

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* À CEFTAZIDIMA-
AVIBACTAM E CEFTOLOZANA-TAZOBACTAM DE BACILOS GRAM-
NEGATIVOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS**

THAISA NOCETI CARVALHO

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO HENRIQUE CONDEIXA DE FRANÇA

JOINVILLE – SC

2021

THAISA NOCETI CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* À CEFTAZIDIMA-
AVIBACTAM E CEFTOLOZANA-TAZOBACTAM DE BACILOS GRAM-
NEGATIVOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente na Universidade da Região de Joinville.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE - SC

2021

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

C331a Carvalho, Thaisa Noceti
Avaliação da sensibilidade in vitro à ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam de bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos / Thaisa Noceti Carvalho; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. – Joinville: UNIVILLE, 2021.

106 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Bacilos gram-negativos. 2. Ceftazidima. 3. Tazobactam. 4. Resistência microbiana a medicamentos. 5. Beta lactamases. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.

CDD 579.33

Termo de Aprovação

"Avaliação da Sensibilidade *In Vitro* à Cefotaxima-Avibaetam e Cefotaxima-Tazobactam de Bacilos Gram-Negativos Resistentes aos Antimicrobianos β -Lactâmicos"

por

Thaís Noceti Carvalho

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

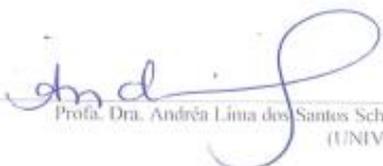

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)


Profa. Dra. Magda Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)


Prof. Dr. Marcelo Pilonetto
(PUC/PR)


Profa. Dra. André Lima dos Santos Schneider
(UNIVILLE)

Joinville, 03 de maio de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, pela confiança, paciência e dedicação durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela sua extrema parceria.

Às professoras Vanessa Cristine Kobs e Roseneide Campos Deglmann pelo intenso suporte científico, conselhos e orientações durante o trabalho. Muito obrigada pela amizade e disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Univille, por todo o esforço e ajuda mesmo diante de todas as dificuldades enfrentadas pela pandemia.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Dona Helena por todo o apoio e compreensão, e ao coordenador Caio Martins Tavares por ter me incentivado a ingressar no programa de Mestrado.

Ao Hospital Dona Helena, que cedeu os isolados clínicos para a realização deste trabalho e ao Dr. Luiz Henrique Melo cujo apoio foi imprescindível.

Ao meu noivo André Michels, por caminhar ao meu lado e por me apoiar e encorajar nos momentos em que mais precisei. Muito obrigada pela paciência e ajuda para que eu pudesse me dedicar a esta dissertação.

Por fim, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional.

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) causadas por microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos são consideradas um problema de saúde pública relevante, estando associadas a altos índices de morbimortalidade e aumento de custos dos serviços de assistência à saúde. A rápida disseminação de bacilos Gram-negativos (BGN) produtores de carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido (ESBL) vem limitando as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves entre pacientes hospitalizados. Poucos foram os agentes desenvolvidos nos últimos anos para o combate de IRAS causadas por BGN multirresistentes. Os antimicrobianos ceftazidima-avibactam (C/A) e ceftolozana-tazobactam (C/T) foram recentemente aprovados para o uso clínico em infecções graves do trato urinário e intra-abdominais. Embora considerados alternativas promissoras de tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales* e *Pseudomonas aeruginosa*, a resistência a estes antimicrobianos já tem sido relatada em diversos países. Neste contexto, objetivou-se avaliar a sensibilidade *in vitro* à C/A e C/T de BGN resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos e investigar determinantes moleculares de resistência, procurando contribuir com a definição do panorama epidemiológico local e consequente otimização do uso destes antimicrobianos. Foram avaliados 101 isolados clínicos de *Enterobacterales* (n=62) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=39) resistentes a pelo menos um antimicrobiano carbapenêmico (CR) ou produtores de ESBL em hospital geral privado em Joinville – SC, no período de janeiro de 2018 a agosto de 2020. A determinação de sensibilidade aos antimicrobianos deu-se por método automatizado e as concentrações inibitórias mínimas (CIM 50/90) para C/A e C/T por Etest[®]. Os genes codificadores de β -lactamases *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA48}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM-1} foram investigados via Reação em Cadeia da Polimerase. Os isolados avaliados foram coletados de amostras de urina (31,7%; n=32), swab retal (16,8%; n=17), secreção de ferida (15,8%; n=16), lavado broncoalveolar (11,9%; n=12), e outros sítios com menor frequência (23,8%; n=24). Em relação ao grupo *P. aeruginosa* – CR (n=39), a taxa de sensibilidade à C/T foi de 87,2%, com valores de CIM50/90 de 2/6 μ g/mL, enquanto a sensibilidade à C/A foi de 92,3%, com valores de CIM 50/90 de 3/8 μ g/mL. Os isolados de *K. pneumoniae* - KPC (n=15) mostraram elevada taxa de resistência à C/T (80% - CLSI ou 100% - BRCAS; CIM50/90 = 24/>256 μ g/mL), enquanto um isolado (6,6%) apresentou resistência à C/A (CIM50/90 = 1/2 μ g/mL). Em relação às *Enterobacterales* produtoras de ESBL (n=37),

os antimicrobianos C/A e C/T apresentaram as maiores taxas de inibição em comparação aos demais agentes testados para este grupo, sendo todos os isolados sensíveis à C/A (CIM50/90 = <1/1 µg/mL) e 97,3% (CLSI) ou 83,8% (BRCAST) sensíveis à C/T (CIM50/90 = <1/2 µg/mL). Por sua vez, todos os isolados referentes a *K. pneumoniae* – CR (n=3) apresentaram sensibilidade à C/A e dois isolados resistência à C/T, enquanto os isolados do grupo *K. pneumoniae* – MβL (n=4) apresentaram resistência à C/A e C/T. A maioria dos isolados era portador de um ou mais genes de resistência investigados (78,6%) e a concomitância de marcadores de resistência foi identificada em 44 (44,9%) isolados. Todos os isolados testados resultaram negativos para *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-48-like} e *bla*_{IMP}. Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC} foram os mais frequentes nos isolados resistentes à C/T, enquanto *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{NDM-1} nos resistentes à C/A. A maioria dos isolados resistentes à C/A e C/T (29/39; 74,3%) apresentavam concomitância de dois ou mais genes codificantes de β-lactamases. Conclui-se que C/A e C/T são opções terapêuticas contra microrganismos dispondo fenótipos de resistência aos β-lactâmicos, exceto nos quais a resistência foi mediada por metalo-β-lactamases.

Palavras-chave: Bacilos Gram-negativos, ceftazidima-avibactam, ceftolozana-tazobactam, atividade *in vitro*, marcadores genotípicos.

ABSTRACT

Healthcare Associated Infections (HAIs) caused by multidrug-resistant microorganisms constitutes a global public health threat and are associated with high morbidity and mortality rates and higher hospital costs. The rapid spread of Gram-negative bacilli (GNB) producing carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases (ESBL) has been limiting the therapeutic options for hospitalized patients with severe infections. Few agents have been developed in recent years to combat HAIs caused by multidrug-resistant GNB. Recently, ceftazidime-avibactam (C/A) and ceftolozane-tazobactam (C/T) were approved for clinical use in severe urinary and intra-abdominal infections. Although considered promising alternatives for treating infections caused by *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*, the resistance to these antibiotics has been reported in several countries. This study aimed to evaluate the in vitro susceptibility to C/A and C/T of GNB resistant to β -lactam antibiotics and to investigate resistance molecular markers, seeking to contribute to the definition of the local epidemiological panorama and consequent optimization of the use of these antimicrobials. A total of 101 isolates were evaluated, including *Enterobacterales* (n=62) and *Pseudomonas aeruginosa* (n=39) resistant to at least one carbapenem antibiotic (CR) or ESBL producers, from a private general hospital, in Joinville - SC, from January 2018 to August 2020. The antimicrobial susceptibility was determined by automated method and the minimum inhibitory concentrations (MIC 50/90) for C/A and C/T by Etest[®]. β -lactamases-encoding genes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA48}*, *bla_{VIM}* and *bla_{SPM-1}* were investigated by Polymerase Chain Reaction. The isolates were collected from urine samples (31.7%; n=32), rectal swab (16.8%; n=17), wound secretion (15.8%; n=16), bronchoalveolar lavage (11.9%; n=12), and other less frequent sites (23.8%; n=24). In relation to the *P. aeruginosa* - CR group (n=39), the sensitivity rate to C/T was 87.2%, with MIC 50/90 values of 2/6 μ g/mL, while sensitivity to C/A was 92.3%, with MIC 50/90 values of 3/8 μ g/mL. The *K. pneumoniae* - KPC isolates (n=15) showed a high rate of resistance to C/T (80% - CLSI or 100% - BRCAS; MIC 50/90 = 24/> 256 μ g/mL), while an isolate (6.6%) showed resistance to C/A (MIC 50/90 = 1/2 μ g/mL). Regarding the *Enterobacterales* producing ESBL (n=37), C/A and C/T showed the highest inhibition rates compared to the other agents tested for this group, with all isolates sensitive to C/A (MIC 50/90 = <1/1 μ g/mL) and 97.3% (CLSI) or 83.8% (BRCAS) sensitive to C/T (MIC 50/90 = <1/2 μ g / mL). All *K. pneumoniae* - CR (n=3) isolates showed sensitivity to C/A and two isolates were resistant to C/T, while

isolates from the *K. pneumoniae* - M β L group (n=4) showed resistance to C/A and C/T. Most isolates had one or more investigated resistance genes (78.6%) and concomitance of resistance markers was identified in 44 (44.9%) isolates. All evaluated isolates were negative for *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{OXA48}. The *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{KPC} genes were the most frequent in isolates resistant to C/T, while *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{NDM-1} in C/A-resistant isolates. Most isolates resistant to C/A and C/T (29/39; 74.3%) had concomitance of two or more genes coding for β -lactamases. It is concluded that C/A and C/T are therapeutic options against microorganisms with phenotypes of resistance to β -lactams, except when resistance was mediated by metallo- β -lactamases.

Keywords: Gram-negative bacilli, ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, in vitro activity, genotypic markers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de ESBL.	45
Tabela 2 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	45
Tabela 3 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de carbapenemases.	46
Tabela 4 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{SPM-1}</i>	47
Tabela 5 - Cepas padrão usadas como controle positivo nos testes genotípicos.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação estrutura-atividade de ceftazidima	30
Figura 2. Estrutura química do avibactam.....	30
Figura 3. Reação entre avibactam e β -lactamases	31
Figura 4. Relação estrutura-atividade do ceftolozana	34
Figura 5. Estrutura química do tazobactam	34
Figura 6. Representação da interação dos diversos ambientes na disseminação dos microrganismos multirresistentes.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	Ácido fenilborônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	Bacilos Gram-negativos
BRCAS	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> / Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana
C/A	Ceftazidima-avibactam
C/T	Ceftolozana-tazobactam
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> / Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CESP	Grupo composto por <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Morganella morganii</i> e <i>Hafnia alvei</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CR	Resistência aos carbapenêmicos
CRE	<i>Enterobacteriales</i> resistente aos carbapenêmicos
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum β-Lactamase</i> / β -lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> / Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	<i>The Food and Drug Administration</i>
HDH	Hospital Dona Helena
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
M β Ls	Metalo- β -lactamase
NDM	<i>New Delhi metallo - β-lactamase</i>

OIE	<i>World Organization for Animal Health / Organização Mundial da Saúde Animal</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase</i>
PLP	Proteína de ligação à penicilina
RNA	<i>Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico</i>
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
SPM-1	São Paulo Metallo- β -lactamase
UNIVILLE	Universidade da Região de Joinville
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	<i>Verona integron – encoded metallo – β – lactamase</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAUDE.....	20
3.2 A RESISTÊNCIA BACTERIANA	21
3.3 INFECÇÕES CAUSADAS POR BACILOS GRAM NEGATIVOS	23
3.3.1. <i>Enterobacteriales</i>	24
3.3.2. Bacilos Gram-negativos não fermentadores	24
3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	25
3.4.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC	25
3.4.2. Carbapenemases	26
3.5 CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	28
3.5.1 Aspectos químicos.....	29
3.5.2 Mecanismo de ação	30
3.5.3. A sensibilidade <i>in vitro</i> à C/A	31
3.6 CEFTOLOZANA-TAZOBACTAM.....	32
3.6.1 Aspectos químicos.....	33
3.6.2 Mecanismo de ação	35
3.6.3. A sensibilidade <i>in vitro</i> à C/T.....	35
3.7. INTERDISCIPLINARIEDADE.....	36
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. DELINEAMENTO E LOCAIS DO ESTUDO	38
4.2. PERÍODO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	38
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	39
4.3.1. Critérios de inclusão	39
4.3.2. Critérios de exclusão	39
4.4. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	39
4.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	40
4.5.1. Métodos fenotípicos	40
4.5.1.1. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	40
4.5.1.2. Detecção fenotípica de carbapenemases.....	41

4.5.1.3. Detecção fenotípica de ESBL.....	42
4.5.1.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam	42
4.5.2. Métodos genotípicos.....	43
4.5.2.1. Obtenção do DNA microbiano	43
4.5.2.2. Avaliação da viabilidade do DNA microbiano.....	43
4.5.2.3. Identificação de genes codificadores de ESBL	44
4.5.2.4. Identificação de genes codificadores de carbapenemases	45
4.5.2.5. Eletroforese.....	47
4.5.2.6. Controle de qualidade	47
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4.7. ASPECTOS ÉTICOS	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e a resistência antimicrobiana tornaram-se uma prioridade global de saúde pública (DEPTULA *et al.*, 2016; GANDRA *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a multirresistência bacteriana como uma ameaça à saúde, que requer ações entre os setores do governo e da sociedade como um todo (LOUREIRO *et al.*, 2016; VAN DUIN; DOI, 2016). Impactos clínicos e econômicos são frequentemente relatados em decorrência da resistência bacteriana, uma vez que períodos de internação prolongados e o uso de diferentes antimicrobianos elevam os custos com os cuidados em saúde, bem como, os índices de morbidade e mortalidade (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016; LOUREIRO *et al.*, 2016).

A ocorrência de microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos era descrita, anteriormente, como usualmente restrita ao ambiente hospitalar, sendo nos dias de hoje, amplamente disseminados entre os animais e o meio ambiente (RAFEI *et al.*, 2015). Os seres humanos, os animais e o meio ambiente juntos, portanto, formam um sistema interconectado que deve ser cuidadosamente considerado em termos de resistência bacteriana, administração de antimicrobianos e medidas de controle de infecções (DANDACHI *et al.*, 2019).

O uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos vem resultando em um rápido desenvolvimento de novos mecanismos de resistência por patógenos inseridos em ambientes agrícolas e clínicos (FENG, 2018). Atualmente, mais de 70% das bactérias consideradas patogênicas são resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, sendo capazes de desenvolver alterações genéticas para evitar a pressão seletiva letal (WATKINS; BONOMO, 2016).

Os bacilos Gram-negativos (BGN) pertencentes à ordem *Enterobacterales*, bem como as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* representam os principais agentes causadores de infecções graves associados a resistência antibiótica decorrente de mutações cromossômicas e da transferência de genes de resistência plasmidiais, sendo listados pela OMS como prioridade global para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (DIAS *et al.*, 2021; GARCÍA-BETANCUR *et al.*, 2020; WHO, 2017).

A disseminação de BGN produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e produtores de carbapenemases no decorrer dos últimos anos, vem limitando o uso de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos entre pacientes hospitalizados (ALSAEED; BLONDEAU, 2015; MELO *et al.*, 2018). A bactéria Gram-negativa não fermentadora *P. aeruginosa* é frequentemente isolada em pacientes imunocomprometidos acometidos por infecções graves, geralmente centralizados em unidades de terapia intensiva (UTI), e suas taxas de resistência aos carbapenêmicos e outros agentes vem aumentando consideravelmente (EVANS *et al.*, 2019; GARCÍA-BETANCUR *et al.*, 2020; SCHAUMBURG *et al.*, 2019).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA considera a ocorrência de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos (CRE) altamente ameaçadora devido à sua alta transmissibilidade e limitação de opções terapêuticas, e recomenda o desenvolvimento de novos fármacos de amplo espectro de atividade e testes diagnósticos mais efetivos (BRADLEY AND LEE, 2019).

Ceftazidima-avibactam (C/A) e ceftolozana-tazobactam (C/T) foram aprovados pelo *The Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como novas alternativas promissoras de tratamento contra isolados de *Enterobacteriales* e *P. aeruginosa* (ANVISA, 2018, LIAO *et al.*, 2019; ROSSI, *et al.*, 2017). C/A é indicado para o tratamento de infecções abdominais e do trato urinário complicadas, bem como pneumonia adquirida no ambiente hospitalar, incluindo pneumonia associada à ventilação mecânica (ANVISA, 2018, TORGENA, 2020). C/T é indicado para o tratamento de infecções intra-abdominais complicadas em combinação com metronidazol, bem como pielonefrite em pacientes adultos, causadas por BGN como *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *P. aeruginosa* (ANVISA, 2018, ZERBAXA, 2017).

Embora C/A e C/T tenham sido recentemente aprovados para o uso clínico e apesar de apresentarem eficácia comprovada contra bactérias Gram-negativas, a resistência a estes antimicrobianos já tem sido relatada em diversos países do mundo (WANG *et al.*, 2020). Estudos multicêntricos recomendam que o uso otimizado de C/A e C/T deve ser orientado pelos resultados de sensibilidade *in vitro* a fim de evitar o desenvolvimento ou aumento das taxas de resistência (CUI *et al.*, 2020). Mediante o exposto, observa-se a necessidade de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de C/A e C/T, considerados alternativas terapêuticas para infecções graves causadas por BGN. Adicionalmente, com este estudo pretende-se contribuir com o panorama epidemiológico local e com a

consequente otimização de uso destes antimicrobianos, por meio da investigação de marcadores genotípicos de resistência.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade *in vitro* à ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam de bacilos Gram-negativos resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam nos isolados clínicos investigados.

- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos correspondentes aos isolados clínicos investigados.

- Investigar a presença dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* em isolados clínicos com perfil fenotípico positivo para ESBL.

- Investigar a presença dos genes codificadores de carbapenemases - *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA48-like}*, *bla_{VIM}* e *bla_{SPM-1}* - em isolados clínicos com perfil fenotípico resistente aos antimicrobianos carbapenêmicos.

- Investigar a presença e concomitância de genes codificantes de β -lactamases em isolados clínicos sensíveis ou resistentes à ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

O Ministério da Saúde define Infecção Hospitalar (IH) como qualquer infecção manifestada após 48 horas da admissão do paciente na unidade hospitalar ou após a alta quando associada a cirurgias e procedimentos invasivos (BRASIL, 1988). Posteriormente, este termo foi substituído por Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), para compreender também as infecções associadas aos cuidados de saúde em nível ambulatorial e outros serviços de saúde (ECDC, 2017).

As IRAS estão diretamente relacionadas à hospitalização ou submissão de pacientes a procedimentos clínicos diagnósticos e terapêuticos (SOUZA *et al.*, 2015). São responsáveis por períodos prolongados de internações hospitalares, aumento da morbimortalidade de pacientes e consequentemente elevação de custos nos serviços de assistência à saúde, o que representa um risco significativo aos seus usuários (ANVISA, 2017a; CASSINI *et al.*, 2016; SOBOLEWSKA *et al.*, 2018).

Os elevados índices de mortalidade decorrentes de IRAS estão diretamente relacionados com a gravidade da doença de base, o sítio de infecção acometido, bem como à sensibilidade do agente infeccioso aos antimicrobianos considerados como opções terapêuticas disponíveis (ALEXOPOULOS *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2015).

As UTI's são ambientes favoráveis a aquisição de IRAS, devido ao elevado perfil de gravidade dos pacientes internados e a fatores de risco importantes como o uso de cateteres venosos centrais, sondas vesicais de demora e ventilação mecânica, bem como uso de imunossuppressores e antimicrobianos de amplo espectro de ação (OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Estima-se uma prevalência mundial de 51,4% de IRAS em pacientes centralizados em UTI's, ambiente favorável a seleção de microrganismos multirresistentes (DEPTULA *et al.*, 2016).

Estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos da América (EUA) demonstrou a ocorrência de aproximadamente 1,7 milhões de casos anuais de IRAS com registros de até 100 mil óbitos por ano no país (SOUZA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Na Europa, estima-se que 4,1 milhões de indivíduos adquirem IRAS por ano nos serviços de saúde com 110 mil mortes/ano associadas direta ou indiretamente a estas infecções (ECDC, 2016).

No Brasil, as IRAS são consideradas um grave problema de saúde pública, sendo a quarta maior causa de mortalidade. Estas infecções representam taxas que variam entre 25 e 30% acometendo pacientes admitidos em UTI's do âmbito hospitalar (COSTA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Considerando-se a ocorrência de 800 mil casos de infecções hospitalares por ano e uma estimativa de 5 dias adicionais de internação por paciente, contabiliza-se 4 milhões de dias de internação atribuídos à infecção adquirida nos hospitais brasileiros (ZEHURI; SLOB, 2018).

O monitoramento nacional de indicadores de IRAS foi sistematizado em 2010, incluindo pacientes sob uso de cateter venoso central, para todos os estabelecimentos de saúde, públicos e privados, que possuíam UTI's neonatal, pediátrica e adulto e que continham no mínimo 10 leitos. Em janeiro de 2014, a notificação passou a ser obrigatória independentemente do número de leitos de UTI, bem como os marcadores de resistência microbiana associados a estas infecções e a notificação das infecções de sítio cirúrgico (ANVISA, 2014). A partir de 2016, o Programa Nacional de Prevenção de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde incluiu os indicadores de Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) e de Infecção do Trato Urinário associadas à sonda vesical de demora (ANVISA, 2017).

Segundo o *European Centre for Disease Prevention and Control*, entre 20 e 30% das IRAS são consideradas preveníveis por meio de programas intensivos de controle e higiene (ECDC, 2016). Estas medidas adotadas pelos estabelecimentos de assistência à saúde, são capazes de reduzir em até 70% determinadas infecções, como as infecções da corrente sanguínea (CDC, 2016).

3.2 A RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana é um processo natural observado desde a descoberta dos primeiros antimicrobianos, definida pela capacidade de microrganismos se desenvolverem apesar de expostos a substâncias destinadas a inibir seu crescimento (DU *et al.*, 2018; O'NEILL, 2016). Magiorakos e colaboradores (2012) definem multirresistência bacteriana como a não sensibilidade de pelo menos um agente a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo que para assegurar a correta aplicação desta definição é necessário que os isolados sejam testados a todas as categorias antimicrobianas existentes e que não haja supressão de resultados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

O uso indiscriminado de antimicrobianos é o principal fator associado à resistência bacteriana em todo o mundo, em um cenário onde aproximadamente 50% das prescrições são consideradas inadequadas. O consumo de antimicrobianos apresentou um aumento de 36% em 71 países entre os anos de 2000 e 2010, sendo o Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, os responsáveis por três quartos da elevação desse índice (ANVISA, 2017; VAN BOECKEL *et al.*, 2014).

Os impactos negativos da resistência aos antimicrobianos são substanciais, uma vez que as infecções adquiridas aumentam os riscos de complicações clínicas e limitam as opções terapêuticas, resultando em um desfecho desfavorável aos pacientes (WATKINS; BONOMO, 2016). O CDC destaca que aproximadamente 2 milhões de infecções ocasionadas por bactérias multirresistentes causam até 23 mil óbitos por ano nos EUA (GANDRA *et al.*, 2017; WATKINS; BONOMO, 2016). Estas infecções elevam consideravelmente os índices de mortalidade e falhas de tratamento quando comparadas com infecções causadas por cepas multissensíveis, bem como, aumentam a permanência hospitalar e conseqüentemente os custos totais gastos com os cuidados em saúde (ANVISA, 2017; FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016; WHO, 2017). A presença de elementos genéticos móveis vem atuando como facilitadores para o desenvolvimento da multirresistência nos países latino-americanos (PFALLER *et al.*, 2017; YEZLI; SHIBL; MEMISH, 2015).

Estima-se que até o ano de 2050, a falta de ações efetivas que controlem o avanço da resistência aos antimicrobianos possa resultar em 10 milhões de óbitos por ano, o que superaria a mortalidade relacionada ao câncer. Além disso, este cenário representaria um impacto econômico de 100 trilhões de dólares entre 2016 e 2050 (ANVISA, 2017b; O'NEILL, 2016).

Diante deste cenário mundial, tendo em vista o impacto econômico e a ameaça crescente à saúde humana decorrente das infecções causadas por microrganismos multirresistentes, a OMS lançou no ano de 2015, o Plano de Ação Global em Resistência a Antimicrobianos, contemplando estratégias para melhorar a conscientização e a compreensão a respeito da resistência e reduzir a incidência de infecções (ANVISA, 2017b). Em 2018, o Ministério da Saúde, juntamente com a ANVISA e outros órgãos nacionais, publicou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (2018-2022), o PAN-BR, contemplando objetivos e intervenções estratégicas e englobando profissionais com atuação nas áreas de saúde humana, animal e ambiental (ANVISA, 2018). Adicionalmente, o BR-GLASS

– Programa Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana no Brasil foi implementado como um projeto piloto no estado do Paraná, em 2018, visando desenvolver um sistema nacional de informação integrada para a vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos, com objetivo de futuramente conseguir dimensionar e entender o impacto da resistência nas cinco regiões geográficas do país (ANVISA, 2018; PILLONETTO *et al.*, 2021).

Além disso, uma comissão envolvendo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/ *Food and Agriculture Organization* (FAO), a Organização Mundial da Saúde Animal/ *World Organization for Animal Health* (OIE) e a OMS foi realizada priorizando a multirresistência quanto ao impacto global do uso de antimicrobianos na saúde humana, animal e ao ecossistema (WHO, 2017). A abordagem “*One Health*” ou “Saúde Única” consiste em um conjunto de ações e estratégias nacionais e internacionais que visa à comunicação de diversos setores para projetar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa com o intuito de melhorar a saúde pública mundial (DAVIS *et al.*, 2017; WHO, 2017).

3.3 INFECÇÕES CAUSADAS POR BACILOS GRAM NEGATIVOS

Os BGN têm sido identificados como causadores de colonização e infecção de pacientes dentro e fora do ambiente hospitalar e de profissionais das diversas áreas da saúde (GOMEZ *et al.*, 2014). A rápida disseminação destes microrganismos no âmbito hospitalar tem sido caracterizada como uma importante ameaça à saúde pública mundial (CDC, 2013; PFALLER *et al.*, 2017; SEKAR *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2018), uma vez que a resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos vem se desenvolvendo, limitando as opções terapêuticas para essas infecções (RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2017).

Os BGN não fermentadores como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, bem como *Enterobacterales* são os mais propensos à aquisição de resistência a diversas classes de antimicrobianos, sendo o conhecimento da variabilidade de mecanismos de ação uma ferramenta útil para decisões na seleção da terapia antimicrobiana mais adequada (GOMEZ *et al.*, 2014; KARAM *et al.*, 2016). O CDC destaca que antimicrobianos de amplo espectro de ação são frequentemente utilizados como últimas opções disponíveis de tratamento de infecções graves envolvendo BGN resistentes a múltiplos antimicrobianos (CDC, 2013).

3.3.1. *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* representa o maior e mais heterogêneo grupo de BGN considerados clinicamente importantes, destacando-se os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*, (SAH *et al.*, 2017). São onipresentes, ou seja, são usualmente encontrados na microbiota intestinal de seres humanos e animais, mas também podem estar presentes no meio ambiente em diferentes formas (DANDACHI *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, estas bactérias receberam maior atenção devido ao seu envolvimento em infecções hospitalares graves como agentes causadores de IRAS e a variabilidade de padrões de resistência aos antimicrobianos (SAH *et al.*, 2017). São conhecidas por apresentarem complexos mecanismos de resistência, mediados principalmente pela capacidade de produção de enzimas β -lactamases, que conferem resistência à classe mais comum de antimicrobianos prescritos atualmente em ambientes clínicos: os β -lactâmicos (DANDACHI *et al.*, 2019).

3.3.2. Bacilos Gram-negativos não fermentadores

As infecções causadas por *P. aeruginosa* são consideradas como de interesse epidemiológico especial por estarem associadas a alta morbimortalidade e períodos prolongados de hospitalização (ALSAEED; BLONDEAU, 2015). É um BGN não fermentador comum no ambiente hospitalar, caracterizado por adquirir resistência muito facilmente e desenvolver mutações cromossômicas ou adquirir material genético exógeno (RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2017). Emergiu em todo o mundo como um importante patógeno nosocomial, particularmente em pacientes imunocomprometidos e seus índices de resistência estão associados a um início tardio da antibioticoterapia apropriada (GHERARDI *et al.*, 2019). Considera-se que a falta de medidas de controle efetivas que reduzam a disseminação deste microrganismo e o uso excessivo de antimicrobianos de amplo espectro, atuam como fatores de risco para a aquisição do patógeno (ALSAEED; BLONDEAU, 2015). A resistência de *P. aeruginosa* aos β -lactâmicos é mediada por múltiplos mecanismos, incluindo a aquisição de metalo- β -lactamases, aumento da produção de AmpC cromossômica, aumento do fluxo de droga para o meio extracelular ou bombas de efluxo e alterações na permeabilidade da membrana (GHERARDI *et al.*, 2019).

A emergência e disseminação de *Acinetobacter baumannii* é discutida em todo o mundo como um tema prioritário, por se tratar de um patógeno associado ao acometimento de pacientes em UTI e por ocasionar, principalmente, infecções graves da corrente sanguínea e PAV (BASSETTI *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2019). É caracterizado por apresentar facilidade em desenvolver rápida resistência, sendo que aproximadamente 45% dos isolados globais são considerados multirresistentes. Na América Latina, Estados Unidos e Oriente Médio, taxas de multirresistência acima de 60% já foram descritas e as taxas de resistência de *A. baumannii* à classe dos carbapenêmicos vem aumentando consideravelmente (OLIVEIRA *et al.*, 2020). No Brasil, o primeiro caso de *A. baumannii* produtora de NDM-1, enzima capaz de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos, foi descrito em 2014 no estado do Paraná (PILLONETTO, 2014). A presença da sequência IS*Aba*1 associada ao gene OXA₂₃-like foi fortemente associada à resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* no norte de Santa Catarina (KOBBS *et al.*, 2016).

3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os principais mecanismos de ação encontrados envolvendo a resistência aos antimicrobianos são as bombas de efluxo, que exportam os antimicrobianos para o meio extracelular, mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis; modificação ou destruição enzimática do antimicrobiano, como ocasionadas pelas enzimas β -lactamases; redução de permeabilidade celular (perda ou alterações na estrutura de porinas) e alterações de moléculas alvo (DU *et al.*, 2018; KARAM *et al.*, 2016; LOUREIRO *et al.*, 2016). O mecanismo de resistência de maior impacto entre as bactérias Gram-negativas é a produção de β -lactamases, que compreende o grupo das β -lactamases de espectro estendido (ESBL), β -lactamases induzíveis do tipo AmpC e as carbapenemases (GOMEZ *et al.*, 2014).

3.4.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC

As ESBL são enzimas de amplo espectro mais frequentemente encontradas em *E. coli*, *Klebsiella* spp e *Proteus* spp (KARAM *et al.*, 2016). As β -lactamases do tipo AmpC pertencem à classificação C de Ambler, comumente encontradas em isolados de *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia* spp., mediadas

cromossomicamente e capazes de conferir resistência às cefalosporinas de terceira geração (GHANAVATI *et al.*, 2017; KARAM *et al.*, 2016).

Os determinantes genéticos que codificam essas enzimas estão localizados em plasmídeos que comumente contêm genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, como quinolonas e aminoglicosídeos. Por esse motivo, *Enterobacterales* produtoras de ESBL geralmente apresentam fenótipos de multirresistência, facilitando sua seleção e disseminação (RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2017). Sendo assim, a transferência destas enzimas pode ocorrer entre estirpes da mesma espécie ou espécies diferentes, mediadas por plasmídeos, que hidrolizam o anel β -lactâmico dos antimicrobianos levando à inativação dos mesmos (MALEKI *et al.*, 2015; SAH *et al.*, 2017).

A descoberta e disseminação de BGN produtores de ESBL, nos últimos anos, resultaram em uma limitação no uso de cefalosporinas de amplo espectro (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016). Estas enzimas conferem resistência aos β -lactâmicos, principalmente aos agentes pertencentes a classe de cefalosporinas de terceira geração, como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona (DAEHRE *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). Após a introdução destas cefalosporinas, nos anos 80, relatou-se a presença de genes TEM e SVH que sofreram mutações e foram capazes de hidrolisar cefalosporinas entre o gênero *Klebsiella* spp e espécie *E. coli* (LOUREIRO *et al.*, 2016).

No Brasil, o gene do tipo CTX-M, codificante de ESBL, tem sido relatado como mais frequentemente encontrado e associado à IRAS (KNUDSEN *et al.*, 2018; MELO *et al.*, 2018). Inicialmente, *bla*_{CTX-M} era predominante em isolados de *E. coli*, mas já vem sendo detectado em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Proteus*, entre outras espécies e gêneros (CASTANHEIRA *et al.*, 2019).

Estudos relatam que bacteremias causadas por *Enterobacterales* produtoras de ESBL estão associadas a maiores taxas de falhas de tratamento e mortalidade em pacientes quando comparadas a bacteremias causadas por cepas não produtoras desta enzima (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016; SAH *et al.*, 2017).

3.4.2. Carbapenemases

As carbapenemases são enzimas capazes de inativar os carbapenêmicos e a maioria dos β -lactâmicos (KARAM *et al.*, 2016). Os carbapenêmicos são recomendados para o tratamento de *Enterobacterales* produtoras de ESBL e AmpC, que representam proporção

significativa entre bactérias isoladas em diversos países do mundo (ALATOOM *et al.*, 2017; CASTANHEIRA *et al.*, 2019; JONGE *et al.*, 2016). Possuem elevadas taxas de uso como terapia empírica de infecções graves em áreas geográficas onde se sabe que as taxas de ESBL são elevadas (CASTANHEIRA *et al.*, 2019).

As carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) foram relatadas pela primeira vez no ano de 2001, nos Estados Unidos, e a partir deste período passaram a causar surtos importantes na cidade de Nova Iorque, tornando-se mais tardiamente predominante tanto nos EUA quanto na China (CHIU *et al.*, 2018). Em 2009, foi reportado o primeiro caso de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 no Brasil, que acometeu um paciente internado em UTI de um hospital de Pernambuco (MONTEIRO *et al.*, 2009).

As Metallo- β -lactamases (M β LS), dentre as quais destacam-se Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM), imipenemase (IMP) e New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), têm sido identificadas em patógenos clinicamente importantes como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Enterobacteriales*. Por localizarem-se em estruturas genéticas que conferem mobilidade aos genes, estes determinantes de resistência são conhecidos como as M β L móveis ou M β L adquiridas (ANVISA, 2020). As M β L adquiridas, mais comuns em nosso meio, são as SPM ("São Paulo Metallo- β -lactamase"). A primeira cepa de SPM-1 foi identificada em uma amostra de *P. aeruginosa* de um paciente hospitalizado no Hospital São Paulo/UNIFESP (ANVISA, 2020).

O aumento da incidência de cepas bacterianas produtoras de carbapenemases, codificadas pelos genes de alta prevalência como NDM, VIM e IMP (classe B de Ambler); KPC (classe A de Ambler) e OXA-48 (classe D de Ambler) e isoladas de amostras clínicas, constitui o maior desafio encontrado nos últimos anos, resultando na necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o combate de estirpes resistentes (ALATOOM *et al.*, 2017; SEKAR *et al.*, 2019; WOODFORD *et al.*, 2014). Na Europa, as principais carbapenemases são do tipo OXA-48, KPC e VIM e, em menor grau, do tipo NDM. Na Espanha, as primeiras carbapenemases detectadas foram codificadas pelos genes móveis *bla*_{VIM-1} e *bla*_{IMP-22}, porém nos últimos anos a prevalência das cepas produtoras de OXA-48 aumentou dramaticamente (RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2017).

A produção de carbapenemases em bactérias Gram-negativas torna-se preocupante frente a crescente prevalência de *K. pneumoniae* produtora de KPC e OXA-48 (LEE *et al.*, 2016). *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemase geralmente apresentam

fenótipos de multirresistência e pan-resistência. Esse fato tem um grande impacto no gerenciamento do paciente, pois limita drasticamente as opções terapêuticas. Como consequência, infecções causadas por essas bactérias estão associadas a alta mortalidade (RUIZ-GARBAJOSA *et al.*, 2017).

A crescente incidência de *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases se dá tanto pela disseminação clonal quanto pela transmissão mediada por plasmídeos (VAN DUIN; DOI, 2016). Os carbapenêmicos são considerados de primeira escolha para o tratamento de pneumonias e outras infecções causadas por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, sendo estas espécies propensas a desenvolverem mecanismos de resistência após a exposição a estes antimicrobianos (LABARCA *et al.*, 2016). Diante disso, as alternativas de tratamento ficam estritamente limitadas ao uso de polimixinas B e E (colistina) e tigeciclina, apesar de serem altamente tóxicas e aumentarem os custos de tratamento, são utilizadas como último recurso para infecções potencialmente graves em pacientes altamente vulneráveis (FENG, 2018; HAGEMANN *et al.*, 2018; TRIMBLE *et al.*, 2016).

3.5 CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Poucos foram os agentes desenvolvidos nos últimos anos para o combate de infecções causadas por BGN multirresistentes (ALATOOM *et al.*, 2017; TUON *et al.*, 2017). Tendo em vista a falta de opções de tratamento disponíveis e o crescente índice de multirresistência antibiótica, o FDA, em fevereiro de 2015, aprovou a combinação de ceftazidima com avibactam para o uso clínico em infecções graves do trato urinário e intra-abdominais (LEE *et al.*, 2016; LIVERMORE *et al.*, 2015; SCHAUMBURG *et al.*, 2019; SHIELDS *et al.*, 2016).

C/A surge como alternativa terapêutica de infecções causadas por *Enterobacterales* e *P. aeruginosa*, e possui atividade *in vitro* contra ESBL, classes A, C e algumas enzimas classe D de Ambler, não incluindo metalo β -lactamases (BUEHRLE *et al.*, 2016; BRADLEY AND LEE, 2019; JONGE *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2017; SHIELDS *et al.*, 2016). A capacidade de C/A de inibir as β -lactamases do tipo KPC é de interesse global, já que há uma proliferação substancial de *Enterobacterales* produtoras desta enzima em países como Itália, Grécia, Brasil, EUA e Israel (LIVERMORE *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de C/A pode ser considerado um avanço significativo, uma vez que possui vantagens quando comparada a outros agentes que possuem atividade

antimicrobiana semelhante, como gentamicina, colistina e tigeciclina, porém são limitados por sua alta toxicidade e/ou eficácia reduzida (LIAO *et al.*, 2019; SHIELDS *et al.*, 2016). Estudos demonstram que houve maior sucesso clínico quando utilizado C/A em comparação a outros agentes antimicrobianos, incluindo aqueles com mais de um princípio ativo, e uma menor mortalidade nos pacientes tratados com C/A daqueles tratados com colistina (GUTIÉRREZ AND FANDIÑO, 2021; HAKEAM *et al.*, 2021).

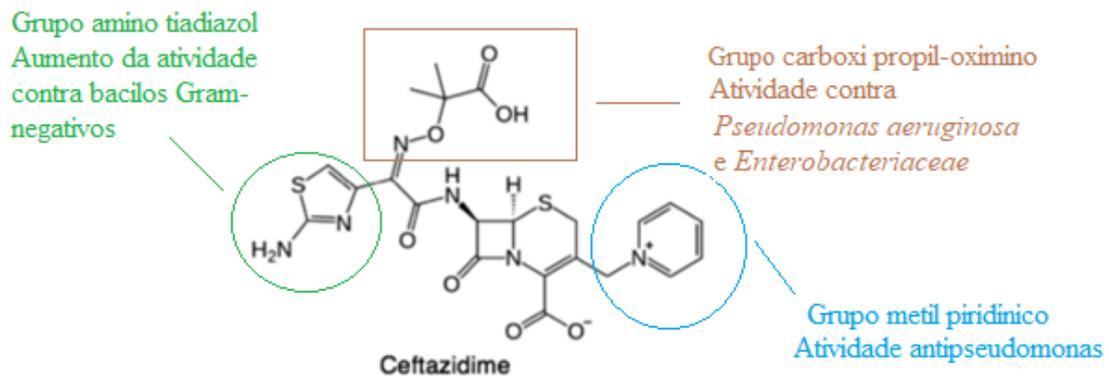
3.5.1 Aspectos químicos

A ceftazidima é um antibacteriano semissintético de amplo espectro da classe das cefalosporinas e derivado da cefaloridina, possui fórmula molecular $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$ e sua massa molecular é equivalente a 546,58 g/mol (PUBCHEM, 2020a).

A molécula de ceftazidima possui um anel β -lactâmico como ocorre em outras cefalosporinas (núcleo básico das cefalosporinas). O grupo metil piridínico na posição 3 permite o aumento da atividade antipseudomonas e o grupo amino tiadiazol é responsável pelo aumento da atividade contra BGN (TUON *et al.*, 2017). Já o grupo carboxi propiloximino permite aumentar a atividade contra *P. aeruginosa* e *Enterobacterales*, sendo que esta última apresenta atividade reduzida quando comparada a outras cefalosporinas que contém o grupo metoximino, como a ceftriaxona (LAGACÉ-WIENS *et al.*, 2014; TUON *et al.*, 2017). A relação estrutura química - atividade de ceftazidima está representada na figura 1.

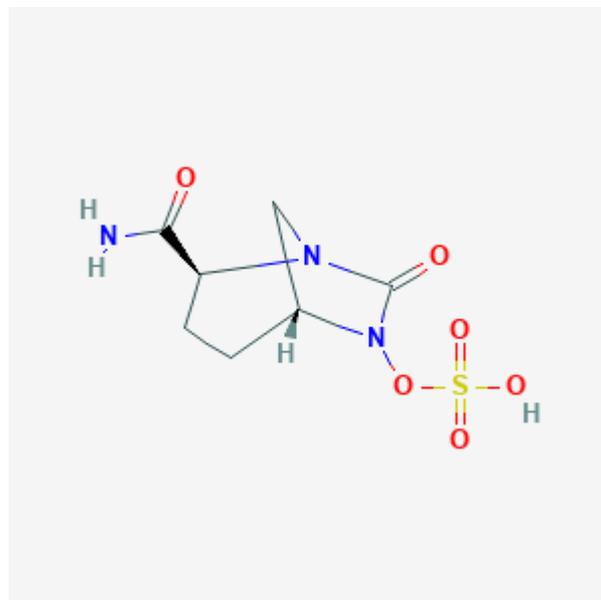
O avibactam é um inibidor sintético de β -lactamases não β -lactâmico, possui fórmula molecular $C_7H_{11}N_3O_6S$ e peso molecular de 265,25 g/mol (PUBCHEM, 2020b). Em relação a outros inibidores de β -lactamases, possui um núcleo bicíclico em ponte ao invés de anel β -lactâmico (figura 2). Este agente é capaz de realizar interações com resíduos catalíticos importantes ao redor do sítio ativo das β -lactamases, proporcionando rigidez e estabilidade no momento da interação com o alvo.

Figura 1. Relação estrutura-atividade de ceftazidima



Fonte: o autor.

Figura 2. Estrutura química do avibactam



Fonte: Pubchem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Avibactam> (2020)

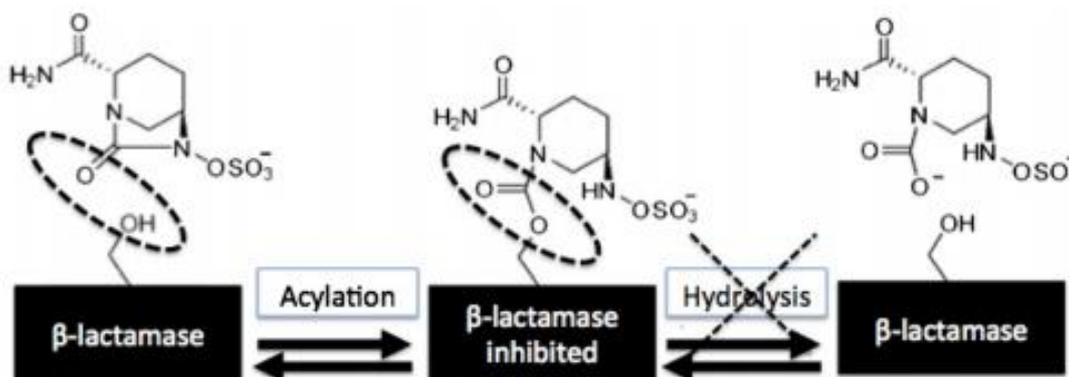
3.5.2 Mecanismo de ação

C/A possui o mesmo espectro de ação da ceftazidima, entretanto, com a adição de avibactam tende a expandir sua atividade contra cepas resistentes que dispõem de enzimas β -lactamases (ALATOOM *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos podem apresentar afinidades diferentes por PLP's (proteína de ligação à penicilina), o que pode explicar o variado espectro de ação e potência entre os β -lactâmicos (MACHEBOEUF *et al.*, 2006). A ceftazidima possui alta afinidade de ligação às PLP's, que são responsáveis pela polimerização do peptidoglicano na parede celular bacteriana, promovendo a inibição da síntese da parede e consequentemente lise da célula (TUON *et al.*, 2017).

O Avibactam é um inibidor da β -lactamase que se liga covalentemente com uma hidroxila ao sítio catalítico das β -lactamases de classes A, C e D (OXA-48) de Ambler, capaz de realizar a inibição das serino β -lactamases por meio de um mecanismo reversível que o diferencia dos inibidores atualmente disponíveis (KRISHNAN *et al.*, 2015). Essa interação do avibactam com o alvo reduz a oferta de enzimas ativas para hidrolisar a ceftazidima (ZASOWSKI *et al.*, 2016). A figura 3 demonstra a reação entre avibactam e β -lactamases em que acilação reversível não resulta em hidrólise do inibidor, como ocorre com os demais inibidores em que a reação é irreversível. Essa reversibilidade é uma característica única, que permite que o avibactam se recicle para inativar outras β -lactamases (DUIN; BONOMO, 2016).

Figura 3. Reação entre avibactam e β -lactamases



Fonte: TUON *et al.*, 2017.

3.5.3. A sensibilidade *in vitro* à C/A

Nos últimos anos, estudos vêm sendo conduzidos com intuito de avaliar a sensibilidade *in vitro* à C/A em diversos países do mundo. A ocorrência de resistência bacteriana a este antimicrobiano tem sido relatada em pacientes hospitalizados com ou sem

tratamento prévio (WANG *et al.*, 2020). Diversos são os mecanismos que podem resultar no desenvolvimento da resistência à C/A, sendo o mais comum deles a resistência enzimática, responsável pela inativação do antimicrobiano, a modificação química do alvo do antimicrobiano, mudanças na permeabilidade celular ou aumento da expressão de bombas de efluxo (SCHILLACI, *et al.*, 2017). Além disso, a combinação de mais de um mecanismo de resistência pode elevar os valores de CIM de C/A de forma significativa (WANG *et al.*, 2020; SCHILLACI, *et al.*, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de mutações em isolados produtores de KPC-2 e KPC-3 associadas a resistência à C/A (GALANI *et al.*, 2020; GOTTIG *et al.*, 2019; SHAPIRO *et al.*, 2021). Shields e colaboradores (2017) descreveram o surgimento de mutações em KPC-3 mediadas por plasmídeos em pacientes após o tratamento com C/A por 10 a 19 dias. Adicionalmente, foi descrita uma mutação em KPC-50, uma variante KPC-3, mostrando uma inserção de três aminoácidos com sensibilidade reduzida ao avibactam (POIREL *et al.*, 2020). Na América do Sul, um estudo relatou três isolados de *K. pneumoniae* resistentes ao C/A produtores de KPC-8 (GARCÍA *et al.*; 2020).

De acordo com relatórios globais, as taxas de resistência à C/A para *P. aeruginosa* são relativamente maiores do que para *Enterobacterales* nos EUA, Canadá, Brasil, China e região da Europa (ROSSI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020). Estudos demonstram que a ocorrência de cepas resistentes aos carbapenêmicos eleva substancialmente as taxas de resistência à C/A, como para *K. pneumoniae* onde as taxas relatadas são inferiores a 5%, em relação a *K. pneumoniae* – KPC a resistência à C/A pode atingir taxas de até 21% (FLAMM *et al.*, 2016; WILSON, *et al.*, 2019). As taxas de resistência à C/A para *P. aeruginosa* podem variar de 2,9% a 18%, enquanto que os isolados resistentes aos carbapenêmicos pode atingir taxas de até 50% (SCHAUMBURG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

3.6 CEFTOLOZANA-TAZOBACTAM

O antimicrobiano C/T é a combinação de uma nova cefalosporina de quinta geração com um conhecido inibidor de β -lactamase e que juntos apresentam atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* multirresistente (CARVALHÃES *et al.*, 2019; GHERARDI *et al.*, 2019; GÓMEZ-JUNYENT *et al.*, 2019; KARLOWSKY *et al.*, 2019). Foi aprovado pela FDA em 2014, pelo *European Medicines Agency* (EMA) em 2015 e pela ANVISA em 2018 para o tratamento de

infecções intra-abdominais graves (em combinação com metronidazol) e infecções complicadas do trato urinário, incluindo pielonefrite, em pacientes adultos. (ANVISA, 2018; CARVALHÃES *et al.*, 2019; GHERARDI *et al.*, 2019; ROBIN *et al.*, 2018).

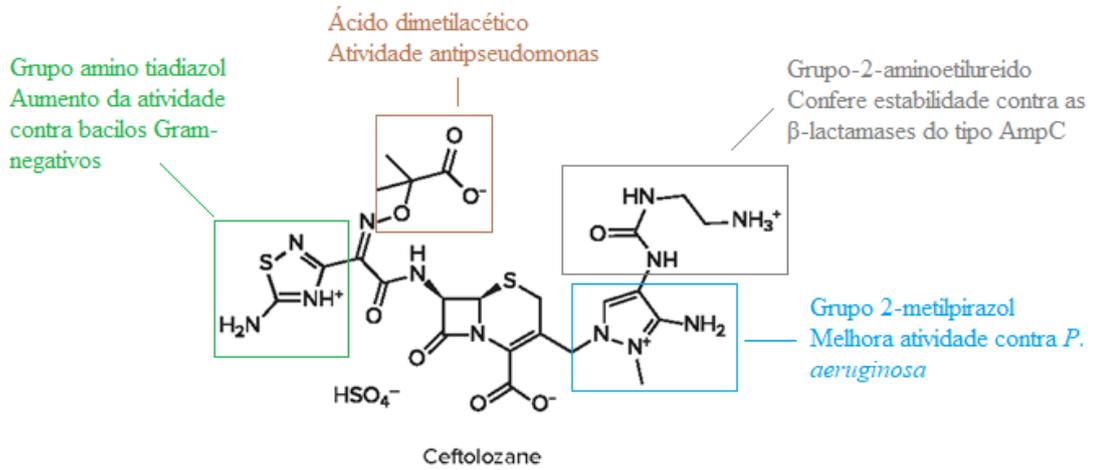
Recentemente aprovado para o tratamento de pneumonia bacteriana adquirida no hospital e associada a ventilação mecânica (GARCIA-FERNANDES, 2019; KUO *et al.*, 2020), C/T também demonstrou atividade contra cepas resistentes aos carbapenêmicos que não produzem carbapenemases, sendo que este agente não é ativo contra as serino carbapenemases, KPC ou metalo- β -lactamases (CARVALHÃES *et al.*, 2019; GHERARDI *et al.*, 2019). Possui atividade limitada também contra isolados de *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e cocos Gram-positivos (PFALLER *et al.*, 2017).

3.6.1 Aspectos químicos

O ceftolozana é um antimicrobiano semissintético pertencente a classe das cefalosporinas de quinta geração, possui fórmula molecular $C_{23}H_{30}N_{12}O_8S_2$ e massa molecular equivalente a 666,7 g/mol (PUBCHEM, 2020c). A molécula de ceftolozana possui um anel amino tiadiazol responsável por aumentar a atividade contra bactérias Gram-negativas e o grupo ácido dimetilacético a atividade antipseudomonas. O anel pirazol e o grupo-2-aminoetilureido conferem estabilidade contra as β -lactamases do tipo AmpC de *P. aeruginosa*, bem como o grupo 2-metilpirazol melhora a atividade contra este microrganismo (figura 4) (DUIN *et al.*, 2016).

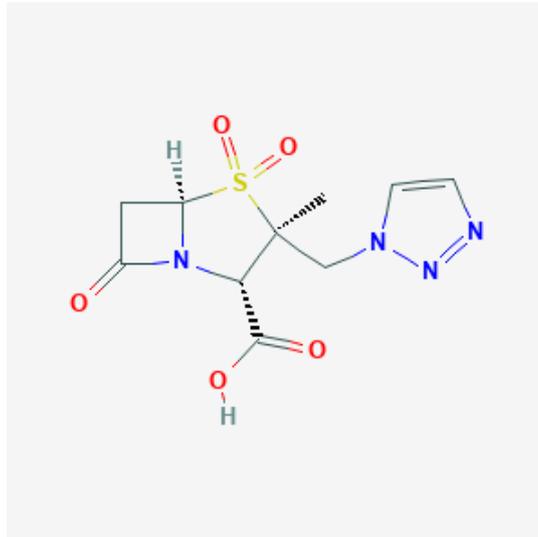
O tazobactam é um derivado da sulfona e pertence à classe dos ácidos penicilânico, como o sulbactam. Contém um anel β -lactâmico e possui fórmula molecular $C_{10}H_{12}N_4O_5S$ e massa molecular de 300,29 g/mol (PUBCHEM, 2020d). A estrutura química do tazobactam está representada na figura 5.

Figura 4. Relação estrutura-atividade do ceftolozana



Fonte: o autor.

Figura 5. Estrutura química do tazobactam



Fonte: Pubchem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tazobactam>
(2020)

3.6.2 Mecanismo de ação

Ceftolozana é um potente inibidor das PLP's e possui elevada afinidade pelas PLP's (1b, 1c e 3) de *P. aeruginosa* e PLP3 de *E. coli*, essenciais para a síntese da parede celular, o que resulta na inibição de síntese e consequente morte celular (GHERARDI *et al.*, 2019; SEIFERT *et al.*, 2018). O Tazobactam é um inibidor de β -lactamases que se liga irreversivelmente ao sítio ativo das β -lactamases, capaz de impedir a hidrólise de ceftolozana por *Enterobacterales* produtoras de ESBL, incluindo as enzimas CTX-M, SHV e TEM (ZERBAXA, 2017). O C/T é estável contra os mecanismos de resistência pseudomonal mais comuns causados por mutações (SHORTRIDGE *et al.*, 2018), bem como supera os mecanismos de resistência mais prevalentes como cefalosporinase cromossômica Ambler classe C, ESBL's, perda de porinas da membrana externa e regulação positiva de bombas de efluxo (CARVALHÃES *et al.*, 2019; SEIFERT *et al.*, 2018).

3.6.3. A sensibilidade *in vitro* à C/T

Variados estudos têm investigado extensivamente a sensibilidade *in vitro* à C/T contra microrganismos Gram-negativos. O aspecto mais importante observado para este agente é a sua versátil atividade contra isolados de *P. aeruginosa* e *Enterobacterales* dispondo fenótipos de resistência (CLUCK *et al.*, 2015). Estudo realizado por Tuon e colaboradores demonstrou atividade relevante de C/T contra uma grande variedade de microrganismos coletados de diferentes centros brasileiros, distribuídos nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia, mostrando resultados de sensibilidade *in vitro* promissores mesmo em relação a isolados multirresistentes (TUON *et al.*, 2020).

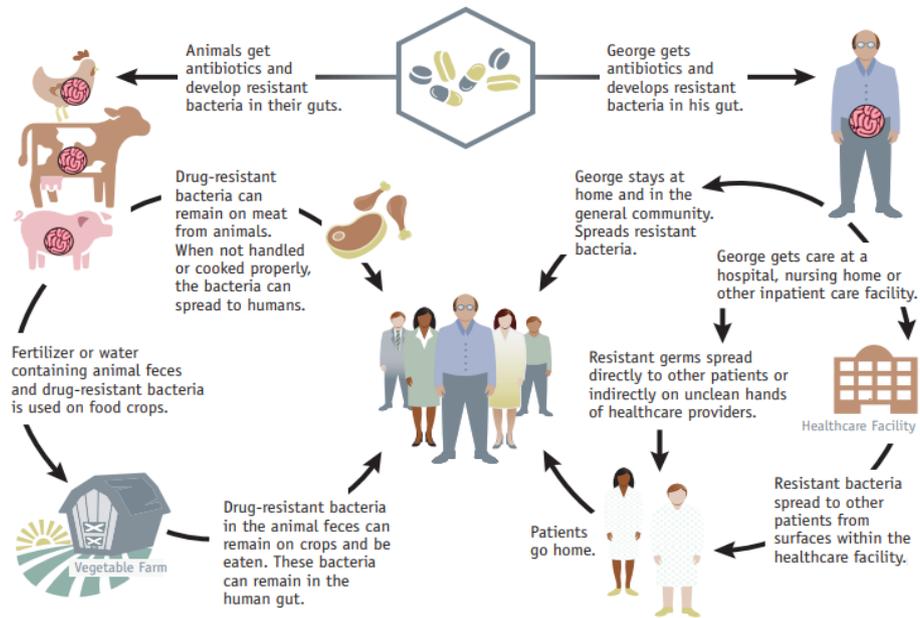
C/T é sensível a hidrólise por enzimas carbapenemases, porém não é afetado por outros mecanismos de resistência como bombas de efluxo e perda de porinas, permanecendo assim vulnerável a isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases ou metalo- β -lactamases. Em contrapartida, resultados publicados de atividade *in vitro* corroboram com dados mundiais em que C/T mostrou ser ativo contra isolados produtores de ESBL, portadores de CTX-M-14 e CTX-M-15 (CLUCK *et al.*, 2015; ESTABROOK *et al.*, 2014).

3.7. INTERDISCIPLINARIEDADE

A rápida emergência e disseminação de genes e bactérias resistentes entre humanos, animais e o meio ambiente em escala global requer cada vez mais uma abordagem “*One Health*” coordenada e multissetorial para assegurar o tratamento e a prevenção das questões que englobam a saúde humana, animal e ambiental (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). A resistência aos antimicrobianos pode ser facilmente transferida de um ecossistema para outro (figura 6), em um cenário onde bactérias resistentes aos antimicrobianos aprovados para o uso humano são frequentemente transmitidas entre animais e seres humanos ocupacionalmente expostos, demonstrando-se uma ampla disseminação clonal de marcadores de resistência (DANDACHI *et al.*, 2019).

O plano de ação global da OMS estabeleceu pilares para o enfrentamento da crise de resistência aos antimicrobianos, dentre eles o desenvolvimento de novos antimicrobianos e a racionalização do uso por meio de uma utilização mais criteriosa e do monitoramento da prática da prescrição (WHO, 2015). Desta forma, desperta-se a necessidade de gerenciamento do uso de novos antimicrobianos recentemente aprovados para uso clínico como ceftolozana-tazobactam e ceftazidima-avibactam nas instituições hospitalares de saúde, baseado em estudos de sensibilidade *in vitro* e investigação molecular, visto à escassez de opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de IRAS.

Figura 6. Representação da interação dos diversos ambientes na disseminação dos microrganismos multirresistentes.



Fonte: CDC, 2013.

4. METODOLOGIA

4.1. DELINEAMENTO E LOCAIS DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e analítico, centrado na investigação fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Enterobacterales* e *Pseudomonas aeruginosa* causadores de IRAS.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Associação Beneficente Evangélica / Hospital Dona Helena (HDH) e no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), ambos localizados em Joinville (SC). O HDH é um hospital geral privado com um total de 189 leitos, sendo 18 destes referentes à UTI de alta complexidade. Possui um Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) atuante, que monitora periodicamente o perfil de resistência bacteriana hospitalar.

Foram utilizados dados de identificação bacteriana e de resultados de testes fenotípicos (testes de sensibilidade aos antimicrobianos) gerados no setor de microbiologia do laboratório do HDH. Os procedimentos relativos às análises moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE.

4.2. PERÍODO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Foram considerados os isolados identificados como *Enterobacterales* e *P. aeruginosa* durante a avaliação microbiológica assistencial rotineira, derivados de amostras clínicas provenientes de pacientes do HDH. Parte dos isolados encontravam-se armazenados sob congelamento, correspondendo às coletas realizadas entre janeiro de 2018 e julho de 2019. A partir de agosto de 2019, os isolados foram obtidos prospectivamente à medida que foram sendo identificados na rotina laboratorial. Todos os isolados foram incluídos nas investigações moleculares previstas, de forma a representar o período avaliado (janeiro de 2018 a agosto de 2020).

4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

4.3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os isolados de *Enterobacterales* e *P. aeruginosa* resistentes a pelo menos um antimicrobiano carbapenêmico (meropenem, imipenem ou ertapenem) ou produtores de ESBL obtidos de culturas microbiológicas derivadas de amostras clínicas provenientes do HDH no período de janeiro de 2018 a agosto de 2020.

4.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os isolados correspondentes à mesma espécie bacteriana, provenientes do mesmo paciente e período de internação, dispoendo perfil fenotípico idêntico. As cepas mantidas congeladas que apresentaram falha na reativação com fins de propiciar a subsequente extração do DNA genômico ou que apresentaram sinais de contaminação foram excluídas do estudo.

4.4. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

As amostras clínicas foram submetidas aos procedimentos rotineiros para a definição do microrganismo correspondente a cada isolado empregando-se o sistema automatizado Microscan Walkaway Plus (Beckham Coulter, EUA), conforme instruções do fabricante, paralelamente à realização da bacterioscopia pelo método de Gram.

Após realizada a identificação, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar MacConkey (bioMérieux, Brasil), sob incubação a 37°C por 24 horas, e analisados macro e microscopicamente. Em seguida, foram repicados em ágar Mueller Hinton (bioMérieux, Brasil), sob incubação a 37°C, por 24 horas. Colônias crescidas neste meio de cultura foram transferidas para tubos criogênicos de 2 mL contendo seis miçangas de vidro estéreis e meio próprio para congelamento a -80°C, contendo 6% de glicerol, 37 g.L⁻¹ de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Probac, São Paulo, Brasil) e 0,6 g.L⁻¹ de ágar (Himedia, Mumbai, Índia). Antes do congelamento para conservação a longo prazo, os isolados foram inicialmente incubados a 37°C durante 48 horas, seguido de manutenção sob resfriamento a -20°C por 24 horas.

4.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

4.5.1. Métodos fenotípicos

4.5.1.1. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

A determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão em ágar (método “Kirby e Bauer”) e concomitantemente pelo sistema automatizado Microscan Walkaway Plus (Beckman Coulter, EUA) por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada antimicrobiano.

Para avaliação da sensibilidade aos carbapenêmicos foram utilizados discos de imipenem ou meropenem contendo 10 µg de cada antimicrobiano, segundo indicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* do ano vigente. Simultaneamente, foram testadas outras classes de antimicrobianos nas seguintes quantidades indicadas pelo CLSI, selecionados individualmente de acordo com o microrganismo isolado e sítio anatômico: amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ceftriaxona (30 µg), ertapenem (10 µg), gentamicina (10 µg), levofloxacina (5 µg) e piperacilina-tazobactam (100/10 µg). Todos os discos utilizados foram provenientes do mesmo fabricante (Oxoid, Inglaterra).

Preparou-se uma suspensão bacteriana (inóculo) a partir da seleção de colônias isoladas de cultura em ágar MacConkey (bioMérieux, Brasil) com crescimento prévio de 18 a 24 horas, que então foi comparada ao padrão 0,5 na escala de turvação de McFarland (DensiCHECK Plus – bioMérieux, Brasil). A seguir, essa suspensão foi semeada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton (bioMérieux, Brasil) e, após cinco minutos, foi feita a aplicação dos discos de antimicrobianos. Em seguida, a placa foi incubada em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 a 18 horas. A interpretação dos halos de inibição foi realizada conforme as recomendações vigentes do CLSI para cada ano correspondente.

O sistema automatizado Microscan Walkaway Plus (Beckman Coulter, EUA) consiste em microplacas ou painéis contendo agentes antimicrobianos com suas respectivas diluições para a determinação da sensibilidade antimicrobiana. Por meio desta técnica obteve-se a CIM para cada antimicrobiano, que correspondeu à menor concentração capaz de promover a inibição da suspensão bacteriana padronizada. A

interpretação da sensibilidade (sensível, intermediário ou resistente) aos antimicrobianos foi realizada de modo automatizado utilizando-se os pontos de corte recomendados pelo CLSI para cada ano correspondente.

Em paralelo, para os isolados dispendo resistência aos carbapenêmicos foi utilizado o sistema de microdiluição destinado à determinação da CIM à polimixina B denominado Policimbac (Probac, Brasil). Preparou-se uma suspensão bacteriana (inóculo) a partir da seleção de colônias isoladas de cultura em ágar MacConkey (bioMérieux, Brasil) com crescimento prévio de 18 a 24 horas, que então foi comparada ao padrão 0,5 na escala de turvação de McFarland (10^8 UFC/mL) (DensiCHECK Plus – bioMérieux, Brasil). A seguir, foi realizada uma diluição 1:100 (10^6 UFC/mL), em solução salina estéril, da suspensão bacteriana, seguido da realização de nova diluição até resultar na suspensão ajustada a 10^5 UFC/mL. Após, inoculou-se 100 microlitros da suspensão final em cada cavidade do painel de teste (0,125 a 64 mcg/mL). A placa de microtitulação foi incubada em estufa a 35°C, por 24 horas. Para a interpretação da CIM à polimixina B observou-se a inibição do crescimento bacteriano em cada cavidade do painel de teste, sendo considerada uma diminuição da sensibilidade a este antimicrobiano nos isolados que apresentaram resultados de CIM >2 µg/mL (CLSI, 2018; Probac, Brasil).

4.5.1.2. Detecção fenotípica de carbapenemases

Para a detecção fenotípica de carbapenemases foram realizados os métodos descritos na Nota Técnica nº 01/2013 (ANVISA, 2013), a qual dispõe sobre as medidas de prevenção e controle de infecções por *Enterobacterales* multirresistentes. A identificação da produção de carbapenemases deu-se pela diferença de tamanhos de halos entre discos com antimicrobianos carbapenêmicos e discos com antimicrobianos acrescidos de bloqueadores enzimáticos, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido fenilborônico (AFB). Os isolados que apresentaram diferença quanto ao comparativo de diâmetros entre os discos com e sem EDTA igual ou superior a 5 mm foram considerados potenciais produtores de M β L. Ao observar-se esta diferença entre os discos com e sem AFB considerou-se um provável isolado produtor de KPC.

A triagem fenotípica para a detecção de produção de KPC em cepas pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) não é indicada, pois a utilização do AFB pode acarretar em resultados falso positivos. Neste caso, recomenda-se a metodologia de

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do gene *bla_{KPC}*. Adicionalmente, não há padronização vigente para a triagem fenotípica de carbapenemases para os BGN não fermentadores, sendo recomendável a realização do método de PCR.

4.5.1.3. Detecção fenotípica de ESBL

A decisão de realização do teste fenotípico para a detecção de ESBL foi adotada a partir da observação da diminuição de halos de inibição para β -lactâmicos de amplo espectro no teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A investigação fenotípica para produção de ESBL foi realizada, por meio do “Teste de sinergismo de disco duplo”, seguindo as orientações e critérios interpretativos do CLSI e do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BRCAST) de cada ano vigente (BRCAST, 2017; CLSI, 2018).

Preparou-se uma suspensão bacteriana (inóculo) a partir da seleção de colônias isoladas de cultura em ágar MacConkey (bioMérieux, Brasil) com crescimento prévio de 18 a 24 horas, que então foi comparada com padrão 0,5 na escala de turvação de McFarland (DensiCHECK Plus – bioMérieux, Brasil). A seguir, essa suspensão foi semeada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton (bioMérieux, Brasil) e, após cinco minutos, discos contendo cefalosporinas (cefotaxima - 30 μ g, ceftazidima - 30 μ g e cefepima - 30 μ g) foram aplicados a uma distância de 15 mm de um disco contendo amoxicilina/clavulanato (20/10 μ g). Em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 a 18 horas.

Foram considerados resultados positivos aqueles em que se observou uma deformação do halo de inibição ou aparecimento de zona fantasma entre o(s) disco(s) da(s) cefalosporinas e o disco de amoxicilina/clavulanato.

4.5.1.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam

A definição da CIM dos antimicrobianos C/A e C/T foi realizada pelo método quantitativo de fitas padronizadas Etest[®] contendo gradiente de concentração exponencial, utilizadas para a determinação da sensibilidade a estes antimicrobianos. A faixa de concentração empregada para ambos antimicrobianos foi de 0,016/4-256/4 μ g/mL (CLSI, 2017; BRCAST, 2017).

Preparou-se uma suspensão bacteriana (inóculo) a partir da seleção de colônias isoladas de cultura em ágar MacConkey com crescimento prévio de 18 a 24 horas, que então foi comparada com padrão 0,5 na escala de turvação de McFarland (DensiCHECK Plus – bioMérieux, Brasil). A seguir, essa suspensão foi semeada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton (bioMérieux, Brasil) e, após cinco, minutos foi feita a aplicação das fitas Etest[®] de C/A (bioMérieux, Brasil) e C/T (Liofilchem, Itália). Em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 a 18 horas. Para interpretação dos resultados foram utilizados os parâmetros estipulados pelo CLSI e BRCast e para a realização de controle de qualidade foram utilizadas as cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 700603.

4.5.2. Métodos genotípicos

4.5.2.1. Obtenção do DNA microbiano

Para a obtenção do DNA bacteriano, foi utilizado o método de choque térmico descrito por Vanechoutte *et al.* (1995) e Baratto & Megiolaro (2012), com modificações, a partir de cultivo em meio sólido (ágar Mueller Hinton). Primeiramente, duas a três colônias de uma cultura pura, coletadas com alça de inoculação, foram ressuspensas em 100 µL de água destilada estéril, em microtubo estéril de 1,5 mL. As suspensões foram submetidas a banho fervente por 5 min e, em seguida, a choque térmico em banho de gelo por 5 min. O procedimento de fervura e resfriamento foi repetido, seguido de centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 8.000 x g por 10 min. Ao final do processamento, o sobrenadante foi coletado e o precipitado, descartado. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi qualificado e quantificado por meio de análise espectrofotométrica (leitura a 260 e 280 nm) em aparelho Epoch (BioTek Instruments, Winooski, EUA) e, em seguida, armazenado a -20°C até o uso subsequente.

4.5.2.2. Avaliação da viabilidade do DNA microbiano

Para verificar a viabilidade do método de extração de DNA para as análises genotípicas subsequentes, foi aplicada a PCR no DNA bacteriano recém obtido.

Utilizou-se o par de iniciadores específicos para o gene 16S rRNA - 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') - que propiciam a amplificação de um segmento único de aproximadamente 1500 pb. O gene 16S rRNA codifica para a subunidade ribossômica 30S do RNA, que é parte do sítio de ocorrência da síntese proteica e, portanto, está presente em todas as eubactérias.

As reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, acrescentando-se, aproximadamente, 50 a 500 ng de DNA extraído à mistura de reagentes contendo 1 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil), 200 µM dNTPs (GE Healthcare, Reino Unido), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 50 pmols de cada iniciador (DNA Express, Brasil) e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cyler (BIOER Technology, Tóquio, Japão), conforme condições adaptadas de Eden *et al.* (1991) tendo uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 37°C por 1 min e 72°C por 2 min. Uma extensão final foi conduzida a 72°C por 10 min.

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) por uma hora a 110V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.5.2.3. Identificação de genes codificadores de ESBL

Foram investigados os genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* nos isolados que apresentaram triagem fenotípica positiva para presença de ESBL, empregando-se a técnica da PCR em reações individuais e utilizando-se os iniciadores apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de ESBL.

Alvo	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
<i>bla_{SHV}</i>	TTATCTCCCTGTTAGCCACC GATTTGCTGATTCGCTCGG	795	WEILL <i>et al.</i> , 2004
<i>bla_{CTX-M}</i>	CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG	585	BATCHELOR <i>et al.</i> , 2005

Fonte: o autor.

Todas as reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, acrescentando-se, aproximadamente, 50 a 500 ng de DNA extraído à mistura de reagentes contendo 1 U Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 200 µM dNTPs (GE Healthcare), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 50 pmols de cada iniciador (Exxtend, Brasil) e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cyclyer (BIOER Technology, Tóquio, Japão) consistindo de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação, hibridização e extensão (1 min a 72°C) para cada gene investigado (tabela 2), e extensão final realizada a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*.

Alvo	Desnaturação	Hibridização
	°C (tempo)	°C (tempo)
<i>bla_{SHV}</i>	94 (1 min)	50 (30 s)
<i>bla_{CTX-M}</i>	94 (30 s)	60 (30 s)

Fonte: o autor.

4.5.2.4. Identificação de genes codificadores de carbapenemases

A investigação do gene *bla_{OXA-48-like}* foi realizada apenas em *Enterobacterales* e do gene *bla_{SPM-1}* somente em *Pseudomonas spp.*, enquanto a investigação de *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* foi realizada para todos os isolados selecionados. Foi realizada PCR, em reações individuais, empregando-se os iniciadores apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de carbapenemases.

Alvo	Sequência (5' a 3')	Produto (pb)	Referência
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTTCGG	177	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2012
<i>bla</i> _{KPC}	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	785	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2009
<i>bla</i> _{NDM-1}	TTGGCCTTGCTGTCCTTG ACACCAGTGACAATATCACCG	661	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2012
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	MENDES <i>et al.</i> , 2007
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	POIREL <i>et al.</i> , 2011
<i>bla</i> _{SPM-1}	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	ELLINGTON <i>et al.</i> , 2007

Fonte: o autor.

As reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, acrescentando-se, aproximadamente, 50 a 500 ng de DNA extraído à mistura de reagentes contendo 1 U Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 200 µM dNTPs (GE Healthcare), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 50 pmols de cada iniciador (DNA Express, Brasil) e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cyclor (BIOER Technology, Tóquio, Japão) consistindo de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos. As condições específicas para cada gene alvo investigado estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}

Alvo	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos	Extensão Final
	°C (tempo)	°C (tempo)	°C (tempo)	n°	°C (tempo)
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	94 (1 min)	63 (40 s)	72 (30 s)	35	72 (7 min)
<i>bla</i> _{KPC}	94 (1 min)	60 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{NDM-1}	94 (1 min)	62 (1 min)	72 (1 min)	35	72 (10 min)
<i>bla</i> _{VIM}	94 (30 s)	68,8 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{IMP}	94 (30 s)	45 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{SPM-1}	94 (30 s)	55,5 (40 s)	72 (50 s)	40	72 (5 min)

Fonte: o autor.

4.5.2.5. Eletroforese

Foi realizada eletroforese submersa (tampão TBE) em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, para a verificação dos produtos das reações de PCR destinadas aos genes de interesse. Na sequência, a confirmação se deu via exposição à luz ultravioleta em transiluminador (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalém, Israel), seguido de registro digitalizado.

Além de serem utilizados controles positivos e branco, foi realizada a confirmação da obtenção dos produtos (*amplicons*) correspondentes aos segmentos planejados por meio da comparação de tamanhos com um padrão disponível comercialmente (100 pb Ladder, Fermentas, Canadá), também exposto a mesma condição de eletroforese. Sendo assim, pela análise dos perfis eletroforéticos obtidos foi determinada a ocorrência dos elementos genéticos investigados.

4.5.2.6. Controle de qualidade

Visando confirmar a efetividade dos métodos genotípicos, foram utilizadas as cepas padrão (referência) descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Cepas padrão usadas como controle positivo nos testes genotípicos.

Genótipo	Espécie bacteriana	Nº Origem	Procedência
<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{KPC}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCBH6556	FIOCRUZ-RJ
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12692 RM	LACEN-PR
<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	5379 RM	LACEN-PR
<i>bla_{SPM-1}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12486 RM	LACEN-PR
<i>bla_{VIM}</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	13493 RM	LACEN-PR
<i>bla_{IMP}</i>	<i>Serratia marcescens</i>	12492 RM	LACEN-PR

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz - Cepas doadas gentilmente por Ana Paula Assef; LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná - Cepas doadas gentilmente por Marcelo Pillonetto. Fonte: o autor.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A amostra do estudo foi definida por conveniência; entretanto, buscou-se incluir cepas isoladas no decorrer da rotina laboratorial e em períodos próximos à execução da dissertação, de forma a melhor refletir o cenário epidemiológico atual. Os dados foram analisados via estatística descritiva calculando-se as frequências absolutas e relativas. As variáveis categóricas foram expressas como números absolutos e percentagens.

4.7. ASPECTOS ÉTICOS

Os dados relacionados ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos correspondentes ao período 2018 a 2020 foram autorizados e coletados junto ao SCIH e Laboratório de Análises Clínicas do HDH (Termos de Anuência – Anexos I, II e III) . As cepas bacterianas foram isoladas, armazenadas e analisadas mantendo-se a identificação do paciente correspondente sob sigilo absoluto, sendo apenas identificadas por codificação definida exclusivamente para a pesquisa. Nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa teve qualquer impacto aos pacientes acometidos no período de condução do estudo, não influenciando a conduta clínica e o prognóstico. Dessa forma, por não envolver seres humanos, de forma direta ou indireta, o estudo não foi apreciado por um Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo é apresentado na forma de artigo científico encaminhado para publicação no periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, conforme comprovante de submissão apresentado no Anexo IV.

TITLE PAGE

**Evaluation of the *in vitro* susceptibility of β -lactam-resistant Gram-negative bacilli
to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam**

Thaisa N. Carvalho^{1,2}, Vanessa C. Kobs¹, Daniela Hille¹, Roseneide C. Deglmann¹, Luiz
H. Melo^{1,2} and Paulo H. C. França^{1*}

¹ University of the Region of Joinville (Univille), Joinville, SC 89219-710, Brazil; ²

Dona Helena Hospital, Joinville, SC 89204-250, Brazil

* Corresponding author: Thaisa Noceti Carvalho

Molecular Biology Laboratory, University of the Region of Joinville (Univille), Paulo
Malschitzki st., 10, Zona Industrial Norte, Joinville, SC 89219-710, Brazil

Phone: +55 47 34619197

E-mail: thaisanoceti@gmail.com

Running title: *In vitro* susceptibility of Gram-negative bacilli to ceftazidime-avibactam
and ceftolozane-tazobactam.

Evaluation of the *in vitro* susceptibility of beta-lactam-resistant Gram-negative bacilli to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam

ABSTRACT

Introduction: The rapid spread of carbapenemases- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Gram-negative bacilli (GNB) represents a global public health threat by limiting therapeutic options in hospitalized patients. This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of β -lactam-resistant GNB to ceftazidime-avibactam (C/A) and ceftolozane-tazobactam (C/T) and to investigate the molecular determinants of resistance.

Methods: One hundred and one clinical isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* collected in a general hospital in southern Brazil were analysed. Susceptibility to the antimicrobial agents was evaluated by an automated method and the minimum inhibitory concentrations (MIC_{50/90}) of C/A and C/T were determined by the Etest[®]. The β -lactamase-encoding genes were investigated by the polymerase chain reaction. **Results:** High susceptibility to C/A and C/T was observed among ESBL-producing Enterobacterales (100% and 97.3% - CLSI or 83.8% - BRCAS^T, respectively) and carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (92.3% and 87.2%). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* exhibited high resistance to C/T (80% - CLSI or 100% - BRCAS^T), but high susceptibility to C/A (93.4%). All carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates were susceptible to C/A, while only one was susceptible to C/T. Both antimicrobials were inactive against metallo- β -lactamase-producing *K. pneumoniae* isolates. Resistance genes were concomitantly identified in 44 (44.9%) isolates. The *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{KPC} genes were the most frequent genes in C/T-resistant isolates, while *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{NDM-1} were the most frequent in C/A-resistant isolates.

Conclusion: C/A and C/T are therapeutic options against microorganisms with β -lactam resistance phenotypes, except when resistance is mediated by metallo- β -lactamases. Most C/A- and C/T-resistant isolates concomitantly carried two or more β -lactamase-encoding genes (62.5% and 77.4%, respectively).

Keywords: Gram-negative bacilli, ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, *in vitro* activity, genotypic markers

INTRODUCTION

Significant clinical and economic impacts are often reported as a result of bacterial resistance since long hospital stays and the empirical use of different antimicrobial agents increase healthcare costs, as well as morbidity and mortality rates.^{1,2} The rapid spread of carbapenemase- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Gram-negative bacilli (GNB) represents an important threat to global public health³⁻⁶ and has limited the use of broad-spectrum cephalosporins and carbapenems in hospitalized patients.^{1,7,8}

In 2017, the World Health Organization (WHO) published a list of potentially critical multidrug-resistant microorganisms with global priority for research and development of new antimicrobials, including carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacterales resistant to carbapenems and third-generation cephalosporins.⁹ Few antimicrobial agents have been developed in recent years to combat infections caused by multidrug-resistant GNB.^{10,11}

Ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam were approved by the Food and Drug Administration (FDA) and by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) for the treatment of complicated intra-abdominal and urinary infections.¹²⁻¹⁴ Ceftazidime-avibactam exerts *in vitro* activity against clinical ESBL-producing isolates, including Ambler classes A (serine carbapenemases - KPC), C (cephalosporinases - AmpC) and some class D enzymes (oxacillinases), but not metallo- β -lactamases (M β L).¹³⁻¹⁶ With the addition of avibactam, a β -lactamase inhibitor, ceftazidime tends to expand its activity against resistant strains.¹⁰ Ceftolozane-tazobactam, which is currently approved for the treatment of hospital-acquired and mechanical ventilation-associated bacterial pneumonia,^{17,18} is a combination of a fifth-generation cephalosporin and a

known β -lactamase inhibitor. These agents together exert broad-spectrum activity against Gram-negative bacteria, especially multidrug-resistant *P. aeruginosa*.¹⁹⁻²²

Although recently approved for clinical use and despite proven efficacy against GNB, resistance to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam has been reported in several countries.²³ Within this context, studies like ours evaluating the *in vitro* activity of these antimicrobial agents, as well as genotypic resistance markers, are important to optimize their use and will also contribute to the understanding of the current epidemiological scenario.

MATERIAL AND METHODS

Study characterisation and selection of clinical isolates

This is a cross-sectional study that focused on the phenotypic and molecular investigation of *P. aeruginosa* and Enterobacterales resistant to at least one carbapenem antibiotic or producing ESBL. The isolates were obtained from microbiological cultures of clinical samples collected in a general hospital in southern Brazil from January 2018 to August 2020. The clinical samples were submitted to routine procedures of the hospital microbiology laboratory for the identification of each microorganism using the automated Microscan Walkaway Plus system (Beckman Coulter, USA), as well as Gram staining.

Phenotypic determination of antimicrobial susceptibility

The antimicrobial susceptibility profile was evaluated by the Kirby-Bauer disk diffusion method and concomitantly with the automated Microscan Walkaway Plus

system (Beckman Coulter, USA) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of each antimicrobial agent. Additionally, the MIC of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam was defined by a quantitative method using standardized Etest[®] strips that contain an exponential concentration gradient. The concentration range used for both antimicrobials was 0.016/4-256/4 mg/L (Figure 1) and the results were interpreted using the parameters of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and of the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BRCASST).

The isolates were classified as ESBL producers based on the observation of a reduction in the inhibition halos for broad-spectrum β -lactams in the antimicrobial susceptibility test and by the double-disk synergy test. The isolates were classified as resistant to carbapenems (CR) when resistance to meropenem, ertapenem or imipenem was identified. Phenotypic detection of carbapenemases was performed by the enzymatic blocking method described in ANVISA Technical Note No. 01/2013,²⁴ which provides prevention and control measures of infections caused by multidrug-resistant Enterobacterales.

Extraction of bacterial DNA and investigation of target genes

Bacterial DNA was extracted from Müller-Hinton agar cultures using heat shock, as previously described.²⁵ To confirm the suitability of the extracted DNA for subsequent genotype analysis, the 16S rRNA gene was identified by the polymerase chain reaction (PCR).²⁶

The presence of the target genes was also investigated by PCR. All reactions were carried out in a final volume of 50 μ L using 50 to 500 ng of extracted DNA. The PCR-

amplified products were submitted to electrophoresis on 1% agarose gel and compared to a standard.

The *bla_{SHV}* and *bla_{CTX-M}* genes were investigated in isolates with positive phenotypic tests for the presence of ESBL using specific primers. The thermocycling conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation, annealing and extension (1 min at 72°C) for each gene investigated, and a final extension at 72°C for 10 min (Table 1).

For investigation of the carbapenemase-encoding *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM}* and *bla_{IMP}* genes, isolates showing phenotypic resistance to carbapenems were submitted to PCR consisting of initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by the specific thermocycling conditions specific for each target gene (Table 2). The reference strains described in Table 3 were used to confirm the effectiveness of the target gene detection methods.

Statistical analysis

The sample was obtained by convenience sampling. The data were analysed using descriptive statistics, with the calculation of absolute and relative frequencies. Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages.

RESULTS

One hundred and one bacterial isolates were included in the study: 39 (38.6%) carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, 37 (36.6%) ESBL-producing Enterobacterales, 15 (14.8%) *Klebsiella pneumoniae* with a positive phenotypic test for KPC, 4 (4.0%) *K.*

pneumoniae with a positive phenotypic test for M β L, 3 (3.0%) carbapenem-resistant isolates of the CESP group (consisting of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* and *Hafnia alvei*), and 3 (3.0%) carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Table 4).

The isolates were collected from urine samples (31.7%; n=32), rectal swabs (16.8%; n=17), wound discharge (15.8%; n=16), bronchoalveolar lavage (11.9%; n=12), and other less common sites (23.8%; n=24). Regarding the distribution of isolates among hospital units, 53.5% (n=54) were from inpatient units, 20.8% (n=21) from the intensive care unit (ICU), 19.8% (n=20) from the emergency department, and 5.9% (n=6) were isolated at the surgical centre and from outpatients. Thirty-seven (36.6%) of the 101 isolates were obtained from surveillance cultures.

***In vitro* activity of ceftolozane-tazobactam**

The *in vitro* activity of ceftolozane-tazobactam against each group of microorganisms selected in this study is shown in Table 5. The susceptibility rate of CR *P. aeruginosa* to ceftolozane-tazobactam was 87.2% (n=34), with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 2 and 6 mg/L, respectively. The ESBL-producing Enterobacterales isolates showed high susceptibility (97.3% according to CLSI and 83.8% according to BRCAS^T; MIC₅₀ < 1 mg/L; MIC₉₀ = 2 mg/L). Regarding the KPC-producing *K. pneumoniae* isolates, a high resistance rate was observed (100% according to BRCAS^T and 80% according to CLSI), with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 24 and > 256 mg/L, respectively. Two (67%) CR *K. pneumoniae* isolates were resistant. All CR isolates of the CESP group and M β L-producing *K. pneumoniae* were resistant to ceftolozane-tazobactam (MIC₅₀ and MIC₉₀ > 256 mg/L).

***In vitro* activity of ceftazidime-avibactam**

Table 6 shows the *in vitro* activity of ceftazidime-avibactam against each group of microorganisms selected in this study. All ESBL-producing Enterobacterales isolates (n=37) were susceptible to ceftazidime-avibactam, showing the lowest MIC values (MIC₅₀ < 1 mg/L; MIC₉₀ = 1 mg/L) compared to the other groups of microorganisms tested. A high susceptibility rate was observed for CR *P. aeruginosa* (92.3%; n=36), with MIC_{50/90} values of 3/8 mg/L.

The resistance rate of KPC-producing *K. pneumoniae* was 6.6 % (n=1), with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 1 and 2 mg/L, respectively. All CR *K. pneumoniae* isolates (n=3) were susceptible, while the MβL-producing *K. pneumoniae* group (n=4; 100%) was resistant. Two bacterial isolates of the CESP group (*E. cloacae* and *S. marcescens*) were susceptible and one was resistant (MIC₅₀ = 4 mg/L; MIC₉₀ = 12 mg/L) to ceftazidime-avibactam.

Phenotypic antimicrobial susceptibility

The antimicrobial agents exhibiting the highest susceptibility rates among KPC-producing *K. pneumoniae* isolates were polymyxin B, colistin, amikacin and ceftazidime-avibactam (93.3%), as well as gentamycin (86.7%). In this group of microorganisms, all isolates were resistant to ampicillin, ampicillin-sulbactam, cefepime, ceftriaxone, imipenem, ertapenem, meropenem, and piperacillin-tazobactam; 93.3% were resistant to ciprofloxacin and 80.0% to ceftolozane-tazobactam (Figure 2).

The most effective antimicrobial agents tested *in vitro* against the CR *P. aeruginosa* group were polymyxin B, colistin and ceftazidime-avibactam (92.3%), ceftolozane-tazobactam (87.2%), and amikacin (71.8%) (Figure 3). Against ESBL-producing Enterobacterales, ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, amikacin and gentamycin provided the highest susceptibility rates (100%) when compared to the other agents tested in this group, followed by ertapenem and colistin (97.3%), imipenem (94.6%), meropenem (91.9%), and piperacillin-tazobactam (83.8%) (Figure 4).

The CR isolates of the CESP group (n=3) were susceptible only to polymyxin B and amikacin (100%) and to ceftazidime-avibactam, ciprofloxacin and gentamycin (66.7%). All isolates were resistant to ceftolozane-tazobactam, ampicillin, ampicillin-sulbactam, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, and piperacillin-tazobactam. The M β L-producing *K. pneumoniae* isolates (n=4) exhibited higher susceptibility to polymyxin B and colistin (100%) and to amikacin (75%) and were resistant to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam. Analysis of the susceptibility profile of CR *K. pneumoniae* (n=3) to the antimicrobials tested showed susceptibility to polymyxin B, colistin, amikacin, and ceftazidime-avibactam.

Figure 5 summarizes the comparison of the ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam susceptibility profiles with the other antimicrobials tested in the different groups of microorganisms studied according to the CLSI breakpoints.

Genotypic resistance markers

The 16S rRNA gene was amplified in most of the isolates studied (97%; 98/101), thus confirming the suitability of the extracted DNA for the subsequent analyses. The percentage of isolates that were positive for the resistance genes investigated was high

(78.6%; 77/98). Table 7 shows the distribution of bacterial isolates according to the genotypic resistance markers investigated. All tested isolates were negative for *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{IMP}.

The *bla*_{CTX-M} gene predominated in different ESBL-producing Enterobacterales species (> 96%). However, *bla*_{SHV} positivity ranged from 63% to 100% in this group of microorganisms depending on the bacterial species. All isolates phenotypically identified as KPC-producing *K. pneumoniae* showed amplification of *bla*_{KPC}, followed by *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}, which were the second most prevalent genes in this group. In the CR *Pseudomonas aeruginosa* group, the *bla*_{CTX-M} gene was detected in 38.8% (14/36) of the isolates, while only two isolates (5.5%) were positive for *bla*_{KPC} and one isolate (2.7%) for *bla*_{VIM}. In this group, none of the carbapenemase or ESBL-encoding genes investigated was amplified in 20/36 isolates (55.5%).

The *bla*_{NDM-1} gene was detected in 3/4 (75%) M β L-producing *K. pneumoniae* isolates and in 1/3 (33.3%) CR *K. pneumoniae* isolates. Additionally, coexistence of the resistance genes was observed in 44 (44.9%) isolates. The most prevalent combinations were *bla*_{KPC}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV} in KPC-producing *K. pneumoniae* (60%; 9/15) and *bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV} in ESBL-producing *Escherichia coli* (59.2%; 16/27). Most isolates with phenotypic resistance to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam concomitantly carried two or more β -lactamase-encoding genes (Table 8). The *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{KPC} genes were the genes most frequently detected in isolates resistant to ceftolozane-tazobactam, while *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{NDM-1} were most frequently detected in isolates resistant to ceftazidime-avibactam.

Figure 6 shows the electrophoretic patterns of the PCR products obtained for the genes studied.

DISCUSSION

The increasing incidence of bacterial strains isolated from clinical samples that produce carbapenemases, enzymes capable of inactivating carbapenems and most β -lactams,²⁷ represents the greatest challenge of antibiotic therapy in recent years.^{5,10,28} This phenomenon has a major impact on patient management since it drastically limits therapeutic options. Consequently, infections caused by these bacteria are associated with high mortality rates.²⁹

Clinical isolates belonging to the order Enterobacterales and to the species *P. aeruginosa* are the main causative agents of severe infections associated with antibiotic resistance resulting from chromosome mutations and the transfer of plasmid-mediated resistance.^{30,31} These isolates commonly show multidrug resistance and pan-resistance phenotypes.³² Carbapenems are first-choice alternatives for the treatment of complicated infections caused by GNB, which are likely to develop resistance mechanisms after exposure to these antimicrobials.³³ Given this scenario, until recently, possible treatments have been restricted to the use of polymyxins B and E (colistin) and tigecycline, antimicrobial agents known for their high toxicity, limited efficacy and increased hospital costs due to the treatment of complications.³⁴⁻³⁶

Studies have been conducted in different countries to evaluate the *in vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam and bacterial resistance to these antimicrobial agents has been reported in hospitalized patients with or without previous treatment.²³ Furthermore, the combination of resistance mechanisms can significantly increase the MIC of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam.^{23,37}

The ability of ceftazidime-avibactam to inhibit KPC-type β -lactamases has become a global interest because of the substantial spread of this enzyme in countries such as Italy, Greece, Brazil, the United States, and Israel.^{23,38} Cui et al. conducted a multicentre study in China to evaluate the *in vitro* susceptibility of 347 KPC-producing *K. pneumoniae* isolates collected from patients without previous treatment to ceftazidime-avibactam. Most isolates were susceptible to ceftazidime-avibactam, with only 12 (3.5%) showing reduced susceptibility.³⁹ In Brazil, Rossi et al. found that, among 30 selected *K. pneumoniae* isolates non-susceptible to meropenem and positive for the *bla*_{KPC} gene that were collected from medical centres in São Paulo, only one (3.3%) was resistant to ceftazidime combined with avibactam and none was susceptible to ceftazidime alone.¹³ Similarly, in our study, the presence of the *bla*_{KPC} gene did not influence ceftazidime-avibactam susceptibility and the resistance rate found (6.6%; 1/15) was consistent with the global surveillance results of carbapenem-resistant and *bla*_{KPC}-carrying *K. pneumoniae*.⁴⁰

Jonge et al. characterized the *in vitro* activity of ceftazidime-avibactam against 961 meropenem-non-susceptible Enterobacterales isolates from Europe, Asia, Latin America and the Middle East through a global antimicrobial resistance surveillance program. The authors evaluated 145 M β L-producing isolates and detected a ceftazidime-avibactam resistance rate of 96.6%, with MIC_{50/90} values > 128 mg/L.⁴⁰ Similarly, all M β L-producing *K. pneumoniae* isolates in the present study were resistant to ceftazidime-avibactam, exhibiting MIC_{50/90} values > 256 mg/L. Thus, ceftazidime-avibactam is a potent agent against carbapenem-resistant Enterobacterales, except for isolates in which resistance is mediated by M β L.

Infections caused by multidrug-resistant *P. aeruginosa*, together with the delay in adequate antimicrobial therapy, are associated with increased mortality and prolonged

hospital stay.^{20,41} These bacteria are frequently isolated from immunocompromised patients with severe infections, generally those admitted to ICUs, and their rates of resistance to carbapenems and other agents have been increasing considerably.^{42,43} According to international reports, the resistance rates of *P. aeruginosa* to ceftazidime-avibactam are higher than those reported for Enterobacterales, ranging from 2.9 to 18%,^{23,44,45} while these rates can reach 50% in isolates resistant to carbapenems.^{23,43,46} However, although the present study investigated carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates, the rate of ceftazidime-avibactam resistance was lower (7.7%; 3/39). This fact might be related to the absence of carbapenemase-encoding genes in the majority of isolates investigated, suggesting that the phenotypic resistance to carbapenems detected is associated with other pseudomonal resistance mechanisms not analysed here.

Studies report that bacteraemia caused by ESBL-producing Enterobacterales are associated with higher rates of treatment failure and patient mortality when compared to bacteraemia caused by non-producing strains.^{1,47} These enzymes confer resistance to β -lactam antibiotics, especially agents belonging to the class of third-generation cephalosporins such as ceftazidime, cefotaxime, and ceftriaxone.^{6,48} In different scenarios, various authors emphasize that ESBL-producing Enterobacterales strains are not associated with resistance to ceftazidime-avibactam,^{10,11,22,40,49,50,51} as also demonstrated in our study.

Several studies have investigated the *in vitro* susceptibility of Gram-negative microorganisms to ceftolozane-tazobactam. The most important feature of this agent is its versatile activity against *P. aeruginosa* with resistance phenotypes.⁵² López-Calleja et al. analysed multidrug-resistant and extensively drug-resistant non-M β L-producing *P. aeruginosa* isolates collected in Spain and reported 92.2% susceptibility to ceftolozane-tazobactam, which was the second most active antimicrobial agent after colistin,⁵³ as also

observed in our study. The susceptibility rate reported by these authors agrees with other *in vitro* activity studies of ceftolozane-tazobactam conducted in different regions of the world,^{4,18,19,54,55} as well as with the present study (87.2%). Particularly, we did not identify the *bla*_{NDM-1} or *bla*_{IMP} gene in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates and the *bla*_{VIM} gene detected in only one isolate apparently is not associated with the ceftolozane-tazobactam resistance phenotype. In contrast, Qi-Min Teo et al. highlighted the importance of geographic variation in the antimicrobial activity results obtained over a period of 11 consecutive years in the Singapore region. The authors reported much lower susceptibility rates of *P. aeruginosa* to ceftolozane-tazobactam (37.9%), which were associated with the presence of MβL, compatible with the local molecular epidemiology.⁵⁶

Tuon et al. evaluated 673 GNB isolates collected in different Brazilian centres and found rates of *in vitro* susceptibility to ceftolozane-tazobactam ranging from 40.4% to 94.9%, promising results even regarding multidrug-resistant strains. The susceptibility rate of *K. pneumoniae* to ceftolozane-tazobactam was low (40.4%) because of the high incidence of KPC-type carbapenemases in Brazil, an enzyme that catalyses the hydrolysis of ceftolozane.⁵⁷ In our study, the susceptibility rate of KPC-producing *K. pneumoniae* to ceftolozane-tazobactam was even lower (13.3%). This finding might be explained by the identification of the *bla*_{KPC} gene in all isolates tested and by its concomitant presence with ESBL-encoding genes. Additionally, two isolates carrying more than one carbapenemase- and ESBL-encoding gene (*bla*_{KPC}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV}+*bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV}+*bla*_{VIM}) were identified in association with ceftolozane-tazobactam resistance phenotypes. Regarding MβL-producing *K. pneumoniae*, all isolates were resistant to ceftolozane-tazobactam and most of them carried *bla*_{NDM-1}, suggesting that this agent should be used with caution in empirical therapies.

On the other hand, we found high rates of *in vitro* ceftolozane-tazobactam susceptibility among ESBL-producing Enterobacterales despite the difference in breakpoints established by the CLSI and BRCAS standards (Table 7). This finding agrees with a study that evaluated 21,952 Enterobacterales isolates from 51 countries and found that ceftolozane-tazobactam inhibited 82.4% of the ESBL-producing isolates.²²

Some limitations of this study must be mentioned. The number of isolates evaluated was relatively small and the study was conducted in a single hospital. On the other hand, the study used clinical isolates selected over recent years in order to better reflect the current epidemiological scenario. We therefore recommend multicentre studies using a phenotypic and genotypic approach and a more expressive number of multidrug-resistant isolates for a better understanding of the local molecular epidemiology and for the detection of resistance to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam in different regions of the country. Furthermore, methods such as whole genome sequencing and clonal analysis can be useful tools to identify other important mechanisms and to monitor and control bacterial resistance in hospital settings.

FUNDING: This study received funding from the Foundation for Research and Innovation Support of the State of Santa Catarina (FAPESC; Grant: 2019TR159) and the Research Support Fund of the University of the Region of Joinville (FAP/Univille).

TRANSPARENCY DECLARATION: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 416–422.
2. Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, *et al.* Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. *Rev Port Saúde Pública* 2016; 34: 77–84.
3. CDC. Antibiotic resistance threats. *Centers for Disease Control and Prevention* 2013; 22–50.
4. Pfaller MA, Shortridge D, Sader HS, Gales A, *et al.* Ceftolozane-tazobactam activity against drug-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* causing healthcare-associated infections in Latin America: report from an antimicrobial surveillance program (2013–2015). *Braz J Infect Dis* 2017; 21: 627–637.
5. Sekar R, Srivani S, Kalyanaraman N, *et al.* NDM and other mechanisms of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in rural South India. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 18: 207-214.
6. Wu C, Wang Y, Shi X, *et al.* Rapid rise of the ESBL and mcr-1 genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008-2014. *Emerg Microbes Infect* 2018; 7: 1-10.
7. Alsaeed A, Blondeau JM. Antibiotic resistance in hospitals. *Future Microbiol* 2015; 10: 303–307.
8. Melo LC, Oresco C, Leigue L, *et al.* Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. *Vet Microbiol* 2018; 221: 59–66.
9. World Health Organization. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. WHO, 2017.
10. Alatoon A, Elsayed H, Lawlor K, *et al.* Comparison of antimicrobial activity between ceftolozane – tazobactam and ceftazidime – avibactam against multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Infect Dis* 2017; 62: 39–43.

11. Tuon FF, Rocha JL, Formigoni-Pinto MR. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime–avibactam: a systematic review. *Infection* 2017; 46:165–181.
12. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Parecer público de avaliação de medicamento-aprovação, 2018.
13. Rossi F, Cury AP, Franco MRG, Testa R, Nichols WW. The in vitro activity of ceftazidime–avibactam against 417 Gram-negative bacilli collected in 2014 and 2015 at a teaching hospital in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2017; 21: 569–573.
14. Shields RK, Potoski BA, Haidar G, *et al.* Clinical Outcomes, drug toxicity, and emergence of ceftazidime-avibactam resistance among patients treated for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Clin Infect Dis* 2016; 63: 1615–1618.
15. Buehrle DJ, Shields RK, Chen L, *et al.* Evaluation of the in vitro activity of ceftazidime-avibactam and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3227–3231.
16. Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, *et al.* In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3163–3169.
17. Garcia-Fernandez S, García-Castilho M, Melo-Cristino J, *et al.* In vitro activity of ceftolozane-tazobactam against *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa* causing urinary, intra-abdominal and lower respiratory tract infections in intensive care units in Portugal: the STEP multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 55:105887.
18. Kuo SC, Liu CE, Chen YS, *et al.* Activity of ceftolozane-tazobactam against Gram-negative pathogens isolated from lower respiratory tract infections in the Asia-Pacific region: SMART 2015-2016. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55:105883.

19. Carvalhães CG, Castanheira M, Sader HS, *et al.* Antimicrobial activity of ceftolozane–tazobactam tested against gram-negative contemporary (2015–2017) isolates from hospitalized patients with pneumonia in US medical centers. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2019; 94: 92-102.
20. Gherardi G, Linardos G, Pompilio A, *et al.* Evaluation of in vitro activity of ceftolozane-tazobactam compared to other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2019; 94: 297–303.
21. Gómez-Junyent J, Benavent E, Sierra Y, *et al.* Efficacy of ceftolozane/tazobactam, alone and in combination with colistin, against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* biofilm pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 53: 612–619.
22. Karlowsky JA, Kazmiercza KM, Young K, *et al.* In vitro activity of ceftolozane/tazobactam against phenotypically defined extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-positive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients (SMART 2016). *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2019; 96:114925.
23. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; 22: 18-27.
24. ANVISA. Nota Técnica n 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes, 2013.
25. Kobs VC, Augustini FJ, *et al.* The role of the genetic elements bla oxa and ISAbal in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016; 49: 433-440.
26. Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Inter Journal Sys Bacteriol* 1991; 41; 234-325.

27. Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent JL. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care* 2016; 20: 1–9.
28. Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *non-enterobacteriaceae* from animals and the environment: An emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 287–291.
29. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Rev Esp Quimioter* 2017; 30: 8-12.
30. Gomez HC, Blanco VM, Mota G, *et al.* Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica* 2014; 34: 91-100.
31. Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2016; 8: 460-469.
32. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281.
33. Labarca JA, *et al.* Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42: 276–292.
34. Feng, Y. Transferability of MCR-1/2 polymyxin resistance: Complex dissemination and genetic mechanism. *ACS Infect Dis* 2018; 4: 291–300.
35. Hagemann JB, Pfennigwerth N, Gatermann SG, *et al.* KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:1812-1814.
36. Trimble MJ, Mlynarcik P, Kolar M, *et al.* Polymyxin: Alternative mechanisms of action. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: 1-22.

37. Schillaci D, Spano V, Parrino B, *et al.* Pharmaceutical approaches to target antibiotic resistance mechanisms. *J Med Chem* 2017; 60: 8268-8297.
38. Livermore DM, Warner M, Jamrozny D, *et al.* In vitro selection of ceftazidime-avibactam resistance in *Enterobacteriaceae* with KPC-3 carbapenemase. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 5324–5330.
39. Cui X, Shan B, Zhang X, *et al.* Reduced ceftazidime-avibactam susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from patients without ceftazidime-avibactam use history – A Multicenter Study in China. *Front Microbiol* 2020;11:1365.
40. Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, *et al.* In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3163–3169.
41. Sader HS, Flamm RK, Carvalhaes CG, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime-Avibactam, ceftolozane-tazobactam, piperacillin -tazobactam, and meropenem stratified by U.S. Census divisions: results from 5 the 2017 INFORM Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:1587-18.
42. Evans SR, Tran TT, Hujer AM, *et al.* Rapid molecular diagnostics to inform empiric use of ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2019; 68: 1823–1830.
43. Schaumburg F, Bletz S, Mellmann A, *et al.* Analysis of the susceptibility to ceftazidime/avibactam in German MDR/XDR *Pseudomonas aeruginosa* comparing different methods. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 54: 255-260.
44. Nichols WW, Jonge BL, Kazmierczak KM, *et al.* In vitro susceptibility of global surveillance isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime-avibactam (INFORM 2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 4743-9.
45. Flamm RK, Nichols WW, Sader HS, *et al.* In vitro activity of ceftazidime/avibactam against Gram-negative pathogens isolated from pneumonia

in hospitalised patients, including ventilated patients. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47: 235-42.

46. Gonzalez MD, McMullen AR, Wallace MA, *et al.* Susceptibility of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam against a collection of β -lactam-resistant Gram-negative bacteria. *Ann Lab Med* 2017; 37: 174-176.
47. Sah BS, Aryal M, Bhargava D, Siddique A. Drug resistance pattern of bacterial pathogens of *Enterobacteriaceae* family. *TUJM* 2017; 4:15-22.
48. Daehre K, Proiahn M, Semmler T, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-/AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in broiler farms: Transmission dynamics at farm level. *Microb Drug Resist* 2018; 24: 511–518.
49. Hachem R, Reitzel R, Rolston K, *et al.* Antimicrobial activities of ceftazidime avibactam and comparator agents against clinical bacteria isolated from patients with cancer. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: 2106-16.
50. Castanheira M, Doyle TB, Mendes RE, *et al.* Comparative activities of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam against *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum β - lactamases from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63:160-19.
51. Castanheira M, Mills JC, Costello SE, *et al.* Ceftazidime-avibactam activity tested against *Enterobacteriaceae* isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of β -lactamase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 3509-3517.
52. Cluck D, Lewis P, Stayer B, *et al.* Ceftolozane–tazobactam: A new-generation cephalosporin. *Am J of Health Syst Pharm* 2015;72: 2135-46.
53. Lopéz-Calleja AI, Morales EM, Medina RN, *et al.* Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital. *Rev Esp Quimioter* 2019; 32: 68-72.

54. Seifert H, Körber-irrgang B, Kresken M. In-vitro activity of ceftolozane/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* isolates recovered from hospitalized patients in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 51: 227-234.
55. Walkty A, Adam H, Baxter M, *et al.* In vitro activity of ceftolozane/tazobactam versus antimicrobial non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates including MDR and XDR isolates obtained from across Canada as part of the CANWARD study, 2008–16. *J Antimicrob Chemother* 2017; 73:703-708.
56. Qi-Min Teo J, Lim JC, Tang CY, *et al.* Ceftolozane/tazobactam resistance and mechanisms in carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *Msphere* 2021; 6:1026-20.
57. Tuon FF, Cieslinski J, Rodrigues SS, *et al.* Evaluation of in vitro activity of ceftolozane–tazobactam against recent clinical bacterial isolates from Brazil – the EM200 study. *Braz J Infect Dis* 2020; 24: 96-103.

Table 1. Primers and thermocycling conditions used for the detection of ESBL-encoding genes.

Target	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Denaturation °C (time)	Annealing °C (time)
<i>bla_{SHV}</i>	TTATCTCCCTGTTAGCCACC GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	795	94 (1 min)	50 (30 s)
<i>bla_{CTX-M}</i>	CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG	585	94 (30 s)	60 (30 s)

References: *bla_{SHV}*: Weill *et al.*, 2004; *bla_{CTX-M}*: Batchelor *et al.*, 2005.

Table 2. Primers and thermocycling conditions used for the detection of carbapenemase-encoding genes.

Target	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Denaturation °C (time)	Annealing °C (time)	Extension °C (time)	Cycle number	Final extension °C (time)
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTTCGC	177	94 (1 min)	63 (40 s)	72 (30 s)	35	72 (7 min)
<i>bla</i> _{KPC}	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC	785	94 (1 min)	60 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{NDM-1}	TTGGCCTTGCTGTCCTTG ACACCAGTGACAATATCACCG	661	94 (1 min)	62 (1 min)	72 (1 min)	35	72 (10 min)
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	94 (30 s)	68,8 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	94 (30 s)	45 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{SPM-1}	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	94 (30 s)	55,5 (40 s)	72 (50 s)	40	72 (5 min)

References: *bla*_{OXA-48-like}: Monteiro *et al.*, 2012; *bla*_{KPC}: Monteiro *et al.*, 2009; *bla*_{NDM-1}: Monteiro *et al.*, 2012; *bla*_{VIM}: Mendes *et al.*, 2007, *bla*_{IMP}: Poirel *et al.*, 2011; *bla*_{SPM-1}: Ellington *et al.*, 2007.

Table 3. Reference strains used as positive controls in the genotypic tests.

Genotype	Bacterial species	Local number	Origin
<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{KPC}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCBH6556	FIOCRUZ-RJ
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12692 RM	LACEN-PR
<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	5379 RM	LACEN-PR
<i>bla_{SPM-1}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12486 RM	LACEN-PR
<i>bla_{VIM}</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	13493 RM	LACEN-PR
<i>bla_{IMP}</i>	<i>Serratia marcescens</i>	12492 RM	LACEN-PR

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz – strains kindly provided by Dr. Ana Paula Assef; LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná – strains kindly provided by Dr. Marcelo Pillonetto.

Table 4. Frequency of isolates according to bacterial species and type of resistance.

Phenotypic resistance	Species	N	%
CR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	38.6
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3.0
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2.0
	<i>Serratia marcescens</i>	1	1.0
ESBL	<i>Escherichia coli</i>	27	26.7
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	6.9
	<i>Proteus mirabilis</i>	2	2.0
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	1.0
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	14.8
MβL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4.0
	Total	101	100

CR: resistance to at least one carbapenem; ESBL: extended-spectrum β-lactamase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MβL: metallo-β-lactamase.

Table 5. *In vitro* activity of ceftolozane-tazobactam.

Group of microorganisms (N)	MIC frequency (%)												MIC interpretation (%)						MIC (mg/L)		
													CLSI			BRCAS					
	<1	1	2	3	4	6	8	12	24	32	48	>256	S	I	R	S	I	R	MIC 50	MIC 90	Range
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - CR (39)	15.4	46.2	56.4	66.7	87.2	92.3	94.9			97.4		100	87.2	7.7	5.1	87.2		12.8	2	6	0,38 - >256
<i>Enterobacterales</i> - ESBL (37)	67.6	83.8	97.3									100	97.3		2.7	83.8		16.2	<1	2	0,125 - >256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - KPC (15)			13.3		20.0		26.7	33.3	53.3	60.0	86.7	100	13.3	6.6	80.0			100	24	>256	2,0 - >256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - MβL (4)												100			100			100	>256	>256	>256 - >256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – CR (3)	33.3								66.7		100		33.3		66.6	33.3		66.6	24	48	0,50 - 48
CESP group - CR (3)							33.3					100			100			100	>256	>256	8 - >256

R: resistant; I: intermediate; S: susceptible. MIC50 and MIC90 (mg/L): concentration that inhibits 50% and 90% of bacterial isolates, respectively. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; BRCAS: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. CR: resistance to at least one carbapenem; ESBL: extended-spectrum β-lactamase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MβL: metallo-β-lactamase.

Table 6. *In vitro* activity of ceftazidime-avibactam.

Group of microorganisms (N)	MIC frequency (%)											MIC interpretation (%)			MIC (mg/L)		
												CLSI and BRCAS					
	<1	1	2	3	4	6	8	12	24	>256	S	I	R	MIC 50	MIC 90	Range	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - CR (39)	2.6	33.3	43.6	69.2	76.9	89.7	92.3	94.9	97.4	100	92.3		7.7	3	8	0,50 - >256	
<i>Enterobacterales</i> - ESBL (37)	89.2	97.3		100							100			<1	1	0,125 - 3	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - KPC (15)	26.7	86.7	93.3							100	93.3		6.6	1	2	0,38 - >256	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - MβL (4)										100			100	>256	>256	>256 - >256	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - CR (3)	33.3		66.7		100						100			2	4	0,75 - 4	
CESP group - CR (3)		33.3			66.7			100			66.7		33.3	4	12	1 - 12	

R: resistant; I: intermediate; S: susceptible. MIC50 and MIC90 (mg/L): concentration that inhibits 50% and 90% of bacterial isolates, respectively. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; BRCAS: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. CR: resistance to at least one carbapenem; ESBL: extended-spectrum β-lactamase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MβL: metallo-β-lactamase.

Table 7. Distribution of bacterial isolates according to genotypic resistance markers.

Phenotypic resistance	Species (N)	β -Lactamase genes	Isolates (n)	Isolates (%)
ESBL	<i>Escherichia coli</i> (27)	<i>bla</i> _{CTX-M}	26	96.3
		<i>bla</i> _{SHV}	17	63
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (7)	<i>bla</i> _{CTX-M}	7	100
		<i>bla</i> _{SHV}	6	85.7
	<i>Proteus mirabilis</i> (2)	<i>bla</i> _{CTX-M}	2	100
	<i>Klebsiella ozaenae</i> (1)	<i>bla</i> _{SHV}	1	100
		<i>bla</i> _{CTX-M}	1	100
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (15)	<i>bla</i> _{KPC}	15	100
		<i>bla</i> _{SHV}	14	93.3
		<i>bla</i> _{CTX-M}	12	80
		<i>bla</i> _{NDM-1}	1	6.7
		<i>bla</i> _{VIM}	1	6.7
CR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (36)	<i>bla</i> _{CTX-M}	14	38.9
		<i>bla</i> _{SHV}	5	13.9
		<i>bla</i> _{KPC}	2	5.6
		<i>bla</i> _{VIM}	1	2.8
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	<i>bla</i> _{CTX-M}	3	100
		<i>bla</i> _{SHV}	3	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	<i>bla</i> _{NDM-1}	1	33.3
	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	<i>bla</i> _{CTX-M}	1	50
<i>Serratia marcescens</i> (1)	<i>bla</i> _{KPC}	1	100	
M β L	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	<i>bla</i> _{SHV}	4	100
		<i>bla</i> _{NDM-1}	3	75

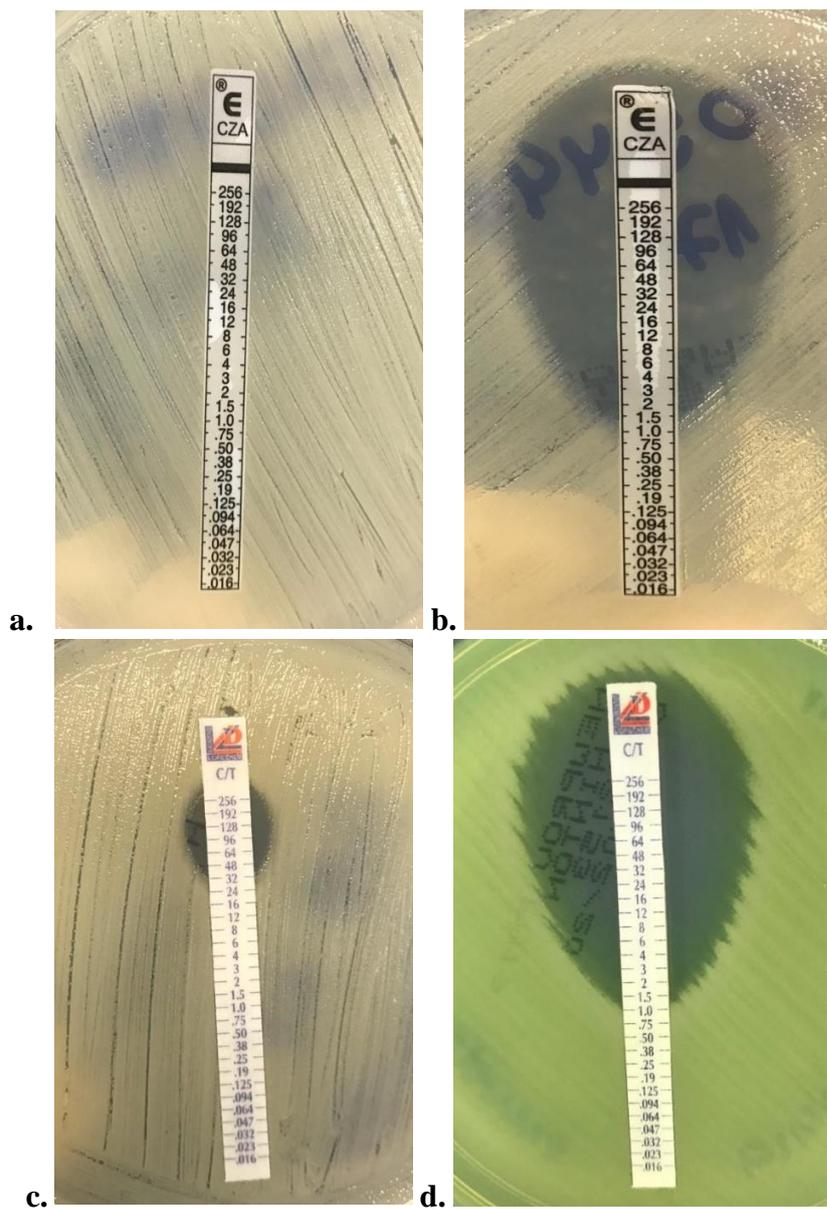
ESBL: extended-spectrum β -lactamase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; CR: resistance to at least one carbapenem; M β L: metallo- β -lactamase.

Table 8. Presence of β -lactamase-encoding genes and phenotypic susceptibility to ceftazidime-avibactam (C/A) and ceftolozane-tazobactam (C/T) in the isolates studied.

Phenotypic resistance	Species	Isolates (n)	β -Lactamase genes	Phenotype	
				C/A	C/T
ESBL	<i>Escherichia coli</i>	15	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	S
		10	<i>bla</i> _{CTX-M}	S	S
		1	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	R
		1	<i>bla</i> _{SHV}	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	<i>bla</i> _{CTX-M}	S	S
		1	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	R
		1	<i>bla</i> _{CTX-M}	S	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	2	<i>bla</i> _{CTX-M}	S	R
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	R
	KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S
2			<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SHV}	S	R
1			<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM-1}	S	R
1			<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{VIM}	S	R
1			<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M}	S	R
1			<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SHV}	R	R
CR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	<i>bla</i> _{CTX-M}	S	S
		2	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	S
		1	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M}	S	S
		1	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	S
		1	<i>bla</i> _{SHV}	S	S
		1	<i>bla</i> _{VIM}	S	S
		1	<i>bla</i> _{CTX-M}	R	S
		1	<i>bla</i> _{CTX-M}	S	R
		1	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	S	R
		1	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM-1}	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	<i>bla</i> _{CTX-M}	R	R
	<i>Serratia marcescens</i>	1	<i>bla</i> _{KPC}	S	R
M β L	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM-1}	R	R
		1	<i>bla</i> _{SHV}	R	R

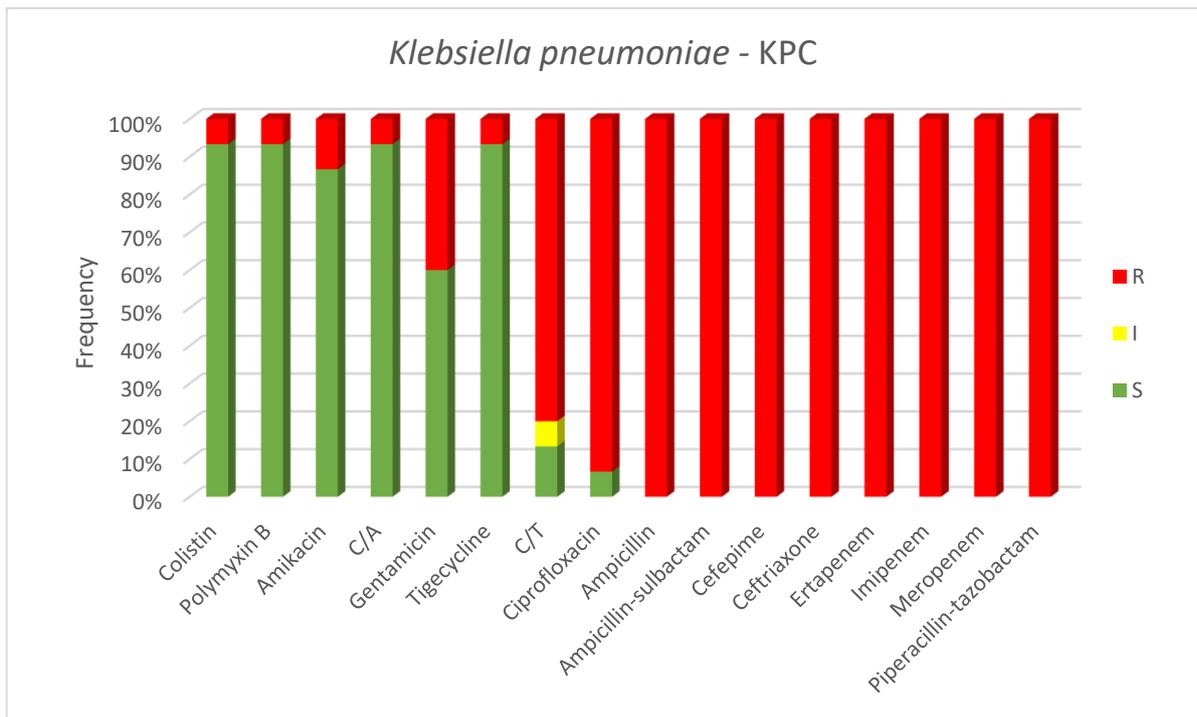
ESBL: extended-spectrum β -lactamase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; CR: resistance to at least one carbapenem; M β L: metallo- β -lactamase. R: resistant; S: susceptible.

Figure 1. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of ceftazidime-avibactam (C/A) and ceftolozane-tazobactam (C/T) by the Etest®.



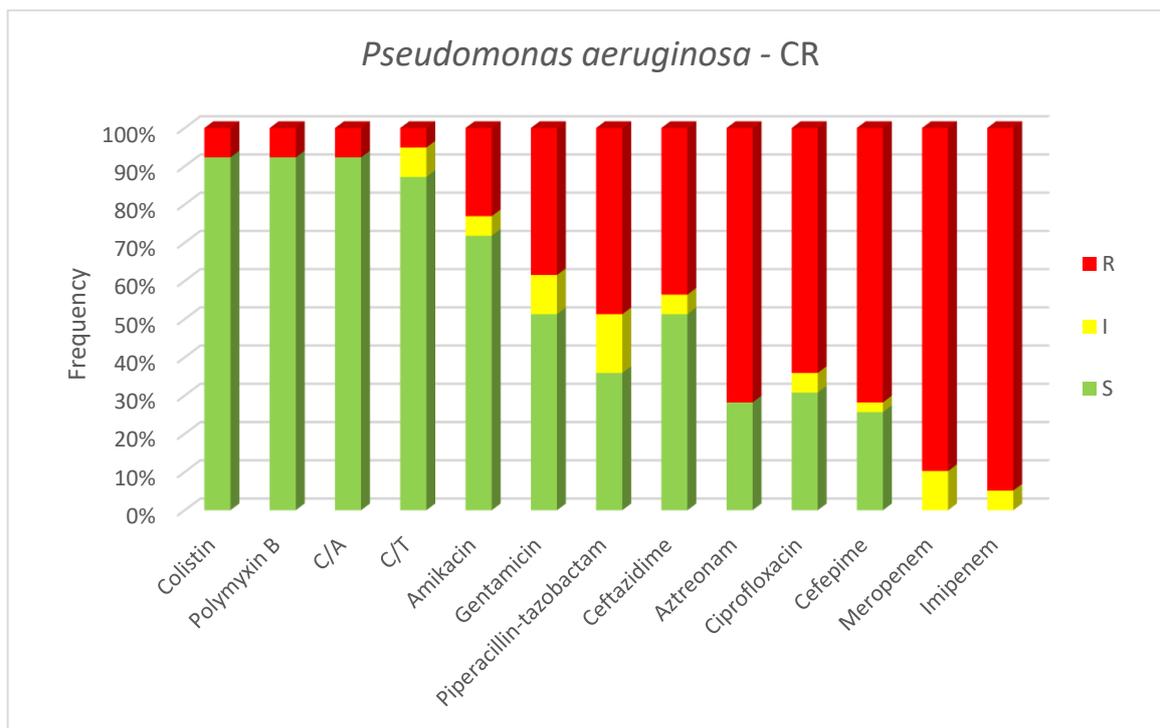
(a) C/A: MIC > 256 mg/L – resistant; (b) C/A: MIC = 1.5 mg/L – susceptible; (c) C/T: MIC = 48 mg/L – resistant; (d) C/T: MIC = 1.5 mg/L – susceptible. Concentration range used for both antimicrobials: 0.016/4-256/4 mg/L.

Figure 2. *In vitro* susceptibility profile of isolates of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* group (n=15).



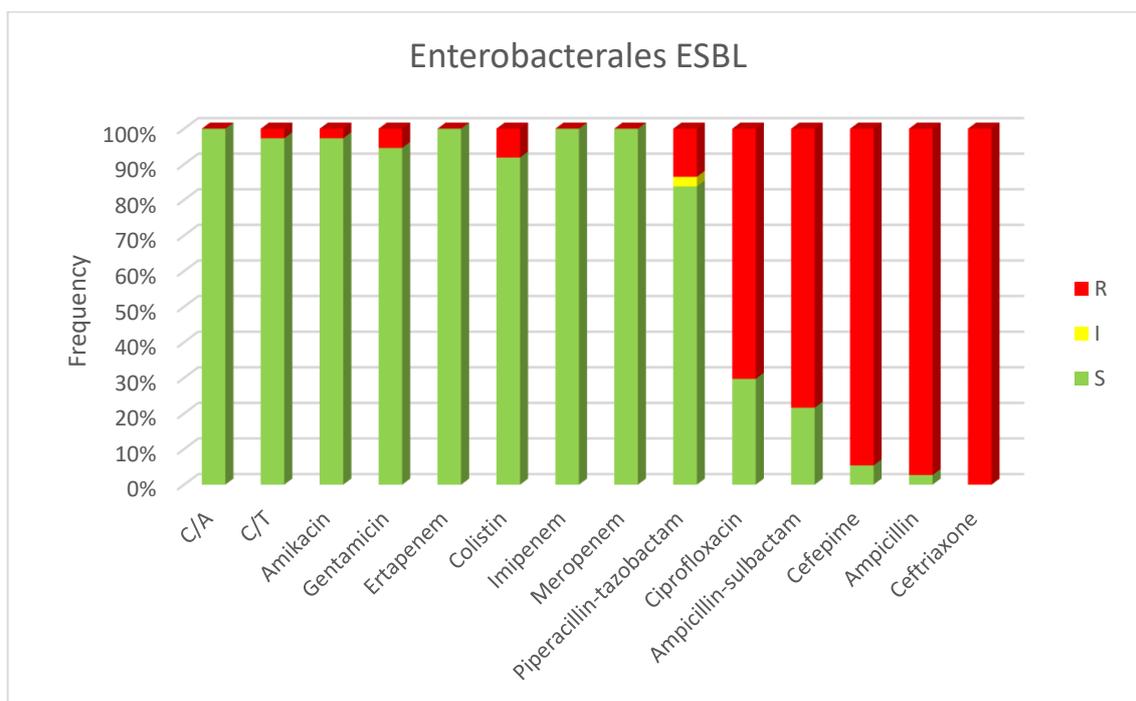
R: resistant I: intermediate, S: susceptible, C/A: ceftazidime-avibactam, C/T: ceftolozane-tazobactam. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

Figure 3. *In vitro* susceptibility profile of isolates of the CR *Pseudomonas aeruginosa* group (n=39).



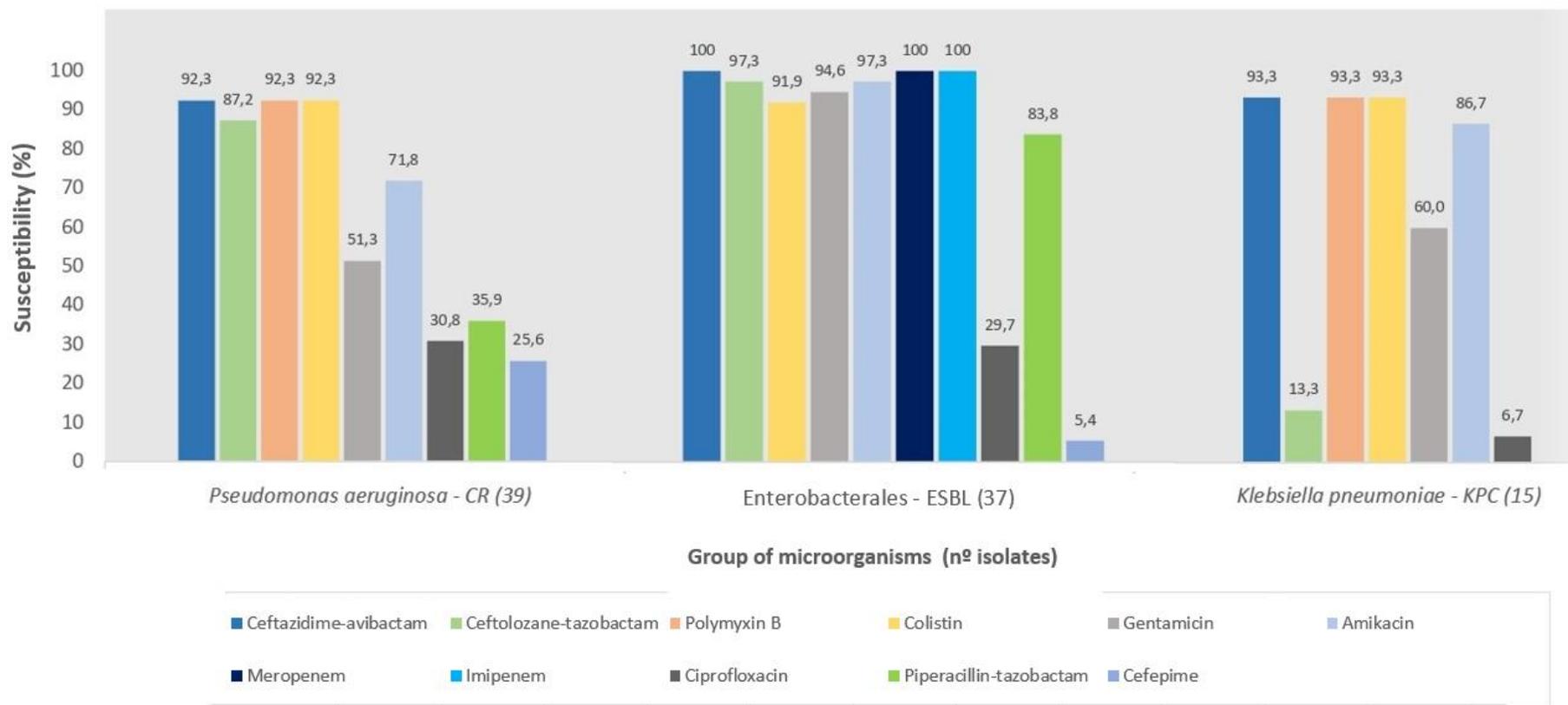
R: resistant I: intermediate, S: susceptible, C/A: ceftazidime-avibactam, C/T: ceftolozane-tazobactam. CR: resistance to at least one carbapenem.

Figure 4. *In vitro* susceptibility profile of isolates of the ESBL-producing Enterobacterales group (n=37).



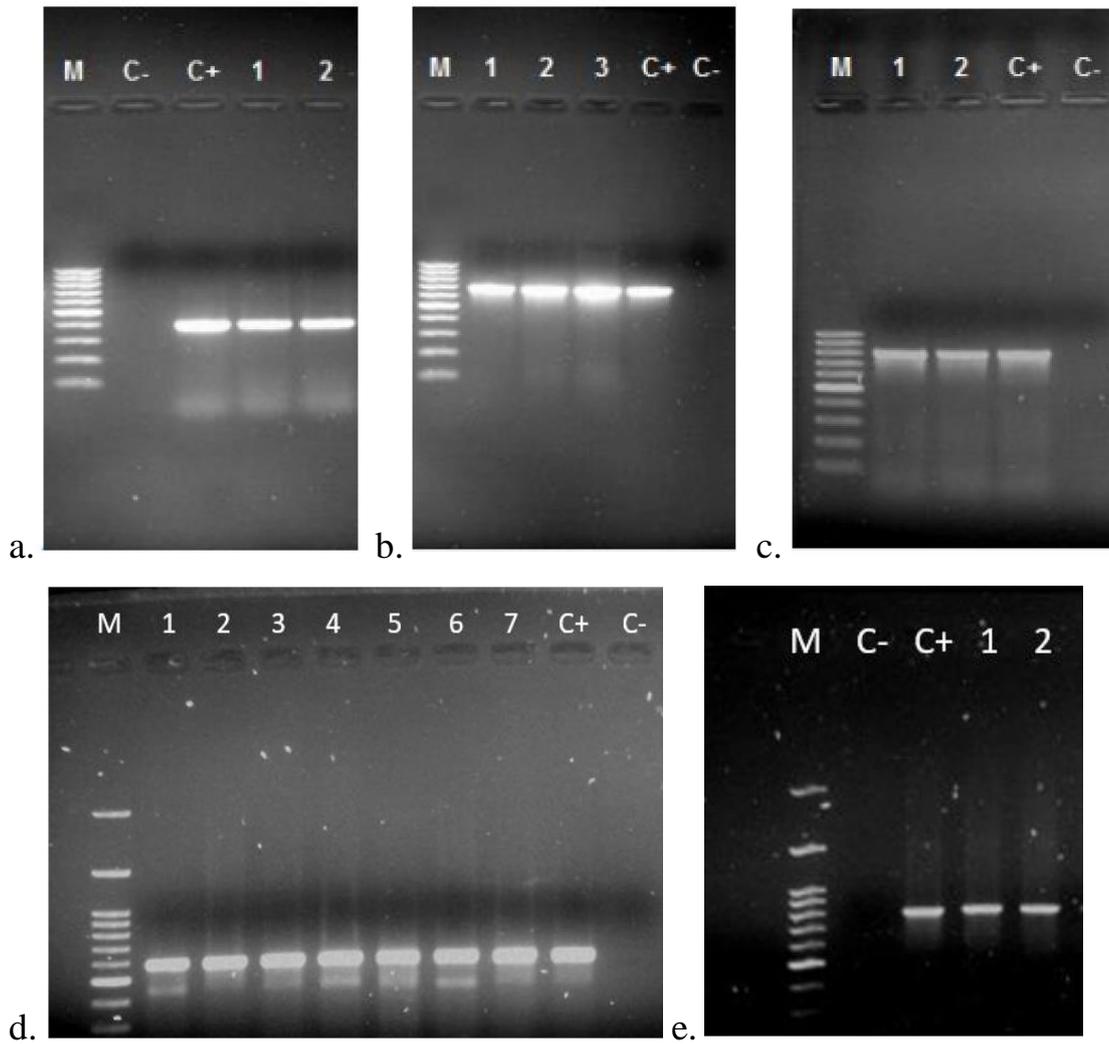
R: resistant I: intermediate, S: susceptible, C/A: ceftazidime-avibactam, C/T: ceftolozane-tazobactam.
 ESBL: extended-spectrum β -lactamase.

Figure 5. Susceptibility to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam compared to the other antimicrobials tested in the study.



ESBL: extended-spectrum β -lactamase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; CR: resistance to at least one carbapenem. Breakpoints used: CLSI breakpoints valid in each year.

Figure 6. Identification of the (a) *bla_{VIM}*, (b) *bla_{NDM-1}*, (c) *bla_{KPC}*, (d) *bla_{CTX-M}* and (e) *bla_{SHV}* genes by PCR.



(M) 100-bp molecular marker (Fermentas, Ontario, Canada); (1-7) clinical isolates; (C+) positive control; (C-) negative control.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo foram investigados o perfil fenotípico de sensibilidade à ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam e a ocorrência dos principais genes codificadores de carbapenemases e ESBL em BGN resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos provenientes de amostras clínicas de hospital privado do sul da Brasil. Nossas conclusões obtidas foram:

- O antimicrobiano ceftazidima-avibactam demonstrou atividade *in vitro* satisfatória para uma grande variedade de microrganismos, destacando-se *Enterobacterales* - ESBL e *K. pneumoniae* - CR (100%), assim como *K. pneumoniae* - KPC (93,3%) e *P. aeruginosa* - CR (92,3%). Este agente não foi ativo contra isolados produtores de metalo- β -lactamases e inibiu dois dos três isolados selecionados pertencentes ao grupo CESP - CR.

- Os menores valores de CIM encontrados para ceftazidima-avibactam foram referentes à *Enterobacterales* - ESBL (CIM 50/90 = $<1/1$ $\mu\text{g/mL}$). Na sequência, *K. pneumoniae* - KPC (CIM 50/90 = $1/2$ $\mu\text{g/mL}$), *K. pneumoniae* - CR (CIM 50/90 = $2/4$ $\mu\text{g/mL}$) e *P. aeruginosa* - CR (CIM 50/90 = $3/8$ $\mu\text{g/mL}$). Os maiores valores de CIM foram obtidos para *K. pneumoniae* - M β L (CIM 50/90 = $>256/>256$ $\mu\text{g/mL}$) e grupo CESP - CR (CIM 50/90 = $4/12$) $\mu\text{g/mL}$.

- O antimicrobiano ceftolozana-tazobactam demonstrou ser ativo contra isolados de *P. aeruginosa* - CR (87,2%) e *Enterobacterales* - ESBL (97,3% segundo o CLSI e 83,8% - BRCAS). Entretanto, mostrou baixa atividade contra *K. pneumoniae* - KPC (13,3%) e *K. pneumoniae* - CR (33,3%) e inatividade contra todos os isolados produtores de metalo- β -lactamases e pertencentes ao grupo CESP - CR.

- Os menores valores de CIM encontrados para ceftolozana-tazobactam foram referentes à *Enterobacterales* - ESBL (CIM 50/90 = $<1/2$ $\mu\text{g/mL}$) e *P. aeruginosa* - CR (CIM 50/90 = $2/6$ $\mu\text{g/mL}$). Os maiores valores de CIM foram obtidos para *K. pneumoniae* - M β L e grupo

CESP – CR (CIM 50/90 = >256/>256 µg/mL). Na sequência, *K. pneumoniae* – KPC (CIM 50/90 = 24/>256 µg/mL) e *K. pneumoniae* - CR (CIM 50/90 = 24/48 µg/mL).

- Perante o grupo *K. pneumoniae* – KPC, ceftazidima-avibactam, polimixina B, colistina, amicacina (93,3%) e gentamicina (86,7%) foram os agentes mais ativos. Os antimicrobianos com maior prevalência de resistência foram ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefepime, ceftriaxona, imipenem, ertapenem, meropenem e piperacilina-tazobactam (100%), ciprofloxacino (93,3%) e ceftolozana-tazobactam (80%).

- Os antimicrobianos mais efetivos quando testados para o grupo *P. aeruginosa* - CR foram polimixina B, colistina e ceftazidima-avibactam (92,3%), ceftolozana-tazobactam (87,2%) e amicacina (71,8%). Gentamicina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, aztreonam, ciprofloxacino, cefepime, meropenem e imipenem apresentaram taxas de sensibilidade inferiores a 60%.

- Em relação à *Enterobacterales* - ESBL os antimicrobianos ceftazidima-avibactam, ceftolozana-tazobactam, amicacina e gentamicina resultaram em 100% de sensibilidade. Na sequência, as maiores sensibilidades foram detectadas perante ertapenem e colistina (97,3%), imipenem (94,6%), meropenem (91,9%) e piperacilina-tazobactam (83,8%).

- Os isolados pertencentes ao grupo CESP - CR apresentaram sensibilidade apenas aos antimicrobianos polimixina B e amicacina (100%), ceftazidima-avibactam, ciprofloxacino e gentamicina (66,7%). Todos foram resistentes à ceftolozana-tazobactam, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem e piperacilina-tazobactam.

- Quanto aos isolados *K. pneumoniae* – MβL observou-se que houve maior sensibilidade aos antimicrobianos polimixina B e colistina (100%) e amicacina (75%), sendo resistentes à ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam.

- O perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos testados para *K. pneumoniae* – CR demonstrou sensibilidade para polimixina B, colistina, amicacina e ceftazidima-avibactam.

- A maioria dos isolados foi positiva para um ou mais genes de resistência investigados (78,6%). Todos os isolados testados resultaram negativos para *bla*_{SPM-1} e *bla*_{OXA-48-like} e *bla*_{IMP}.

- O gene *bla*_{CTX-M} foi o mais frequente identificado em isolados produtores de ESBL (>96%) e a positividade para *bla*_{SHV} variou entre 63% e 100% de acordo com a espécie bacteriana.

- O gene *bla*_{KPC} foi identificado em todos os isolados de *K. pneumoniae* com triagem fenotípica positiva para KPC e em dois isolados de *P. aeruginosa* – CR. Um isolado de *P. aeruginosa* – CR apresentou amplificação para *bla*_{VIM}, enquanto três isolados de *K. pneumoniae* – MβL e um isolado de *K. pneumoniae* – CR foram positivos para *bla*_{NDM-1}.

- A coexistência de genes foi identificada em 44 (44,9%) isolados. A maioria dos isolados (29/39;74,3%) que apresentaram fenótipos de resistência à ceftazidima-avibactam e à ceftolozana-tazobactam apresentavam concomitância de dois ou mais genes codificantes de β-lactamases.

- Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC} foram os mais frequentes nos isolados resistentes à ceftolozana-tazobactam, enquanto *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{NDM-1} nos resistentes à ceftazidima-avibactam.

REFERÊNCIAS

ALATOOM, A.; ELSAYED, H.; LAWLOR, K. *et al.* Comparison of antimicrobial activity between ceftolozane – tazobactam and ceftazidime – avibactam against multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 39–43, 2017.

ALEXOPOULOS, EC.; BATZI, E.; MESSOLORA, F.; JELASTOPULU, E. Wide range of point prevalence of healthcare associated infections in Western Greece. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 11, p. 1734-9, 2011.

ALSAEED, A., BLONDEAU, J. M. Antibiotic resistance in hospitals. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 303–307, 2015.

ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016, dezembro 2017.

ANVISA. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, v. 4, p. 1–122, 2017a.

ANVISA. Nota Técnica nº 01/2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes, 2013.

ANVISA. Nota Técnica nº 01/2014. Vigilância e monitoramento das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (RM) em serviços de saúde, 2014.

ANVISA. Parecer público de avaliação de medicamento-aprovação, 2018.

ANVISA. Plano de ação da vigilância sanitária em resistência aos antimicrobianos, p. 1–50, 2017b.

ANVISA. Portaria nº 2616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Maio, 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616-98.htm>. Acesso em: 20 de março de 2020.

ANVISA. Resistência microbiana: Mecanismos e impacto clínico. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/bibliografia.htm. Acesso em: 21 de março de 2020.

ANVISA. Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde: medidas de prevenção de infecção relacionada à assistência à saúde, 2013.

BARATTO, C.M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.

BASSETTI, M; LABATE, L; RUSSO, C. *et al.* Therapeutic options for difficult-to-treat *Acinetobacter baumannii* infections: a 2020 perspective. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 22, n. 2, p. 167-177, 2021.

BATCHELOR, M.; HOPKINS, K.; THREFALL, E.J. *et al.* blaCTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1319–1322, 2005.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Parecer público de avaliação de medicamento-aprovação, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única, 2018-2022, 2018.

BRCASST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. Julho, 2017.

BUEHRLE, D.J.; SHIELDS, R. K.; CHEN, L. *et al.* Evaluation of the in vitro activity of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam against meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n.5, p. 3227–3231, 2016.

CARVALHÃES, C.G.; CASTANHEIRA, M.; SADER, H.S. *et al.* Antimicrobial activity of ceftolozane–tazobactam tested against gram-negative contemporary (2015–2017) isolates from hospitalized patients with pneumonia in US medical centers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 94, p. 92-102, 2019.

CASSINI, A.; PLACHOURAS, D.; ECKMANN, T. *et al.* Burden of six healthcare-associated infections on European population health: Estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study. **PLOS Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1– 60, 2016.

CASTANHEIRA, M.; DOYLE, T.B.; MENDES, R.E.; SADER, H.S. Comparative activities of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam against *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum-lactamases from U.S. hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n.7, 2019.

CDC. Antibiotic resistance threats. **Centers for Disease Control and Prevention.**, p. 22–50, 2013.

CDC. Healthcare-Associated Infections (HAI) progress report. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2016.

CHIU, S. K.; MA, L.; CHAN, M.C. *et al.* Carbapenem nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: Dissemination and increasing resistance of carbapenemase producers during 2012-2015. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th ed. CLSI supplement M100S-28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th ed. CLSI supplement M100S-28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLUCK, D.; LEWIS, P.; STAYER, B.; SPIVEY, J.; MOORMAN, J. Ceftolozane–tazobactam: A new-generation cephalosporin. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 72, 2015.

- COSTA, M.; RODRIGUES, G.M.C.; REZENDE JÚNIOR, A.A.; CARDOSO, F.M.N. The main microorganisms responsible for the Healthcare Associated Infections (HAIs) in intensive care units: an integrative review. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 8, n.1, 2019.
- CUI, X.; SHAN, B.; ZHANG, X. *et al.* Reduced ceftazidime-avibactam susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from patients without ceftazidime-avibactam use history – A multicenter study in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- DAEHRE, K.; PROIAHN, M.; SEMMLER, T.; ROESLER, U.; FRIESE, A. Extended-spectrum beta-lactamase/AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in broiler farms: Transmission dynamics at farm level. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 4, p. 511–518, 2018.
- DANDACHI, I.; CHADDAD, A.; HANNA, J.; MATTA, J.; DAOUD, Z. Understanding the epidemiology of multi-drug resistant gram-negative bacilli in the middle east using a One Health approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- DAVIS, M. F.; RANKIN, S.C.; SCHURER, J.M. *et al.* Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (COHERE). **One Health**, v. 4, p. 14–21, 2017.
- DEPTULA, A.; TREINOWSKA, E.; DUBIEL, G. *et al.* Prevalence of healthcare-associated infections in Polish adult intensive care units: summary data from the ECDC European point prevalence survey of hospital-associated infections and antimicrobial use in Poland 2012–2014. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 2, p. 145–150, 2016.
- DIAS, C.H; SILVA, D.M.W; BURGER, M. *et al.* Active surveillance of carbapenem-resistant Gram-negative healthcare-associated infections in a low-middle-income country city. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, 2021.
- DU, D.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A. *et al.* Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018.
- DUIN, D. VAN; BONOMO, R. A. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: Second-generation β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, p. 234–241, 2016.

ECDC. Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **European Centre for Disease Prevention and Control**, Stockholm, 2016.

EDEN, P.A.; SCHMIDT, T.M.; BLAKEMORE, R.P.; PACE, N.R. Phylogenetic analysis of *aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 2, p. 234-325, 1991.

ELLINGTON, M.J; Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 321-322, 2007.

ESTABROOK, M.; BUSSEL, B.; CLUGSTON, S.L. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam as determined by broth dilution and agar diffusion assays against recent U.S. *Escherichia coli* isolates from 2010 to 2011 carrying CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4049-52, 2014.

EVANS, S.R.; TRAN, T.T.; HUJER, A.M. *et al.* Rapid molecular diagnostics to inform empiric use of ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n.11, p. 1823–1830, 2019.

FENG, Y. Transferability of MCR-1/2 Polymyxin resistance: Complex dissemination and genetic mechanism. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 291–300, 2018.

FLAMM, R.K.; NICHOLS, W.W.; SADER, H.S.; FARREL, D.J.; JONES, R.N. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against gram-negative pathogens isolated from pneumonia in hospitalised patients, including ventilated patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, p. 235-42, 2016.

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

GANDRA, S.; TRETT, A.; KLEIN, E.Y.; LAXMINARAYAN, R. Is antimicrobial resistance a bigger problem in tertiary care hospitals than in small community hospitals in the United States? **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 5, p. 860-863, 2017.

GALANI, I.; KARAIKOS, I.; ANGELIDIS, E. *et al.* Emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* of

sequence type 39 during treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, p. 219-224, 2021.

GARCÍA, J.; NASTRO, M.; CEJAS, D. *et al.* Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-8 producing *Klebsiella pneumoniae* in South America. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 9, p. 1264-1265, 2020.

GARCÍA-BETANCUR, J.C.; APPEL, T.M.; ESPARZA, G. *et al.* Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 2, 2020.

GARCIA-FERNANDEZ, S.; GARCÍA-CASTILHO, M.; MELO-CRISTINO, J. *et al.* In vitro activity of ceftolozane-tazobactam against *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* causing urinary, intra-abdominal and lower respiratory tract infections in intensive care units in Portugal: the STEP multicentre study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 3, 2019.

GHANAVATI, R.; DARBAN-SAROKHALIL, D.; NAVAB-MOGHADAM, F. *et al.* First report of coexistence of AmpC beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from burn patients. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 64, n. 4, p. 455–462, 2017.

GHERARDI, G.; LINARDOS, G.; POMPILIO, A. *et al.* Evaluation of in vitro activity of ceftolozane-tazobactam compared to other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 94, p. 297–303, 2019.

GOMEZ, H. C.; BLANCO, V.M.; MOTOA, G. *et al.* Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos gram-negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. **Biomédica**, v. 34, n. 1, p. 91-100, 2014.

GÓMEZ-JUNYENT, J.; BENAVENT. E.; SIERRA, Y. *et al.* Efficacy of ceftolozane/tazobactam, alone and in combination with colistin, against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* biofilm pharmacodynamic model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 612–619, 2019.

GOTTIG, S.; FRANK, D.; MUNGO, E. *et al.* Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 11, p. 3211-3216, 2019.

GUTIÉRREZ, M.; FANDIÑO, C. Cost-effectiveness of ceftazidime/avibactam versus colistin + meropenem for treatment of carbapenem-resistant enterobacteria infections in Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 38, n.1, p. 7-14, 2021.

HAGEMANN, J.B.; PFENNIGWERTH, N.; GATERMANN, S.G.; VON BAUM, H., ESSIG, A. KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018.

HAKEM, A.; ALASAHLI, H.; ALBABTAIN, L. *et al.* Effectiveness of ceftazidime-avibactam versus colistin in treating carbapenem-resistant enterobacteriaceae bacteremia. **International Journal of Infectious Diseases**, 2021.

JONGE, B.L.M.; KARLOWSKY, J. A.; KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3163–3169, 2016.

KARAM, G.; CHASTRE, J.; WILCOX, M.H.; VINCENT, J.L. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2016.

KARLOWSKY, J.A.; KAZMIERCZAK, K.M.; YOUNG, K. *et al.* In vitro activity of ceftolozane/tazobactam against phenotypically defined extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-positive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients (SMART 2016). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96, n. 4, 2019.

KNUDSEN, P. K.; GAMMELSRUD K.W.; ALFSNES, K. *et al.* Transfer of a blaCTX-M-1-carrying plasmid between different *Escherichia coli* strains within the human gut explored by whole genome sequencing analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

KOBS, V. C.; FERREIRA, J.A.; BOBROWICZ, T.A. *et al.* The role of the genetic elements bla_{oxa} and ISAbal in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in

carbapenem resistance in the hospital setting. **Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 49, p. 433-440, 2016.

KRISHNAN, P.; NGUYEN, N.Q.; PAPP-WALLACE, K.M. *et al.* Inhibition of *Klebsiella* β -lactamases (shv-1 and kpc-2) by avibactam: A structural study. **Plos One**, 2015.

KUO, S.C.; LIU, C.E.; CHEN, Y.S. *et al.* Activity of ceftolozane-tazobactam against gram-negative pathogens isolated from lower respiratory tract infections in the Asia-Pacific region: SMART 2015-2016. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n.3, 2020.

LABARCA, J. A; *et al.* Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 276–292, 2016.

LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; KARLOWSKY, J. A. Ceftazidime – avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of gram-negative bacterial infections. **Core evidence**, p. 13–25, 2014.

LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, K.S. *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–30, 2016.

LIAO, CH.; LEE, N.Y.; TANG, H.J. *et al.* Antimicrobial activities of ceftazidime–avibactam, ceftolozane-tazobactam, and other agents against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from intensive care units in Taiwan: results from the surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan in 2016. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 545–552, 2019.

LIVERMORE, D.M.; WARNER, M.; JAMROZY, D. *et al.* In vitro selection of ceftazidime-avibactam resistance in *Enterobacteriaceae* with KPC-3 carbapenemase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5324–5330, 2015.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A.T. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

MACHEBOEUF, P.; CONTRERAS-MARTEL, C.; JOB, V.; DIDEBERG, O.; DESSEN, A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.30, p. 673–691, 2006.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MALEKI, A.; KHOSRAVI, A.; GHAFOURIAN, S. *et al.* High prevalence of AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* in Ilam, Iran. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 6, n. 3, p. 201–204, 2015.

MELO, L.C.; ORESCO, C.; LEIGUE, L. *et al.* Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 221, p. 59–66, 2018.

MENDES, R. E; *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

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

NICHOLS, W.W.; JONGE, B.L.; KAZMIERCZAK, K.M. *et al.* In vitro susceptibility of global surveillance isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime-avibactam (INFORM 2012 to 2014). **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 60, p. 4743-9, 2016.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on antimicrobial resistance**, 2016.

OLESEN, I.; HASMAN, H.; MØLLER AARESTRUP, F. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 4, p. 334 – 340, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; PAULA, A.O.; IQUIAPAZA, R. A.; LACERDA, A.C.S. Healthcare associated infections and severity of illness index of patients in intensive care units. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 89-96, 2012.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S.; DÍAZ, M.E.P.; IQUIAPAZA, R.A. Bacterial resistance and mortality in an intensive care Unit. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 2010.

OLIVEIRA, D.M.P; FORDE, B.M; KIDD, T.J. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n.3, 2020.

PFALLER, M.A.; SHORTRIDGE, D.; SADER, H.S.; GALES, A. *et al.* Ceftolozane-tazobactam activity against drug-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* causing healthcare-associated infections in Latin America: report from an antimicrobial surveillance program (2013–2015). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 627–637, 2017.

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

PILLONETTO, M.; JORDÃO, R.T.S.; ANDRAUS, G.S. *et al.* The experience of implementing a national antimicrobial resistance surveillance system in Brazil. **Frontiers in Public Health**, v. 8, 2021.

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

POIREL, L.; VUILLEMIN, X.; JUHAS, M. *et al.* KPC-50 Confers resistance to ceftazidime-avibactam associated with reduced carbapenemase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, 2020.

PROBAC DO BRASIL. Policimbac – Bula do Produto. Disponível em: <http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/POLICIMBAC%20Rev%2004.pdf>. Acesso em: 10 de agosto de 2020.

PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Ceftolozane, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=CEFTOLOZANE>. Acesso em 02 de setembro de 2020 (c).

PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Tazobactam, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Tazobactam>. Acesso em 02 de setembro de 2020 (d).

PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Ceftazidime, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ceftazidime>. Acesso em 02 de setembro de 2020 (a).

PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Avibactam, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Avibactam>. Acesso em 02 de setembro de 2020 (b).

RAFEI, R.; HAMZE, M.; PAILHORIES, H. *et al.* Extra human epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 2359–2367, 2015.

ROBIN F.; AUZOU, M.; BONNET, R. *et al.* In vitro activity of ceftolozane-tazobactam against *Enterobacter cloacae* complex clinical isolates with different -lactam resistance phenotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, 2018.

ROSSI, F.; CURY, A. P.; FRANCO, M. R.G.; TESTA, R.; NICHOLS, W.W. The in vitro activity of ceftazidime–avibactam against 417 Gram-negative bacilli collected in 2014 and 2015 at a teaching hospital in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 569–573, 2017.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; CANTÓN, R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. **Revista Espanola de Quimioterapia**, V. 30, N.1, P. 8-12, 2017.

SAH, B.S.; ARYAL, M.; BHARGAVA, D.; SIDDIQUE, A. Drug resistance pattern of bacterial pathogens of *Enterobacteriaceae* family. **Tribhuvan University Journal of Microbiology**, v. 4, n.1, 2017.

SCHAUMBURG, F.; BLETZ, S.; MELLMANN, A. *et al.* Analysis of the susceptibility to ceftazidime/avibactam in German MDR/XDR *Pseudomonas aeruginosa* comparing different methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2019.

SCHILLACI, D.; SPANO, V.; PARRINO, B. *et al.* Pharmaceutical approaches to target antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 8268-8297, 2017.

SEIFERT, H.; KÖRBER-IRRGANG, B.; KRESKEN, M. In-vitro activity of ceftolozane/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* isolates recovered from hospitalized patients in Germany. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n.2, p. 227-234, 2018.

SEKAR, R.; SRIVANI, S.; KALYANARAMAN, N. *et al.* NDM and other mechanisms of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in rural South India. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019.

SHAPIRO, A.B.; MOUSSA, S.H.; CARTER, N.M.; GAO, N.; MILLER, A.A. Ceftazidime-avibactam resistance mutations V240G, D179Y, and D179Y/T243M in KPC-3 β -Lactamase do not alter cefpodoxime–ETX1317 susceptibility. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 79-87, 2021.

SHIELDS, R.K.; POTOSKI, B.A.; HAIDAR, G. *et al.* Clinical outcomes, drug toxicity, and emergence of ceftazidime-avibactam resistance among patients treated for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n.12, p. 1615–1618, 2016.

SHIELDS, R.K.; CHEN, L.; CHENG, S. *et al.* Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne blaKPC-3 mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, 2017.

SHORTTRIDGE, D.; PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.; FLAMM, R.K. Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam tested against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* with various resistance patterns isolated in U.S. hospitals (2013–2016) as part of

the surveillance program: Program to assess ceftolozane-tazobactam susceptibility. **Microbial Drug Resistance**, 2018.

SOBOLEWSKA, B.; BUHL, M.; LIESE, J.; ZIEMSEN, F. Slit lamps and lenses: A potential source of nosocomial infections? **Eye (Basingstoke)**, v. 32, n. 6, p. 1021–1027, 2018.

SOUZA, E.S.; BELEI, R.A.; CARRILHO, C.M.D.M. *et al*; Mortality and risks related to healthcare-associated infection. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220-8, 2015.

SUN, J.; ZHANG, H.; LIU, YH.; FENG, T. Towards understanding MCR-like colistin resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 794–808, 2018.

TAVARES, L.C.B; VASONCELLOS, F.M; SOUSA, W.V. *et al*. Emergence and persistence of high-risk clones among MDR and XDR *A. baumannii* at a Brazilian Teaching Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n. 2848, 2019.

TORGENA. Bula para profissionais de saúde. **Pfizer**. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/bulas/torgena>. Acesso em 29 de março de 2020.

TRIMBLE, M.J.; MLYNARCIK, P.; KOLAR, M.; HANCOCK, R.E.W. Polymyxin: alternative mechanisms of action. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, p. 1–22, 2016.

TUON, F.F.; CIESLINSKI, J.; RODRIGUES, S.S.; SERRA, F.B.; DE PAULA, M.DN. Evaluation of in vitro activity of ceftolozane–tazobactam against recent clinical bacterial isolates from Brazil – the EM200 study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 96-103, 2020.

TUON, F.F.; ROCHA, J.L.; FORMIGONI-PINTO, M.R. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime–avibactam: a systematic review. **Springer**, 2017.

VAN BOECKEL, T.P.; GANDRA, S.; ASHOK, A. *et al*. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 742–750, 2014.

VAN DUIN, D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Virulence**, p. 1–10, 2016.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 11-15, 1995.

VULIN, C.; LEIMER, N.; HUEMER, M. *et al.* Prolonged lag time results in small colony variants and reflects a sub-population of persisters in vivo. **bioRxiv**, n. 2018, p. 279-968, 2018.

WANG, Y.; WANG, J.; WANG, R.; CAI, Y. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 18-27, 2020.

WATKINS, R.R.; BONOMO, R.A.; Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n.2, p. 313-322, 2016.

WEILL, F.X.; DEMARTIN, M.; TANDE, D. *et al.* SHV-12-like extended-spectrum-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* Serotypes babelsberg and enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2432–2437, 2004.

WHO. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. **World Health Organization**, Geneva, 2017.

WHO. One health. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>. **World Health Organization**, setembro, 2017. Acesso em 21 de março de 2020.

WILSON, W.R.; KLINE, E.G.; JONES, C.E. *et al.* Effects of KPC variant and porin genotype on the in vitro activity of meropenem-vaborbactam against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents Chemother**, vol. 63, n.3, 2019.

WOODFORD, N.; WAREHAM, D.W.; GUERRA, B.; TEALE, C. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *non-enterobacteriaceae* from animals and the environment: An emerging public health risk of our own making? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 287–291, 2014.

WU, C.; WANG, Y.; SHI, X. *et al.* Rapid rise of the ESBL and mcr-1 genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008-2014. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2018.

YEZLI, S.; SHIBL. A. M.; MEMISH, Z. A. The molecular basis of β -lactamase production in gram-negative bacteria from Saudi Arabia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 127–136, 2015.

ZASOWSKI, E. J.; RYBAK, J. M.; RYBAK, M. J. The β -lactams strike back: ceftazidime-avibactam. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 8, p. 755–770, 2016.

ZEHURI, M.O.M.; SLOB, E.M.G. Health audit: IRAS control, economy, hand hygiene and antimicrobial. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, vol.12, n.10, 2018.

ZERBAXA. Bula do medicamento. **Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.**, 2017.

ANEXOS

ANEXO I: Termo de Anuência SCIH



TERMO DE ANUÊNCIA

Srta. Thaisa Noceti Carvalho

Declaramos para os devidos fins que nós do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) da Associação Beneficente Evangélica de Joinville – Hospital Dona Helena, sob CNPJ nº 84694405/0001-67, localizado em Joinville/SC, estamos de acordo com a execução do projeto de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, intitulado “Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de ceftazidima-avibactam e polimixina em bacilos gram negativos multirresistentes”, sob a coordenação e a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, do Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE. Serão analisados laboratorialmente apenas isolados bacterianos, destacando-se que nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa terá qualquer impacto aos pacientes fornecedores das amostras no período de condução do estudo, não influenciando a conduta clínica e o prognóstico.

Joinville, 11 de julho de 2019.



Dr. Luiz Henrique Melo
SCIH



ANEXO II: Termo de Anuência Laboratório de Análises Clínicas

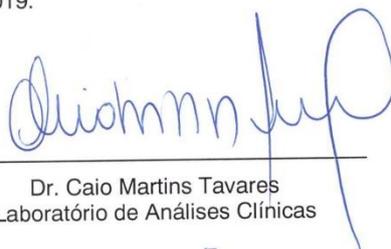


TERMO DE ANUÊNCIA

Srta. Thaisa Noceti Carvalho

Declaramos para os devidos fins que nós do Laboratório de Análises Clínicas da Associação Beneficente Evangélica de Joinville – Hospital Dona Helena, sob CNPJ nº 84694405/0001-67, localizado em Joinville/SC, estamos de acordo com a execução do projeto de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, intitulado “Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de ceftazidima-avibactam e polimixina em bacilos gram negativos multirresistentes”, sob a coordenação e a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, do Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE. Serão analisados laboratorialmente apenas isolados bacterianos, destacando-se que nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa terá qualquer impacto aos pacientes fornecedores das amostras no período de condução do estudo, não influenciando a conduta clínica e o prognóstico.

Joinville, 11 de julho de 2019.



Dr. Caio Martins Tavares
Laboratório de Análises Clínicas



ANEXO III: Termo de Anuência Direção HDH



TERMO DE ANUÊNCIA

Srta. Thaisa Noceti Carvalho

Declaramos para os devidos fins que nós da Associação Beneficente Evangélica de Joinville – Hospital Dona Helena, sob CNPJ nº 84694405/0001-67, localizado em Joinville/SC, estamos de acordo com a execução do projeto de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, intitulado “Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de ceftazidima-avibactam e polimixina em bacilos gram negativos multirresistentes”, sob a coordenação e a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, do Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE. Serão analisados laboratorialmente apenas isolados bacterianos, destacando-se que nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa terá qualquer impacto aos pacientes fornecedores das amostras no período de condução do estudo, não influenciando a conduta clínica e o prognóstico.

Joinville, 11 de julho de 2019.


Associação Beneficente Evangélica de Joinville
Hospital Dona Helena
Dr. Bráulio César da Rocha Barbosa
Diretor Técnico



ANEXO IV

JAC-2021-1938: Thank you for your manuscript submission

1 mensagem

Journal of Antimicrobial Chemotherapy <onbehalf@manuscriptcentral.com>

19 de dezembro de 2021 22:18

Responder a: jac@bsac.org.uk

Para: thaisanoceti@gmail.com

Cc: thaisanoceti@gmail.com, kobsvanessa@gmail.com, danielahile9@gmail.com, roseneide.campos@gmail.com, lhmel@me.com, phfranca@terra.com.br, bvd@alternex.com.br

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

19-Dec-2021

Manuscript ID: JAC-2021-1938

Title: Evaluation of the in vitro susceptibility of β -lactam-resistant Gram-negative bacilli to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam

Author(s): CARVALHO, THAISA; Kobs, Vanessa; Hile, Daniela; Deglmann, Roseneide; Melo, Luiz; França, Paulo

Dear Mrs CARVALHO,

We acknowledge receipt of your manuscript. If you should need to contact the Editorial Office please quote the manuscript ID number.

You can track the progress of your manuscript by visiting your Author Centre on the JAC ScholarOne Manuscripts website (<https://mc.manuscriptcentral.com/jac>). For an explanation of the JAC editorial process please see the 'Instructions to Authors' (published online at https://academic.oup.com/jac/pages/General_Instructions).

Signed Submission Forms: IMPORTANT INFORMATION

PLEASE DO NOT SEND A SIGNED SUBMISSION FORM NOW.

If your article is accepted, we will generate an article-specific signed submission form template, which will be sent to you to sign on behalf of all the authors.

Please note that we will delay the ultimate publication of an article until we have received your signed submission form.

Yours sincerely

JAC Editorial Office

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 20/12/2021.

1. Identificação do material bibliográfico: () Tese (x) Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: THAISA NOCETI CARVALHO

Orientador: PROF. DR. PAULO HENRIQUE CONDEIXA DE FRANÇA Coorientador:
NÃO POSSUI

Data de Defesa: 03/05/2021

Título: **AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* À CEFTAZIDIMA-
AVIBACTAM E CEFTOLOZANA-TAZOBACTAM DE BACILOS GRAM-
NEGATIVOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS**

Instituição de Defesa: Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE)

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.



Assinatura do autor

Joinville, 20 de dezembro de 2021

Local/ Data