microbiologia ao permitir uma rápida identificação microbiana. No entanto, é de grande relevância que essa metodologia pode ser ainda mais utilizada, através da determinação da detecção de mecanismos de resistência, seja pela hidrólise ou pela detecção direta da enzima que leva à resistência, e da determinação suscetibilidade a antimicrobianos, incluindo a avaliação de sinergismo.

De acordo com os resultados obtidos até o momento, pode-se concluir que:

- foi possível estabelecer um índice quantitativo para a metodologia de MALDI-TOF MS para detecção da hidrólise de carbapenêmicos, indicando, com mais confiança e menos subjetividade, a presença da atividade de carbapenemases;
- foi possível detectar a enzima KPC a partir de bactérias impregnadas em papel-filtro;
- foi possível estabelecer uma forma mais simples da técnica de MBT-ASTRA em relação à análise dos espectros e cálculo do crescimento relativo;
- foi possível determinar o perfil de suscetibilidade a ceftazidima/avibactam e meropenem de isolados de *Enterobacterales* a partir de hemoculturas positivas usando a técnica de MBT-ASTRA.
- foi possível avaliar o sinergismo da combinação de aztreonam e ceftazidima/avibactam a partir de colônia bacteriana de isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Após o desenvolvimento das metodologias apresentadas nesta tese, pode-se observar que a metodologia de MALDI-TOF MS apresenta diversas vantagens, destacando-se a agilidade na obtenção de espectros. Entretanto, é notável que ainda existem algumas limitações, como a falta de ferramentas que tornem a determinação da taxa de crescimento bacteriano mais rápida e a baixa resolução desta técnica, notável ao trabalhar principalmente com moléculas de massas maiores, como a da molécula da KPC. Já para moléculas pequenas, como as de antimicrobianos e seus metabólitos, a técnica se mostrou bastante reprodutível.

Ainda, pretende-se desenvolver um protocolo para detecção da enzima NDM, baseado no protocolo realizado para a detecção da enzima KPC. Além disso,

pretende-se testar mais antibióticos, como amicacina e tigeciclina entre outros, desenvolvendo um painel com a técnica de MBT-ASTRA a fim de possivelmente estabelecê-la como uma metodologia para determinação da suscetibilidade. Também será elaborado um projeto a fim de desenvolver e validar uma ferramenta web para processamento mais rápido dos espectros, bem como para calcular o valor do crescimento relativo.

Assim, fica evidenciado que a metodologia de MALDI-TOF MS pode ser amplamente explorada para além da identificação bacteriana, podendo ainda ser complementada com outras formas de análise dos espectros, como por exemplo *machine learning*. Desta forma, acredita-se que esta metodologia pode se tornar ainda mais rápida e aplicável a uma rotina de um laboratório de microbiologia, agilizando os resultados de detecção de resistência bacteriana e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos sozinhos ou combinados.

7 TRABALHOS E ATIVIDADES COMPLEMENTARES

7.1 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS CO-PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES

Há um projeto, em andamento, que tem como objetivo a detecção fenotípica de bactérias coprodutoras de carbapenemases. Este estudo se baseia na utilização dos inibidores das classes de carbapenemases e visa detectar a coprodução de carbapenemases: KPC e NDM, KPC e OXA-48-like, NDM e OXA-48-like.

Parte deste estudo se tornou o trabalho de conclusão de curso da aluna Giovanna de Ross Forni.

7.2 PARTICIPAÇÃO EM OUTROS ESTUDOS PUBLICADOS

MOREIRA, N.K.; **WILHELM, C.M.**; WINK, P.L.; BARTH, A.L.; CAIERÃO, J. MALDI-TOF mass spectrometry for direct KPC detection among *Enterobacterales*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1907-1913, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-022-00798-y>.

CARNEIRO, M.S.; CRISPIM, M.N.; **WILHELM, C.M.**; VOLPATO, F.C.Z.; BARTH A.L. Evaluation of filter paper as a means of transporting inactivated Gram-negative non-fermentative bacteria and *Haemophilus* spp. for identification using the MALDI-TOF MS system. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 1, 17-23, 2022. <https://doi.org/10.1111/lam.13695>.

RIBEIRO, I.D.A; BACH, E.; MOREIRA, F.S.; MÜLLER, A.R.; RANGEL, C.P.; **WILHELM, C.M.**; BARTH, A.L.; PASSAGLIA, L.M.P. Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots. **Microbiological Research**, v. 248, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126754>.

7.3 PUBLICAÇÃO DE RESUMOS EM ANAIS DE EVENTOS

WILHELM, C.M.; MOREIRA, N.K.; CAIERÃO, J., BARTH, A.L. Evaluation of the ceftazidime/avibactam susceptibility by MALDI-TOF MBT-ASTRA directly from positive blood cultures. In: 8º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2022.

WILHELM, C.M.; MOREIRA, N.K.; CAIERÃO, J., BARTH, A.L. Susceptibility of ceftazidime/avibactam directly from positive blood culture by MALDI-TOF MBT-ASTRA. In: 42ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2022.

WILHELM, C.M.; MOREIRA, N.K.; CARNEIRO, M.S., WINK, P.L., CAIERÃO, J., BARTH, A.L. Have you ever thought about sending bacteria by conventional mail to identify the KPC enzyme using MALDI-TOF MS? In: 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021.

WILHELM, C.M.; CARNEIRO, M.S.; BARTH, A.L. Meropenem hydrolysis index for detecting KPC and NDM by MALDI-TOF/MS. In: 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2020.

MOREIRA, N.K.; **WILHELM, C.M.**; WINK, P.L.; BARTH, A.L.; CAIERAO, J. Evaluation of carbapenem hydrolysis by *Enterobacterales* directly from positive blood cultures using MALDI-TOF/MS. In: 8º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2022.

MOREIRA, N.K.; **WILHELM, C.M.**; CARNEIRO, M.S.; WINK, P.L.; BARTH, A.L.; CAIERAO, J. MALDI-TOF mass spectrometry for direct KPC detection in *Enterobacterales*. In: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021.

CARNEIRO, M.S.; **WILHELM, C.M.**; WINK, P.L.; BARTH, A.L. Evaluation of early reading of Broth Microdilution technique for Polymyxin B. In: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID), 2021.

CARNEIRO, M.S.; ECHEVARRIA, A.D.; **WILHELM, C.M.**; VOLPATO, C.F.Z.; WINK, P.L.; BARTH, A.L. Early reading of the susceptibility test by Broth Microdilution for

Polymyxin B: comparative analysis of visual reading with an automated (SpectraMax M3) microplate reader. In: 41ª Semana Científica do HCPA, 2021.

CARNEIRO, M. S.; CRISPIM, M. N.; **WILHELM, C. M.**; VOLPATO, F.C.Z.; BARTH, A. L. Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated Gram negative non-fermentative bacteria and fastidious microorganisms for identification using the MALDI-TOF MS system. In 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020.

7.4 APRESENTAÇÃO ORAL EM EVENTOS

WILHELM, C.M.; MOREIRA, N.K.; CAIERÃO, J., BARTH, A.L. Evaluation of the ceftazidime/avibactam susceptibility by MALDI-TOF MBT-ASTRA directly from positive blood cultures. In: 8º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2022.

WILHELM, C.M.; MOREIRA, N.K.; CAIERÃO, J., BARTH, A.L. Susceptibility of ceftazidime/avibactam directly from positive blood culture by MALDI-TOF MBT-ASTRA. In: 42ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2022.

WILHELM, C.M.; BARTH, A.L. Hydrolysis index for detection of KPC and NDM activity in *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. In: XII Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS, 2020.

WILHELM, C.M.; BARTH, A.L. Detecção rápida de resistência bacteriana pela hidrólise de meropenem usando MALDI-TOF/MS. In: X Congresso Internacional de Bioanálises e XVIII Semana Gaúcha de Biomedicina, 2019.

MOREIRA, N.K.; **WILHELM, C.M.;** CARNEIRO, M.S.; WINK, P.L.; BARTH, A.L.; CAIERAO, J. MALDI-TOF mass spectrometry for direct KPC detection in Enterobacterales. In: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021.

CARNEIRO, M.S.; CRISPIM, M. N.; **WILHELM, C.M.;** VOLPATO, F.C.Z.; BARTH, A. L. Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated Gram negative non-fermentative bacteria and fastidious microorganisms for identification using the MALDI-TOF MS system. In: 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020.

7.5 PREMIAÇÕES

Prêmio *Mérito Acadêmico Elfrides Shapoval*. Concedido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – UFRGS, em 2020, pelo trabalho apresentado no XII Encontro do PPGCF, intitulado *Hydrolysis index for detection of KPC and NDM activity in Klebsiella pneumoniae by MALDI-TOF MS*.

Prêmio *2º melhor trabalho*. Concedido pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, em 2022, pelo trabalho apresentado no 8º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica (SIMC), intitulado *Evaluation of the ceftazidime/avibactam susceptibility by MALDI-TOF MBT-ASTRA directly from positive blood cultures*.

REFERÊNCIAS

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.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota técnica N° 1/2013 Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. p. 1–22, 2013.

AMANATI, A. et al. Bloodstream infections in adult patients with malignancy, epidemiology, microbiology, and risk factors associated with mortality and multi-drug resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 2021.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 2005.

ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 2017.

AVERY, L. M.; NICOLAU, D. P. Assessing the in vitro activity of ceftazidime/avibactam and aztreonam among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: defining the zone of hope. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2018.

AXELSSON, C.; REHNSTAM-HOLM, A. S.; NILSON, B. Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infectious Diseases**, p. 1–9, 2019.

BIAGI, M. et al. Exploring aztreonam in combination with ceftazidime-avibactam or meropenem-vaborbactam as potential treatments for metallo- and serine-B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. 1–8, 2019.

BILOZOR, A. et al. Application of Molecular Methods for Carbapenemase Detection. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–7, 2019.

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

BRUKER. MBT STAR-BL Standard Operating Procedure. v. 2, p. 1–14, 2015.

BURCKHARDT, I.; ZIMMERMANN, S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3321–3324, 2011.

BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 62, p. 1–20, 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. B-lactams and B-lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. a025247, p. 1–22, 2016.

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.

CARNEIRO, M. S. et al. Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated bacteria for identification using the MALDI-TOF MS system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 171, p. 1–4, 2020.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 2019.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. Disponível em: <www.cdc.gov>. Acesso em: 9 jul. 2022.

CEYSSENS, P. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in *Mycobacteria*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 624–634, 2017.

CHONG, Y. K. et al. Clinical mass spectrometry in the bioinformatics era: a hitchhiker's guide. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 316–334, 2018.

CIZMAN, M.; SROVIN, T. P. Antibiotic consumption and resistance of gram-negative pathogens (collateral damage). **GMS Infectious Diseases**, v. 6, p. 1–9, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. v. 35

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.

DEMIREV, P. A. et al. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 8, p. 1194–1201, 2013.

DIEKEMA, D. J. et al. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, 2019.

DONG, F. et al. A Five-year Surveillance of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Pediatric Hospital in China Reveals Increased Predominance of NDM-1. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 30, n. 8, p. 562–569, 2017.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6437–6440, 2012.

DU, J. et al. Molecular characterization and epidemiologic study of NDM-1-producing extensively drug-resistant *Escherichia coli*. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 3, p. 272–279, 1 abr. 2017.

EDWARDS-JONES, V. et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 295–300, 2000.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 8, p. 1–7, 2003.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Area of Technical Uncertainty (ATU) in antimicrobial susceptibility testing**. Disponível em: <<https://www.eucast.org/>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles**. v. 2, n. January, p. 1–6, 2022.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0**. Disponível em: <<https://www.eucast.org/>>. Acesso em: 30 jun. 2022.

FALCONE, M. et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam plus aztreonam in patients with bloodstream infections caused by MBL-producing *Enterobacterales*. **Clinical Infectious Diseases**, v. ciaa586, p. 1–29, 2020.

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, n. February, p. 120–127, 2019.

GAIBANI, P. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2609–2613, 2016.

GAO, H. et al. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings. **EBioMedicine**, v. 51, 2020.

GHEBREMEDHIN, B. et al. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 5, p. 1–6, 2016.

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. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, p. 552–6, 2011.

GLUPCZYNSKI, Y. et al. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 7, p. 1955–1960, 1 jul. 2017.

HART, P. J. et al. A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 1–8, 2015.

HRABÁK, J. et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3222–3227, 2011.

HRABÁK, J.; CHUDÁČKOVÁ, E.; WALKOVÁ, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 103–114, 2013.

HRABÁK, J.; CHUDÁČKOVÁ, E.; PAPAGIANNITSIS, C. C. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 839–853, 2014.

IDELEVICH, E. A.; BECKER, K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for antimicrobial susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 1–13, 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 20776-1:2019. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth microdilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapid.** 2. ed. International Organization for Standardization, 2019.

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.1–45, 2021.

JANG, K. S.; KIM, Y. H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 209–216, 2018.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 11, p. 1749–55, 2009.

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.

JUNG, J. S. et al. Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2820–2824, 2016.

JUSTESEN, U. S. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Bacteroides fragilis* using the MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA). **Anaerobe**, v. 54, p. 236–239, 2018.

KAHLMETER, G.; EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Redefining susceptibility testing categories S, I and R**. Disponível em: <www.eucast.org>. Acesso em: 15 ago. 2022.

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.

KOST, K. et al. Comparison of clinical methods for detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Practical Laboratory Medicine**, v. 8, p. 18–25, 2017.

LANGE, C. et al. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4155–4162, 1 dez. 2014.

LASSERRE, C. et al. Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2163–2171, 2015.

LAU, A. F. et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 2804–2812, 2014.

LEBER, A. L. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. Em: **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 4. ed. p. 5.16.1-5.16.23.

LEE, A. W. T. et al. Comprehensive evaluation of the MBT STAR-BL module for simultaneous bacterial identification and β -lactamase-mediated resistance detection in Gram-negative rods from cultured isolates and positive blood cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

LEOPOLD, J. et al. Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, 2018.

LI, B. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014.

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

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, p. 190–212, 2004.

MARINACH, C. et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. **Proteomics**, v. 9, n. 20, p. 4627–4631, 2009.

MARSHALL, S. et al. Can ceftazidime-avibactam and aztreonam overcome B-lactam resistance conferred by metallo-B-lactamases in *Enterobacteriaceae*? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–9, 2017.

MATUSCHEK, E.; BROWN, D. F. J.; KAHLMETER, G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, 2014.

MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: Modes of action and mechanisms of resistance. **International Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135–143, 2003.

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

MILTGEN, G. et al. Detection of carbapenemase activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). **Journal of Microbiological Methods**, v. 145, p. 66–68, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria N° 64, de 11 de dezembro de 2018**. Brasília, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única**. Brasília, 2018b.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906–909, 2012.

MOREIRA, N. K. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for direct KPC detection among *Enterobacterales*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2022.

NELSON, R. E. et al. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, p. S17–S26, 2021.

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

OVIANO, M. et al. Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 655–660, 2016.

OVIANO, M. et al. Towards the early detection of β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, p. 2259–2262, 2017.

PANKEY, G. A.; ASHCRAFT, D. S.; DORNELLES, A. Comparison of 3 Etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 220–226, 2013.

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.

PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Pathology**, v. 47, n. 3, p. 276–284, 2015.

PAUL, M. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, 2022.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 234–236, 2015.

PIERCE, V. M. et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2321–2333, 2017.

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

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, 2018.

POURNARAS, S. et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 2986–2990, 2013.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.

RIGATTO, M. H.; FALCI, D. R.; ZAVASCKI, A. P. Clinical Use of Polymyxin B. Em: **Polymyxin antibiotics: from laboratory bench to bedside, Advances in experimental medicine and biology**. v. 1145, p. 197–218.

ROCCO, V. G. et al. Rapid identification of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight using Vitek® mass spectrometry system. **Eurasian Journal of Medicine**, v. 51, n. 3, p. 209–213, 2019.

RÖSNER, S. et al. Evaluation of a novel immunochromatographic lateral flow assay for rapid detection of OXA-48, NDM, KPC and VIM carbapenemases in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 379–381, 2019.

SANTOS, W. M. DOS; SECOLI, S. R. Economic burden of inpatients infected with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 17, n. 4, p. 1–8, 2019.

SAUGET, M.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. Rapid antibiotic susceptibility testing on blood cultures using MALDI-TOF MS. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–9, 2018.

SEIFFERT, S. N. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 3, p. 260–262, 2014.

SEO, H. et al. Comparison of clinical outcomes of patients infected with KPC- and NDM-producing *Enterobacteriales*: a retrospective cohort study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 8, p. 1167.e1-1167.e8, 1 ago. 2021.

SFEIR, M. et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method: a phenotypic method for detecting metallo-B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1–9, 2019.

SPARBIER, K.; SCHUBERT, S.; KOSTRZEWA, M. MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? **Methods**, v. 104, p. 48–54, 2016.

TAMMA, P. D. et al. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). **Clinical infectious**, v. 75, n. 2, p. 187–212, 2022.

THEURETZBACHER, U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. **Current Opinion in Microbiology**, v. 39, p. 106–112, 2017.

TRAN, T. B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 592–597, 2016.

VAN BELKUM, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: What are the current issues? **Annals of Laboratory Medicine**, v. 37, n. 6, p. 475–483, 2017.

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. 1–13, 2015.

VAN DRIESSCHE, L. et al. Rapid detection of tetracycline resistance in bovine *Pasteurella multocida* isolates by MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

VERROKEN, A. et al. Clinical impact of MALDI-TOF MS identification and rapid susceptibility testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood cultures. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–15, 2016.

VINK, J.; EDGEWORTH, J.; BAILEY, S. L. Acquisition of MDR-GNB in hospital settings: a systematic review and meta-analysis focusing on ESBL-E. **Journal of Hospital Infection**, v. 106, p. 419–428, 2020.

VOCK, I. et al. Infections in Patients Colonized with Extended-spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacterales*: A Retrospective Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 8, p. 1440–1443, 2021.

WANG, C. et al. Cefiderocol for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of currently available evidence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1–13, 2022.

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

WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**, 2015.

- WINK, P. L. et al. Increased frequency of bla NDM in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 299–301, 2021.
- WOLK, D. M.; CLARK, A. E. Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, p. 471–486, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em: 9 jul. 2022.
- WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 344–359, 2020.
- XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 18, p. 1–12, 2017.
- 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.
- YIGIT, H. et al. Author's correction: Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 809, 2008.
- 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. et al. Direct detection of intact *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases produced by *Enterobacteriales* using MALDI-TOF MS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–8, 2020.
- YOUN, J. H. et al. Clinical performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for detection of certain *bla*_{KPC}-containing plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 35–42, 2016.
- YU, J. 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. 22, p. 1–7, 2018.
- ZHANG, W. et al. In vitro and in vivo bactericidal activity of ceftazidime-avibactam against Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 142, p. 1–9, 2018.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do comitê de ética em pesquisa.

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS RÁPIDAS PARA ANTIBIOGRAMA E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16506819.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.464.860

Apresentação do Projeto:

O projeto aqui apresentado é um projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas da UFRGS. Em vista da grande ameaça da resistência microbiana, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais rápidas para diagnóstico. O objetivo deste estudo é desenvolver e avaliar, usando a metodologia MALDI-TOF/MS, a realização de um antibiograma rápido, a detecção mecanismos de resistência, como o lipídio A alterado, e o uso de papel-filtro para transporte de bactérias inativadas para fins de identificação de espécie e/ou gênero bacteriano e detecção de resistência microbiana. Métodos: Serão utilizados isolados bacterianos estocados no LABRESIS (Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Para o antibiograma rápido utilizando o equipamento de MALDI-TOF/MS, será realizada a metodologia MBT-ASTRA, determinando a suscetibilidade da bactéria ao antimicrobiano ao avaliar o crescimento relativo. Para a detecção de mecanismos de resistência, serão analisadas as moléculas responsáveis pelo mecanismo no espectro gerado pelo MALDI-TOF/MS. Para a avaliação do papel-filtro, isolados serão inativados, impregnados em papel-filtro, extraídos e submetidos à análise MALDI-TOF/MS para a identificação de espécie/gênero e marcadores de resistência. Resultados esperados: Espera-se que seja possível desenvolver e aplicar na rotina laboratorial um antibiograma rápido, bem como detectar mecanismos de

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 91.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.484.860

resistência e aplicar o uso de papel-filtro para transporte de isolados bacterianos inativados.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos rápidos para a realização do antibiograma e para detecção de resistência a antimicrobianos em isolados clínicos de bactérias Gram negativas. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver e avaliar a realização de antibiograma utilizando a metodologia de MALDI-TOF/MS.
- Avaliar a metodologia de antibiograma via MALDI-TOF em amostras bacterianas diretamente de hemoculturas.
- Desenvolver e avaliar a metodologia de MALDI-TOF/MS para a detecção de marcadores de resistência.
- Avaliar a utilização de papel-filtro como transporte de bactéria inativada para sua identificação a nível de espécie e/ou gênero, para avaliação de sua suscetibilidade a antimicrobianos e para detecção de marcadores de resistência por MALDI-TOF/MS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Texto informado pelo pesquisador:

Riscos:

Este estudo não apresenta riscos conhecidos.

Benefícios:

Desenvolver metodologias que permitam determinar a suscetibilidade de uma bactéria a um antimicrobiano com mais rapidez em comparação com a metodologia atual.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está adequado e o estudo vai contribuir com o conhecimento atual sobre os métodos de antibiograma empregados. Os testes convencionais para definição da suscetibilidade ou resistência de uma bactéria a um antibiótico são relativamente lentos. Desta forma, a pesquisa se justifica por focar na validação de um método mais rápido como é a metodologia Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores propõem a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), visto que as amostras são isolados bacterianos depositados num banco de bactérias no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.484.860

Recomendações:

Lembramos que em cumprimento à Lei de Acesso ao Patrimônio Genético Nacional e Conhecimento Tradicional Associado - Nova Lei da Biodiversidade (Lei 13.123/2015), o pesquisador responsável deverá cadastrar o projeto junto ao Sistema Nacional de Gestão ao Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão de 20/05/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- Este projeto está aprovado para inclusão de 200 amostras de isolados bacterianos, de acordo com as informações do projeto apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1360998.pdf	26/08/2019 16:40:26		Aceito
Outros	DelegacaoFuncoes.pdf	26/08/2019 16:39:44	Camila Mörschbacher	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Página 03 de 04

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.484.860

Outros	DelegacaoFuncoes.pdf	28/06/2019 16:39:44	Wilhelm	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustificativaDeAusenciaDeTCLE.pdf	21/05/2019 19:41:01	Camila Mörschbacher Wilhelm	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	21/05/2019 15:51:20	Camila Mörschbacher Wilhelm	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoExpandidoDocCamila2019.pdf	20/05/2019 21:24:02	Camila Mörschbacher Wilhelm	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 22 de Julho de 2019

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br