



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SERGIO AROUCA – CDEAD/FIOCRUZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

LUCIANA LEMES ZAMALLOA CABRAL

IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DA CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM ASSOCIADO A AZTREONAM CONTRA ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORA DE METALO- β -LACTAMASE

Rio de Janeiro
2020

LUCIANA LEMES ZAMALLOA CABRAL

IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DA CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM ASSOCIADO A AZTREONAM CONTRA ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORA DE METALO- β -LACTAMASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – EAD/ ENSP/FIOCRUZ como requisito parcial no Curso de Especialização Gestão em Saúde.

Orientador (a): MÁRCIA CRISTINA CID ARAÚJO

Rio de Janeiro

2020

LUCIANA LEMES ZAMALLOA CABRAL

IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DA CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM ASSOCIADO A AZTREONAM CONTRA ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORA DE METALO- β -LACTAMASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – EAD/ ENSP/FIOCRUZ como requisito parcial no Curso de Especialização Gestão em Saúde.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

MÁRCIA CRISTINA CID ARAÚJO, FIOCRUZ

Nome, Instituição

MOACYR TORRES JÚNIOR, FIOCRUZ

Nome, Instituição

MÔNICA LOUREIRO SARTORIO, Odontoclínica Central da Marinha - OCM

Nome, Instituição

*Dedico este trabalho a todos os pacientes internados do Hospital Naval Marcílio Dias que
confiam suas vidas a nós, profissionais da saúde.*

AGRADECIMENTOS

Apresento minha eterna gratidão a todos que contribuíram para a conclusão desta monografia.

À minha equipe de farmacêuticas e técnicos de patologia clínica da Subseção de Microbiologia, CT (RM2-S) Camila Formoso, 1T (S) Liliane Cristine Martins, 1T (RM2-S) Thalita Dallapícula, 2°SG Tatiane Perez, 3° SG Thainá, 3° SG João Ricardo, CB Danielle Barreto, CB Danielle Resende, CB Bárbara Sena, CB Maria e CB Bárbara Santos, que me auxiliaram na execução técnica da implantação da nova metodologia. Equipe ímpar, a quem confio minha responsabilidade como encarregada do setor, na certeza do comprometimento que têm com a Subseção de Microbiologia.

Às minhas amigas CC (S) Patrícia de Penteadó Fava e CF (S) Deise Cristina Wagner, por todas as orientações que me permitiram seguir com tranquilidade e serenidade durante todo o curso.

Aos amigos da turma do CSM-2 2003 e, agora, Csup-2020, por toda ajuda e sugestões que me permitiram concluir as tarefas dessa jornada. Vocês foram preciosos nessa caminhada e sou eternamente grata a cada um de vocês.

Enfim, agradeço à Deus, por me permitir seguir firme e confiante, mesmo diante dos obstáculos inesperados que por vezes me fizeram desacreditar que seria capaz de chegar ao final dessa caminhada.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”

(John Kennedy)

RESUMO

A emergência da resistência bacteriana foi classificada, pela Organização Mundial de Saúde, como uma das três principais ameaças à saúde pública do século XXI, podendo causar 300 milhões de mortes prematuras até 2050. Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo metalo β -Lactamase (MBL) apresentam perfil de multirresistência e/ou pan-resistência não respondendo, nem mesmo, às drogas mais potentes comercialmente disponíveis. Este trabalho valida a técnica de sobreposição de tiras de E-test para a determinação, *in vitro*, da concentração mínima inibitória (CIM) de Ceftazidima/Avibactam e Aztreonam em associação, avaliando a potencial eficácia como opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias produtoras de MBL. Dos 31 isolados de Enterobactérias produtoras de MBL do tipo NDM, testados neste trabalho, 100% apresentaram sensibilidade frente a associação de Ceftazidima/Avibactam mais Aztreonam, conforme pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST 2020. As CIMs obtidas com a associação foram 16.000 e 2.700 vezes menores para Ceftazidima/Avibactam e Aztreonam, respectivamente, comparando às CIMs obtidas quando as mesmas drogas foram testadas isoladamente. O presente trabalho demonstrou que o potencial sinérgico, *in vitro*, proveniente da associação de Ceftazidima/Avibactam e Aztreonam, pode ser uma excelente opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias multirresistentes ou pan-resistentes, produtoras de MBL e, confirmou a validação da técnica de sobreposição de tiras de E-test como uma metodologia simples e de baixo custo a ser utilizada, em complemento à técnica convencional de automação, para a determinação da CIM de Ceftazidima/Avibactam e Aztreonam em associação.

Palavras-chave: Ceftazidima/Avibactam; Aztreonam; Carbapenemase; Metalo β -Lactamase; Resistência Bacteriana; Enterobactérias.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------|--|
| AmpC | Amp Cefalosporinase |
| ATM | Aztreonam |
| AVI | Avibactam |
| BGN | Bacilos Gram Negativos |
| CAZ | Ceftazidima |
| CAZ-AVI | Ceftazidima/Avibactam |
| CCIH | Comissão de Controle de Infecção Hospitalar |
| CRE | Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos |
| e-CIM | EDTA Método Modificado de Inativação de Carbapenêmicos |
| EGN | Escola de Guerra Naval |
| ESBL | β -Lactamase de Espectro Estendido |
| E-test | Teste Epsilométrico |
| GES | Guiana Espectro Estendido |
| HNMD | Hospital Naval Marcílio Dias |
| IMI | Enzima de Hidrólise de Imipenem |
| IMP | Imipenemase |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase |
| MBL | Metalo β -Lactamase |
| m-CIM | Método Modificado de Inativação de Carbapenêmicos |
| MDR | Multirresistente |
| MIC | Concentração Mínima Inibitória |
| MGE | Elemento Genético Móvel |
| NDM | New Delhi MBL |
| NMC | Não Metalo Enzima Carbapenemase |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OXA | Oxacilinase |
| SME | Enzima <i>Serratia marcescens</i> |
| SSM | Sistema de Saúde da Marinha |
| TSA | Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos |
| VIM | Verona MBL Codificada em Integrons |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 Objetivos..... | 12 |
| 1.1.1 Objetivo Geral..... | 12 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos..... | 13 |
| 1.2 Justificativa..... | 13 |
| 1.3 Metodologia..... | 14 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1 A Emergência da Resistência Bacteriana..... | 16 |
| 2.2 Mecanismos de Resistência Bacteriana..... | 16 |
| 2.3 Opções Terapêuticas..... | 20 |
| 3 O PROJETO DE INTERVENÇÃO | 21 |
| 3.1 Descrição da Situação Problema..... | 21 |
| 3.2 Explicação da Situação Problema..... | 22 |
| 3.3 Programa de Ações..... | 24 |
| 3.4 Gestão do Projeto..... | 30 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 31 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |
| APÊNDICE | 36 |

1. INTRODUÇÃO

A emergência de resistência entre os mais importantes patógenos bacterianos é reconhecida como uma grande ameaça para a saúde pública. Organismos multidrogas resistentes têm surgido, não somente no ambiente hospitalar, mas também na comunidade sugerindo que reservatórios de bactérias resistentes à antibióticos estão presentes fora do hospital. A resposta bacteriana ao “ataque do antibiótico” é o principal exemplo de adaptação bacteriana e o auge da evolução. A sobrevivência desses microrganismos é a consequência de uma imensa plasticidade genética de patógenos bacterianos que geram respostas específicas, resultando em adaptações mutacionais, aquisição de material genético ou alteração da expressão gênica, produzindo resistência a todos os antibióticos atualmente disponíveis na prática clínica (MUNITA *et al.*, 2016; LOGAN *et al.*, 2017).

A descoberta, comercialização e administração rotineira de compostos antimicrobianos para o tratamento de infecções, revolucionaram a medicina moderna e mudaram o paradigma terapêutico. Infelizmente, o aumento acentuado da resistência entre os patógenos bacterianos comuns está ameaçando essa realização terapêutica, prejudicando os resultados bem sucedidos de pacientes em estado crítico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a resistência aos antibióticos como uma das três ameaças à saúde pública mais importantes do século XXI (WHO, 2014; MUNITA *et al.*, 2016).

A resistência de bacilos Gram negativos (BGN) frente aos carbapenêmicos têm sido, cada vez mais, relatada em todo o mundo. Na família das *Enterobacteriaceae*, a resistência aos carbapenêmicos é mediada, principalmente, pela produção de carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler (na maioria das vezes do tipo KPC), classe B de Ambler (mais comumente dos tipos NDM, VIM e IMP) e, classe D de Ambler (OXA-48 *like*). As bactérias produtoras de carbapenemase constituem grande ameaça pois podem conferir resistência a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos. Cepas produtoras de carbapenemase estão frequentemente associadas à mecanismos adicionais de resistência como por exemplo, produção de enzimas β -Lactamases de espectro estendido (ESBLs), enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, mutações envolvidas com a resistência à fluorquinolonas, hiper expressão da bomba de efluxo, alterações na permeabilidade da membrana e hiper

expressão de genes codificadores de cefalosporinases (EMERAUD *et al.*, 2019). A associação desses mecanismos impede o uso clínico da maioria dos antibióticos disponíveis, sendo causa de elevada morbidade e mortalidade (GISKE *et al.*, 2017).

Portanto, compreender a base bioquímica e genética da resistência é de suma importância para elaborar estratégias a fim de reduzir o desenvolvimento e a disseminação da resistência e, estabelecer abordagens terapêuticas inovadoras contra bactérias multirresistentes (MDR) (MUNITA *et al.*, 2016).

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) é a única ferramenta laboratorial que orienta o clínico quanto a terapêutica mais assertiva para o tratamento das infecções bacterianas. TSA evidenciando perfil de multirresistência e/ou pan-resistência, tem-se mostrado cada vez mais frequente tornando a abordagem terapêutica cada dia mais desafiadora, impactando diretamente no sucesso do tratamento do paciente e nos custos de hospitalização.

O presente trabalho está sendo desenvolvido na Subseção de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD), unidade de assistência terciária do Sistema de Saúde da Marinha (SSM), localizado na cidade do Rio de Janeiro, com o objetivo de liberar laudos de TSA com opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de carbapenemase do tipo metalo- β -Lactamase (MBL), por meio da validação e implementação da metodologia de sobreposição de tiras de testes epsilométricos (E-test) que permite a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) da Ceftazidima/Avibactam (CAZ-AVI) e Aztreonam (ATM) em associação.

Na Subseção de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do HNMD, o TSA é realizado por método convencional automatizado utilizando o Sistema BD Phoenix[®] que testa os antibióticos, comercialmente disponíveis, isoladamente, não sendo possível avaliar o sinergismo da associação de duas drogas. Portanto, a busca por uma metodologia que permita avaliar *in vitro* o sinergismo da associação de dois antibióticos, torna-se imprescindível para o sucesso do tratamento e melhoria da gestão hospitalar.

A proposta em questão foi avaliada como sendo de possível governabilidade por esta autora, que pretende subsidiar o corpo clínico do HNMD no tratamento das infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de carbapenemase do tipo MBL, através da gestão de recursos humanos e materiais. Desta forma, na qualidade de Encarregada da Subseção de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do HNMD,

esta autora é responsável pela gestão deste projeto de intervenção que valida e implementa uma nova metodologia para a determinação da CIM resultante da associação de CAZ-AVI e ATM em complemento a metodologia convencional, a ser testada contra Enterobactérias MDR produtoras de MBL, da qual espera-se uma avaliação positiva da ação sinérgica das drogas supracitadas, com valores de CIM inferiores ao ponto de corte estabelecido pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST 2020), caracterizando sensibilidade. O trabalho é fundamentado na metodologia de sobreposição de tiras de E-test proposto por Emeraud *et al.* (2019).

A simplicidade da metodologia de sobreposição de tiras de E-test permite que a técnica seja uma ferramenta útil na Subseção de Microbiologia, a fim de informar aos médicos sobre o potencial sinérgico dos antibióticos contra patógenos de difícil tratamento.

Este projeto fornecerá subsídios para a implantação de um novo regime de antibioticoterapia para o tratamento do paciente acometido por infecção causada por Enterobactérias MDR produtoras de MBL, conforme sugerido por Emeraud *et al.* (2019) e Marshall *et al.* (2017). Esta meta, que excede o território de atuação desta gestora, contará com a colaboração dos membros da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HNMD, a quem caberá a instituição do novo protocolo e avaliação, *in vivo*, da eficácia e segurança do novo regime proposto.

O trabalho é inédito no HNMD e projetado na gestão baseada em evidências. Proporcionará aprofundamento do conhecimento técnico-científico de seus profissionais e conseqüentemente, elementos para o aprimoramento dos procedimentos aplicados com mudança de protocolos e alteração da rotina laboratorial e hospitalar.

A presente monografia é requisito para conclusão do curso de Especialização em Gestão em Saúde da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ) em parceria com a Escola de Guerra Naval (EGN). Organiza-se em introdução, abordando os objetivos e a justificativa, referencial teórico, que contempla dados bibliográficos sobre o assunto em questão, metodologia, projeto de intervenção com a descrição da situação-problema, programação das ações, a matriz de programação das ações e as considerações finais.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Implementar uma nova metodologia para otimizar a determinação da CIM de ATM/CAZ-AVI, em associação, baseado nos pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST 2020, em complemento à metodologia convencional de TSA utilizando o protocolo sugerido por Emeraud *et al.* (2019), auxiliando o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de carbapenemase do tipo MBL.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar e padronizar a nova metodologia para o diagnóstico laboratorial do perfil de sensibilidade das Enterobactérias MDR produtoras de MBL, em complemento a metodologia convencional de automação realizada pelo equipamento BD Phoenix®;

Avaliar a potencial eficácia da associação do ATM com o CAZ-AVI, *in vitro*, como opção terapêutica a ser liberada no laudo do TSA emitido pela Subseção de Microbiologia do laboratório de Análises Clínicas do HNMD; e

Fornecer subsídios à CCIH para a elaboração de um novo regime terapêutico para o tratamento dos pacientes acometidos por infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de MBL.

1.2. JUSTIFICATIVA

As infecções causadas por bactérias MDR estão associadas a um aumento da mortalidade se comparado com aquelas causadas por bactérias suscetíveis, além de carregar um fardo econômico importante (COSGROVE, 2006). Além disso, de acordo com estudos recentes, estima-se que a resistência aos antibióticos cause cerca de 300 milhões de mortes prematuras até 2050 (WHO, 2014; MUNITA *et al.*, 2016).

As enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos. Além da produção da enzima MBL, essas bactérias podem apresentar associação com outros mecanismos de resistência, como a produção de outras enzimas do tipo serino β -Lactamases (KPC, OXA-48 like, AMPC), ESBLs, hiper expressão de bomba de efluxo, alteração química na molécula do antibiótico devido ação de enzimas modificadoras, conferindo-lhes um perfil de multirresistência e/ou pan-resistência (MUNITA *et al.*, 2016). Neste caso, poucos antibióticos tornam-se opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos, como por exemplo Polimixina e Amicacina. Entretanto, estas drogas são altamente neurotóxicas e nefrotóxicas, respectivamente,

agravando ainda mais o quadro do paciente e não sendo 100% eficazes na maioria das vezes (EMERAUD *et al.*, 2019).

A associação de CAZ-AVI mais o ATM tem apresentado resultados bastante satisfatórios, conforme publicado na literatura e, para sua utilização como opção terapêutica faz-se necessário a determinação das respectivas CIM, a fim de verificar *in vitro* a sensibilidade das Enterobactérias produtoras de MBL frente a essas duas drogas, conforme pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST 2020.

A validação da metodologia de sobreposição de tiras de E-test para a determinação da CIM de CAZ-AVI e ATM, em associação, implementará os laudos de TSA como possível opção terapêutica para as Enterobactérias produtoras de MBLs MDR e/ou pan-resistentes, fornecendo subsídios para a padronização de novos protocolos de antibioticoterapia com consequente redução das taxas de morbidade e mortalidade, assim como o tempo de internação e respectivos custos hospitalares.

1.3. METODOLOGIA

O presente trabalho é um estudo de intervenção com abordagem quantitativa e está de acordo com a metodologia da problematização, a qual utiliza a Estrutura do Método do Arco de Maguerz, onde se percebe a realidade através do processo de observação, seguindo-se a identificação de problemas, com reflexão, teorização, formulação de hipóteses de solução e elaboração de propostas, inserido em um contexto (VIEIRA; PANÚNCIO-PINTO, 2015).

O intuito é promover uma mudança no gerenciamento laboratorial referente ao TSA, transformando a realidade organizacional da Subseção de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do HNMD, através da gestão de recursos humanos e materiais.

Como encarregada da Subseção de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do HNMD, esta autora obervou que o TSA de paciente acometido por infecção causada por Enterobactéria produtora de carbapenemase do tipo MBL, apresentava perfil de multiresistência e/ou pan-resistência. No TSA para Enterobactéria MDR apenas os antibióticos Amicacina e Polimixina demonstraram ação contra o microrganismo. Enquanto que no TSA para Enterobactéria pan-resistente, nenhuma droga se mostrou ativa. Esta realidade causava grande insatisfação e preocupação, não somente a esta autora, mas também a toda equipe da subseção e do corpo clínico do hospital.

Com o problema identificado, laudos de TSA emitidos pela Subseção de Microbiologia sem opção terapêutica para nortear o tratamento dos pacientes acometidos por infecções causadas por Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL, a equipe técnica levantou as possíveis causas relacionadas ao problema em tela: aumento da resistência bacteriana no hospital, limitação da ação das drogas comercialmente disponíveis, limitação das metodologias convencionais para a determinação da CIM, ausência na Subseção de Microbiologia de metodologia que determine a CIM a partir da associação de CAZ-AVI e ATM.

Para fundamentar a etapa de teorização buscou-se embasamento científico das causas elencadas com a realização de uma pesquisa bibliográfica nos bancos de dados (PubMed, Medline, Lilacs, Bireme, Scielo) para a obtenção de artigos científicos relacionados ao problema. Obtiveram-se artigos que descreviam sobre resistência bacteriana e seus mecanismos, novos antibióticos que ainda se encontram em estudo clínico e, novas metodologias para a determinação da CIM de CAZ-AVI e ATM em associação. Foram selecionados alguns artigos científicos dentre eles os de Emeraud *et al.* (2019), Pragasam *et al.* (2019), Marshal *et al.* (2017) e Wenzler *et al.* (2017) os quais fundamentaram este trabalho.

As palavras utilizadas para a busca foram: Ceftazidima/Avibactam, Aztreonam, Enterobactérias, Carbapenemase, Metallo- β -lactamase. Dos artigos selecionados, 29 foram efetivamente empregados no presente trabalho..

Para a elaboração das hipóteses para este projeto, esta autora levou em consideração aquela que representaria maior impacto no laudo de TSA, que tivesse disponibilidade de recursos tecnológicos (equipamentos), materiais (insumos laboratoriais) e humanos, e que fosse de possível governabilidade, elegendo assim, a implantação de uma metodologia para a determinação, *in vitro*, da CIM de CAZ-AVI associado a ATM como possível opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de MBL, em complemento a metodologia convencional, como hipótese principal para a solução do problema.

Com o propósito de atingir os objetivos deste trabalho, esta autora elaborou uma matriz de programação de ações, na qual relaciona as metas a serem atingidas, assim como, o detalhamento das ações que já foram adotadas e aquelas que se pretende implementar.

Foram realizadas reuniões com a equipe da Subseção de Microbiologia e com os membros da CCIH do HNMD para apresentação do projeto, análise das ações,

delineamento dos recursos necessários para o cumprimento das metas estabelecidas. Foram também realizadas coleta de dados para a obtenção dos indicadores a serem calculados e monitorados.

Desta forma, este trabalho fornecerá subsídios à CCIH para a instituição de um novo regime terapêutico para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de MBL, com possível avaliação dos impactos gerados pela nova metodologia a partir da observação de variáveis como: taxa de morbidade e mortalidade, tempo de internação e custos hospitalares.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A EMERGÊNCIA DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

O contínuo aumento, a nível global, de infecções causadas por microrganismos MDR está associado a um aumento significativo da morbidade e mortalidade, carregando um importante peso econômico estimado em mais de 20 bilhões de dólares por ano somente nos Estados Unidos (COSGROVE, 2006). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2014), dados recentes revelam que a resistência aos antibióticos poderá causar 300 milhões de mortes prematuras até 2050, com uma perda de mais de 100 trilhões de dólares para a economia global.

Bactérias MDR têm surgido não somente no ambiente hospitalar, mas também na comunidade (LOGAN *et al.*, 2017). A resposta bacteriana ao mecanismo de ação do antibiótico é um exemplo da sua capacidade de adaptação, levando a sobrevivência de cepas mutantes como consequência da plasticidade genética dos patógenos bacterianos, que desencadeiam respostas que resultam em adaptações mutacionais, aquisição de material genético ou alteração da expressão gênica. Tais genes, localizados em elementos genéticos móveis (MGEs), são capazes de se disseminar eficientemente entre bactérias e hospedeiro, dentro e fora de hospitais, com consequente resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis na prática clínica (MUNITA *et al.*, 2016; LOGAN *et al.*, 2017).

2.2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

As infecções por bactérias MDR acometem, principalmente, pacientes hospitalizados onde a exposição aos antibióticos, internação prolongada, uso de dispositivos internos e fatores do próprio hospedeiro o tornam mais suscetível.

Contudo, a explosão da resistência bacteriana ocorreu devido a genes de resistência a antibióticos localizados em MGEs (LOGAN *et al.*, 2017). Essa tendência é destacada em Enterobactérias, uma família de BGN, responsável por uma variedade de infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Nos BGN destaca-se como principal mecanismo de resistência a presença de β -Lactamases, enzimas hidrolisantes de β -lactâmicos, para o qual o número de sequência de proteínas exclusivas já ultrapassou 2.100 (BUSH, 2016; LOGAN *et al.*, 2017). Vários desses microrganismos carregam genes adicionais transferidos por plasmídeos, ativos contra outras classes de antibióticos, tornando as bactérias resistentes a múltiplas drogas (BUSH *et al.*, 2011).

Diversos são os mecanismos de resistência desenvolvidos por Enterobactérias para se adaptarem ao meio em que se encontram. Dentre eles podemos citar:

a) Redução da permeabilidade da membrana citoplasmática

Muitos antibióticos utilizados na prática clínica têm como alvo estruturas intracelulares bacterianas ou, no caso dos BGN, alvos localizados na membrana citoplasmática. Neste caso, as bactérias desenvolveram mecanismos que impedem que o antibiótico alcance seu alvo intracelular ou periplasmático diminuindo a captação da molécula antibacteriana e, portanto, limitando o influxo do antibiótico. Moléculas hidrofílicas como os β -lactâmicos, tetraciclina e algumas fluorquinolonas são particularmente afetadas uma vez que utilizam canais de difusão cheios de água, conhecidos como porinas, para cruzar esta barreira (PAGÈS *et al.*, 2008).

b) Bomba de efluxo

Mecanismos bacterianos complexos capazes de expulsar componentes tóxicos para fora da célula também podem resultar em resistência antimicrobiana (MAHMOOD *et al.*, 2016). Esse mecanismo de resistência afeta uma ampla classe de antibióticos, incluindo os inibidores da síntese proteica, fluorquinolonas, β -lactâmicos, carbapenêmicos e polimixinas. Os genes codificadores da bomba de efluxo podem estar localizados em MGEs ou no cromossoma (PIDDOCK, 2006).

c) Alterações do sítio alvo

Outra estratégia comum é evitar a ação do antibiótico interferindo em seu local de ligação, que pode ocorrer por meio da proteção do alvo evitando que o antibiótico alcance seu sítio de ligação ou, por modificação do sítio alvo resultando no declínio da afinidade pela molécula do antibiótico (MUNITA *et al.*, 2016).

d) Modificações da molécula do antibiótico

Uma excelente estratégia para lidar com a presença do antibiótico é a produção de enzimas que inativam a droga adicionando frações químicas específicas ao composto. A maioria dos antibióticos afetados por essas modificações enzimáticas exercem seu mecanismo de ação ao inibir a síntese de proteínas a nível do ribossomo (WILSON, 2013). As reações químicas mais frequentes incluem i) acetilação (aminoglicosídeos, cloranfenicol, estreptograminas), ii) fosforilação (aminoglicosídeos, cloranfenicol), iii) adenilação (aminoglicosídeos, lincosamidas). O efeito resultante é a diminuição da avidéz da droga pelo seu alvo (MUNITA *et al.*, 2016).

Uma das mais bem sucedidas estratégias de resistência bacteriana e, o principal mecanismo de resistência contra os β -lactâmicos incluindo os carbapenêmicos, é a destruição destes compostos pela ação enzimática das β -Lactamases. Estas enzimas destroem a ligação amida do anel β -lactâmico, tornando o antibiótico ineficaz (D’COSTA *et al.*, 2011). Os genes codificadores das β -Lactamases são, geralmente, denominados *bla* seguido pelo nome da enzima específica (p.ex. *bla_{KPC}*) e, são encontrados no cromossoma ou localizados em MGEs. Esses genes também podem ser encontrados como parte de integrons, situação que facilita sua disseminação (MUNITA *et al.*, 2016).

Segundo Bush (2013), mais de 1000 β -Lactamases foram descritas e, dois esquemas de classificação foram propostos na tentativa de agrupar esse grande número de enzimas. Primeiro a classificação de Ambler que se baseia na identidade da sequência de aminoácidos, dividindo estas enzimas em quatro grupos: A, B, C e D. Por outro lado, a classificação de Bush-Jacoby, que divide as β -Lactamases em quatro categorias de acordo com sua função bioquímica.

A resistência fenotípica aos carbapenêmicos é normalmente causada por dois mecanismos principais:

- a) Atividade da β -Lactamase combinada com mutações estruturais

Este mecanismo inclui β -Lactamases de espectro ampliado (ESBLs), que são geralmente codificadas por plasmídeos e, Amp cefalosporinases (AmpC), para as quais a expressão em Enterobactérias está mais frequentemente associada à hiperprodução de enzimas de genes cromossômicos indutíveis ou des-reprimidos (BUSH *et al.*, 2011). ESBLs e AmpC são capazes de conferir resistência ao carbapenêmico quando combinados com a mutação de porinas, retardando a difusão do antibiótico através da membrana a uma taxa suficientemente lenta para facilitar a ação das enzimas ESBL e AmpC (PATERSON *et al.*, 2005). Outros mecanismos associados com a resistência aos

carbapenêmicos em BGN incluem bomba de efluxo e alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PATEL *et al.*, 2013).

b) Produção de carbapenemases

As carbapenemases são enzimas que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos. São classificadas por suas estruturas moleculares e pertencem a três classes de β -Lactamases: classe A, B e D, do sistema de classificação Ambler (AMBLER *et al.*, 1980). As carbapenemases da classe A e D requerem serina como seu sítio ativo, enquanto as pertencentes a classe B, MBLs, requerem zinco para hidrolisar o β -lactâmico (BUSH *et al.*, 2011). Os principais genes codificadores de carbapenemases da classe A incluem *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs), Guiana Espectro estendido (GES), enzima de hidrólise de imipenem (IMI), não metalo enzima carbapenemase (NMC) e enzima *Serratia marcescens* (SME), dos quais os *bla_{KPC}* são os genes transmissíveis que comumente circulam em Enterobactérias pelo mundo (PATEL *et al.*, 2013). As enzimas KPCs são capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos e, cepas que carregam *bla_{KPC}* muitas vezes adquirem resistência a fluorquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol/trimetoprim, originando perfil MDR (NORDMANN *et al.*, 2009).

As OXA β -Lactamases classe D, assim nomeada devido sua capacidade de hidrolisar a oxacilina, são um grupo diverso e heterogêneo de enzimas encontradas em espécies de *Acinetobacter spp.*, e cada vez mais, especialmente as variantes OXA-48, em Enterobactérias (POIREL *et al.*, 2009). As OXA-48 hidrolisam penicilinas em alto nível e carbapenêmicos em um nível mais baixo, enquanto poupam cefalosporinas de espectro estendido. No entanto, as cepas podem expressar múltiplas ESBLs, tornando resistentes a todos os β -lactâmicos (POIREL *et al.*, 2012).

As MBLs da classe B são um grupo complexo de enzimas que hidrolisam todos os β -lactâmicos, exceto o monobactâmico Aztreonam e, não são inibidas pelos inibidores de β -Lactamases comercialmente disponíveis como ácido clavulânico, tazobactam e avibactam (QUEENAM *et al.*, 2007). Os principais genes codificadores de MBLs transferíveis em Enterobactérias incluem imipenemase (IMP), Verona MBL codificada em integrons (VIM) e New Delhi MBL (NDM) (WALSH, 2010). Os genes MBL do tipo NDM foram encontrados em vários clones endêmicos incluindo *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, que são conhecidos por abrigar outros genes de β -Lactamases determinantes de resistência a antibióticos (DORTET *et al.*, 2014).

A diferenciação entre Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE) produtoras de carbapenemase e não produtoras de carbapenemase é de grande importância clínica e epidemiológica. Entretanto, se faz necessário os padrões de suscetibilidade para o tratamento do paciente.

2.3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS

Existe uma escassez de antibióticos capazes de tratar as infecções causadas por Enterobactérias MDR. Os carbapenêmicos são, cada vez mais, desafiados por MGEs que abrigam carbapenemases e outros genes de resistência.

O mais recente antimicrobiano, disponível comercialmente no Brasil, é a CAZ-AVI, uma nova combinação de um β -lactâmico mais um inibidor de β -Lactamase para o tratamento de infecções intra-abdominais complicadas, infecções complicadas do trato urinário incluindo pielonefrite e, pneumonia adquirida após internação hospitalar. Trata-se de um antibiótico com um amplo espectro de atividade contra β -Lactamases pertencentes à classe A e C de Ambler (incluindo o tipo KPC) e algumas pertencentes à classe D como a OXA-48 like (PRAGASAN *et al.*, 2019).

O Avibactam (AVI) restaura a atividade da Ceftazidima (CAZ) contra muitas ameaças de resistência, entretanto CAZ-AVI não é ativo contra isolados produtores de MBLs pertencente à classe B de Ambler, como as NDM, VIM e IMP. O antibiótico monobactâmico ATM permanece estável contra a hidrólise das MBLs, mas, não é opção terapêutica na maioria dos casos por ser inativado por ESBLs, KPCs e outras cefalosporinases frequentemente encontradas nas bactérias produtoras de MBLs. (MARSHAL *et al.*, 2017)

Uma outra nova combinação de β -lactâmico/inibidor de β -Lactamase, o ATM/AVI, tem potencial atividade contra NDM e OXA-48, entretanto, ainda se encontra em fase 2 de desenvolvimento (EMERAUD *et al.*, 2019). Neste contexto, a associação do ATM com o CAZ-AVI é uma opção terapêutica útil para o tratamento de infecções causadas por BGN produtoras de MBLs (PRAGASAN *et al.*, 2019).

Com base nos mecanismos de ação dos três agentes (CAZ, AVI e ATM), Emeraud *et al.* (2019), Marshall *et al.* (2017), Pragasan *et al.* (2019) e Wenzler *et al.* (2017), propuseram em seus estudos que a associação, *in vitro*, do ATM com o CAZ-AVI é capaz de superar a resistência de Enterobactérias produtoras de MBLs frente aos carbapenêmicos e cefalosporinas de espectro estendido. O AVI é um potente inibidor de enzimas β -Lactamase das classes A e C, e considerando que a maioria das

Enterobactérias possui enzimas classe C e, possivelmente, algumas ESBLs classe A, o AVI atua prevenindo a hidrólise da CAZ e do ATM. Apesar do AVI não restaurar a suscetibilidade dos isolados produtores de MBLs, o ATM não é suscetível à hidrólise das MBLs. Portanto, inibindo as β -Lactamases classe A e C com o AVI e usando o ATM para “desviar” as MBLs classe B, a suscetibilidade pode ser restaurada, conduzindo para o sucesso microbiológico e possível resultado clínico positivo. O ATM, também é considerado um antibiótico seguro para uso em pacientes alérgicos às penicilinas, pode ser administrado por infusão prolongada ou contínua e, não está associado a nefrotoxicidade. Sendo assim, a combinação de CAZ-AVI com ATM pode ser considerada como uma “nova oportunidade terapêutica” para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias produtoras de MBLs.

3. O PROJETO DE INTERVENÇÃO

O presente projeto de intervenção está sendo realizado na Subseção de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HNMD, unidade de assistência terciária do SSM, situado à Rua César Zama, nº 185, Lins de Vasconcelos, na cidade do Rio de Janeiro, e tem como objetivo a validação e implantação de uma nova metodologia para a determinação da CIM de CAZ-AVI associado ao ATM em complemento à metodologia convencional para TSA, visando nortear o corpo clínico no tratamento das infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de MBL.

Este trabalho é um estudo intervencional, que analisará cepas bacterianas pertencentes à família Enterobacteriaceae, produtoras de enzima carbapenemase do tipo MBL, isoladas a partir de amostras biológicas (sangue, secreção traqueal, broncoaspirado e urina) de pacientes com infecção, internados no HNMD, no período de março a outubro de 2020.

A partir da implementação da metodologia de sobreposição de tiras de E-test à metodologia convencional, será possível a liberação de laudos de TSA com opção terapêutica para tratamento do paciente acometido por infecção causada por Enterobactéria MDR produtora de MBL, cabendo à CCIH a avaliação *in vivo* da eficácia e segurança da associação de CAZ-AVI e ATM.

3.1. DESCRIÇÃO DA SITUAÇÃO PROBLEMA

Atualmente, os laudos de testes de sensibilidade a antimicrobianos emitidos pela Subseção de Microbiologia do HNMD não apresentam opção terapêutica para nortear o

tratamento dos pacientes acometidos por infecções causadas por Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL.

As Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL são resistentes a maioria dos antibióticos disponíveis. Normalmente, além da produção de MBL, outros mecanismos de resistência estão associados caracterizando o perfil de multirresistência desses microrganismos. De acordo com os dados laboratoriais da Subseção de Microbiologia, 100% das cepas de Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL apresentam perfil de multirresistência, com sensibilidade *in vitro* apenas para Amicacina e Polimixina. Estas drogas são, respectivamente, nefrotóxicas e neurotóxicas e, por vezes, acabam agravando o quadro do paciente não sendo 100% eficaz no tratamento. O ATM é a única droga estável a ação enzimática da MBL, entretanto, não é ativo contra os demais mecanismos de resistência associados. Da mesma forma, a CAZ-AVI, embora ativa contra a produção de carbapenemase do tipo serino- β -Lactamase e demais mecanismos de resistência, não tem atividade contra MBL.

Estas duas drogas, quando testadas isoladamente *in vitro*, apresentam CIM elevadas confirmando resistência a estes antibióticos. De acordo com estudo realizado por Emeraud et al (2019), a associação de CAZ-AVI mais ATM, quando testados *in vitro* simultaneamente, apresentou CIM abaixo do ponto de corte de sensibilidade e, se mostrou eficaz no tratamento de infecções causadas por Enterobactéria produtora de MBLs.

3.2. EXPLICAÇÃO DA SITUAÇÃO PROBLEMA

A partir de reuniões do tipo “*brainstorming*” com a equipe de trabalho envolvida no processamento dos TSA e, de dados estatísticos obtidos pela Subseção de Microbiologia, foi possível realizar um levantamento das possíveis causas que levam à liberação de TSA sem opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias produtoras de MBL:

- Aumento da resistência bacteriana no hospital

A maior incidência de Enterobactérias resistentes à cefalosporinas de espectro ampliado em ambiente hospitalar, leva ao aumento do uso de β -lactâmicos mais potentes como os carbapenêmicos. A utilização dos carbapenêmicos exerce maior pressão seletiva sobre os microrganismos, levando à resistência a esses agentes. Entre os mecanismos de resistência mais comuns aos carbapenêmicos, está a produção de β -Lactamases tipo classe A de Ambler (p.e. KPC), classe D de Ambler (p.e. OXA-48) e

classe B de Ambler (p.e. IMP, VIN e NDM). Estas últimas hidrolisam todos os β -lactâmicos disponíveis comercialmente, sendo a única exceção o monobactâmico ATM. Entretanto o ATM, isoladamente, não é ativo contra Enterobactérias produtoras de β -Lactamase AmpC, ESBL e carbapenemase tipo KPC. Adicionalmente, as Enterobactérias produtoras de MBL podem apresentar outros mecanismos de resistência associados como alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática devido à perda de porinas, hiper expressão da bomba de efluxo, alteração genética no sítio de ligação, caracterizando assim, o perfil de multirresistência.

- Limitação das drogas comercialmente disponíveis

Embora novas drogas tenham sido desenvolvidas para exercer atividade contra Enterobactérias produtoras de carbapenemases, e neste caso podemos citar CAZ-AVI, trata-se de alternativa terapêutica apenas para as Enterobactérias produtoras de carbapenemase classe A e D. Ainda não existe tratamentos comercialmente disponíveis, com uma única droga, para as infecções causadas por cepas produtoras de MBL, uma vez que, normalmente, apresentam outros mecanismos de resistência associados à produção de MBL.

- Limitação dos painéis automatizados, E-test e disco de antibiograma

Por não existir droga ativa, comercialmente disponível, contra as Enterobactérias produtoras de MBL, os painéis e/ou cartões usados para a realização dos TSA não contemplam drogas ativas para esses microrganismos. O mesmo ocorre com os E-test e discos de antibiograma. Embora, através desses métodos, seja possível testar isoladamente drogas como o ATM e CAZ-AVI, não é possível obter a CIM para tratar as infecções causadas pelas Enterobactérias produtoras de MBL, utilizando a metodologia convencional.

- Ausência, no laboratório de microbiologia, de metodologia que determine a CIM a partir da associação da CAZ-AVI e ATM.

De acordo com os estudos de Emeraud *et al.* (2019), a associação de CAZ-AVI mais ATM se mostrou eficaz no tratamento de um paciente com pielonefrite causada por *Escherichia coli* produtora de MBL (NDM). Após cultura de urina, foi isolado cepa de *Escherichia coli* produtora de MBL, sensível apenas à Polimixina, Gentamicina e Fosfomicina. A mesma cepa foi isolada em amostra de sangue. O tratamento com Polimixina, Fosfomicina e Gentamicina foi iniciado, porém sem sucesso. O tratamento teve que ser suspenso em virtude da rápida deterioração da função renal, além do paciente ainda apresentar febre e marcadores inflamatórios elevados. Foi determinada a

CIM para CAZ-AVI e ATM e, iniciado o tratamento com a associação das duas drogas. Após 48 horas o paciente apresentou-se apirético, com melhora da função renal e resolução da síndrome inflamatória.

Atualmente, embora não exista droga disponível, um estudo clínico para avaliar a eficácia, segurança e tolerabilidade do ATM/AVI no tratamento de infecções graves causadas por BGN produtores de MBL, encontra-se em fase 2.

Enquanto o estudo não está concluído, a associação das drogas CAZ-AVI e ATM pode ser uma eficaz opção terapêutica, reduzindo a taxa de morbidade e mortalidade devido a infecções causadas por Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL, assim como o tempo de internação e custos hospitalares. Portanto, faz-se necessária a determinação da CIM de CAZ-AVI e ATM quando associados, para maximizar os resultados do teste de sensibilidade a fim de orientar o clínico a iniciar uma terapêutica mais assertiva.

3.3. PROGAMAÇÃO DAS AÇÕES

Problema a ser enfrentado: Laudos de TSA emitidos pela Subseção de Microbiologia do HNMD sem opção terapêutica para nortear o tratamento dos pacientes acometidos por infecção causada por Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL.

Causa: Ausência, no laboratório de microbiologia do HNMD, de metodologia que determine a CIM a partir da associação da CAZ-AVI e ATM.

Descritor: baseado nos pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST 2020, temos como descritores do problema:

- 100% dos isolados de Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL com perfil de multirresistência;
- 84% dos isolados de Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL apresentam CIM > 4 mg/L para ATM quando testado isoladamente *in vitro*, confirmando resistência a este antibiótico; e
- 100% dos isolados de Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL apresentam CIM > 8 mg/L para CAZ-AVI quando testado isoladamente *in vitro*, confirmando resistência a este antibiótico.

Indicador: Percentual de sensibilidade das Enterobactérias MDR produtoras de MBL quando testadas para CAZ-AVI e ATM em associação.

Meta 1: Implantação da metodologia de sobreposição de tiras de E-test para a determinação da CIM da associação de CAZ-AVI e ATM para liberação em TSA a partir de dezembro de 2020.

Meta 2: Redução do percentual de resistência das Enterobactérias MDR produtoras de MBL frente à CAZ-AVI e ATM, quando testados associados e simultaneamente.

Resultados: TSA, liberado pela Subseção de Microbiologia, com possível opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias MDR produtoras de MBL, com conseqüente redução das taxas de morbidade/mortalidade, tempo de internação e custos hospitalares.

| Ações | Recursos | Produtos a serem alcançados | Prazo conclusão | Responsável |
|---|---|---|------------------------|---|
| Reunir com o setor de Bacteriologia e CCIH para apresentação da metodologia de sobreposição de E-test para a determinação das CIM de CAZAVI + ATM em associação | Sala de reuniões, farmacêuticos do setor de Bacteriologia e representante da CCIH e computador. | Apresentação da metodologia de sobreposição de E-test , de acordo com Emeraud et al. (2019): realizada | Fevereiro 2020 | CC (S) Luciana Lemes |
| Reunir para elaboração do projeto de pesquisa e definir as funções dos colaboradores | Sala de reuniões, farmacêuticos do setor de Bacteriologia, computador, papel e impressora | Definição das diversas funções dos colaboradores e desenho do projeto: realizados | Março de 2020 | CC (S) Luciana Lemes, 1T (S) Liliane e 1T (RM2-S) Dallapícula |
| Contatar representante da Pfizer e Plastlabor para fornecimento dos E-tests | Telefone e e-mail | Obtenção de material (E-test) para a realização dos testes: E-test serão entregues ao longo do período de março a novembro de 2020. | Novembro 2020 | CC (S) Luciana Lemes |

| Ações | Recursos | Produtos a serem alcançados | Prazo conclusão | Responsável |
|---|---|---|-------------------------|---|
| Desenhar o protocolo da metodologia de sobreposição de E-test, de acordo com Emeraud <i>et al.</i> (2019) | Sala de reuniões, farmacêuticos do setor de Bacteriologia, computador, papel e impressora | Protocolo da metodologia de sobreposição de E-test: realizado | Março de 2020 | CC (S) Luciana Lemes, 1T (S) Liliane e 1T (RM2-S) Dallapícula |
| Treinar a equipe técnica do Setor de Bacteriologia destinada à validação da nova metodologia | Equipamentos: MALDI-TOF, BD Phoenix. Insumos: placa ágar Muller Hinton, discos de Meropenem, solução de EDTA, cepas ATCC, tiras E-test . Farmacêutico e técnico em laboratório | Equipe técnica do setor de Bacteriologia: treinada | Março de 2020 | CC (S) Luciana Lemes |
| Aplicar a nova metodologia concomitante com a testagem das drogas isoladamente em 31 amostras (cepas bacterianas) | Equipamentos: MALDI-TOF, BD Phoenix. Insumos: placa ágar Muller Hinton, discos de Meropenem, solução de EDTA, cepas ATCC, tiras E-test . Farmacêuticos e técnico em laboratório | Obtenção de testes pareados para validação: obtido | Março a outubro de 2020 | CC (S) Luciana Lemes, 1T (S) Liliane e 1T (RM2-S) Dallapícula |
| Analisar os resultados obtidos nas 31 amostras com testes pareados | Computador, papel e impressora | Elaboração de planilha dos resultados: realizada | Outubro de 2020 | CC (S) Luciana Lemes, 1T (S) Liliane e 1T (RM2-S) Dallapícula |

| Ações | Recursos | Produtos a serem alcançados | Prazo conclusão | Responsável |
|--|--|--|------------------------|---|
| Reunir para apresentação dos resultados da metodologia de sobreposição de E-test à CCIH | Sala de reuniões, representante da CCIH, computador. | Apresentação da planilha de resultados da metodologia de sobreposição de E-test, de acordo com Emeraud et al. (2019): realizada | Novembro de 2020 | CC (S) Luciana Lemes |
| Reunir para exposição do novo protocolo complementar de TSA para Enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo MBL | Sala de reuniões, farmacêuticos e técnicos do setor de Bacteriologia, computador. | Apresentação do novo protocolo complementar de TSA: realizada | Novembro de 2020 | CC (S) Luciana Lemes |
| Treinar a equipe técnica do setor de Bacteriologia para execução do novo protocolo na rotina do setor | Farmacêuticos e técnicos do setor de Bacteriologia | Farmacêuticos e técnicos treinados para a execução do novo protocolo complementar de TSA: realizado | Novembro de 2020 | CC (S) Luciana Lemes |
| Utilização da metodologia de sobreposição de E-test na rotina do setor de Bacteriologia | Equipamentos: MALDI-TOF, BD Phoenix. Insumos: placa ágar Muller Hinton, discos de Meropenem, solução de EDTA, cepas ATCC, tiras E-test . Farmacêuticos e técnico em laboratório. | Adoção da metodologia de sobreposição de E-test em complemento a metodologia convencional na rotina do setor de Bacteriologia: realizada | Novembro 2020 | CC (S) Luciana Lemes, 1T (S) Liliane e 1T (RM2-S) Dallapícula |

| Ações | Recursos | Produtos a serem alcançados | Prazo conclusão | Responsável |
|--|----------------------------|---|------------------------|---|
| Liberar o TSA pelo setor de Bacteriologia, contendo CIM e interpretação para a associação de CAZAVI + ATM, conforme pontos de corte estabelecidos pelo BrCast 2020 | Farmacêutico e computador. | Laudo de TSA liberado com a CIM respectiva para CAZAVI e ATM em associação, com a respectiva interpretação (sensível, intermediário ou resistente): a ser realizado | Dezembro de 2020 | CC (S) Luciana Lemes, 1T (S) Liliane e 1 T(RM2-S) Dallapícula |

3.4. GESTÃO DO PROJETO

A gestão do presente projeto foi realizada por esta autora, da qual foi responsável pelo treinamento de toda equipe técnica da Subseção de Microbiologia do HNMD, pela coordenação e supervisão da execução de todas as etapas do processo, conforme a matriz de programação.

As cepas bacterianas foram obtidas a partir de materiais biológicos provenientes de pacientes internados no HNMD, com quadro clínico infeccioso. Os microrganismos isolados foram identificados e tiveram seus TSA realizados, inicialmente, por automação por meio do equipamento BD PHOENIX[®]. Os isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, com perfil de multirresistência e/ou pan-resistência, tiveram a resistência aos carbapenêmicos confirmada por E-test.

Em uma segunda etapa, estas cepas foram submetidas à teste fenotípico para a detecção da produção de carbapenemase através do método modificado de inativação de carbapenêmicos (m-CIM/e-CIM) e, teste fenotípico imunocromatográfico CORIS[®] para a classificação do tipo de carbapenemase produzida. Trinta e um (31) isolados de Enterobactérias foram confirmados como produtores de MBL, dos quais 29 foram classificados como do tipo NDM. Dois (2) isolados, embora produtores de MBL, não apresentaram positividade ao teste imunocromatográfico. Tal situação não exclui a produção de MBL, uma vez que o teste imunocromatográfico utilizado detecta apenas três tipos de carbapenemase (KPC, NDM e OXA-48). Neste sentido, a produção de outros tipos de MBL não pode ser evidenciada por esta metodologia. Três (3) isolados apresentaram coprodução de serino β -Lactamase do tipo KPC.

Na terceira etapa do processo, utilizando fitas de E-test, os 31 isolados foram testados frente aos antibióticos ATM e CAZ-AVI, isoladamente e, frente a associação de CAZ-AVI mais ATM, conforme protocolo proposto por Emeraud *et al.* (2019). Foram considerados os pontos de corte, estabelecidos pelo BrCast 2020 para família *Enterobacteriaceae*, para determinar a sensibilidade e resistência, conforme Tabela 1.

Tabela 1-Pontos de corte de antimicrobianos para Enterobactérias

| Antimicrobiano | CIM (mg/L) | |
|-----------------------|------------|------------|
| | Sensível | Resistente |
| Aztreonam | ≤ 1 | > 4 |
| Ceftazidima/Avibactam | ≤ 8 | > 8 |

Fonte: BrCAST, 2020

Dos 31 isolados de Enterobactérias produtoras de MBL testados para o ATM isoladamente (intervalo de CIM de 0,064 mg/L a 1024 mg/L), 80% (22/31) mostraram-se resistentes. Um isolado (3%) apresentou sensibilidade aumentando a exposição e, 23% (7/31) foram sensíveis.

Estes mesmos isolados, quando testados para CAZ-AVI (intervalo de CIM de 0.016 mg/L a 256 mg/L), isoladamente, apresentaram 100% de resistência.

A associação , *in vitro*, de CAZ-AVI e ATM demonstrou atividade sinérgica com sensibilidade em 97% dos isolados testados, reduzindo a CIM de CAZ-AVI e ATM em até 16.000 vezes e 10.800 vezes, respectivamente. Um isolado de *Enterobacter cloacae*, apresentou MIC de 1,5 mg/L para o ATM, indicando sensibilidade com o aumento da exposição.

Os resultados obtidos com a validação da metodologia proposta, conforme exposto no APÊNDICE, foram apresentados por esta autora aos membros da CCIH, tendo sua liberação nos laudos de TSA autorizada pelos membros dessa comissão.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a emergência da resistência bacteriana, faz-se necessária a constante busca por estratégias que permitam o sucesso terapêutico de pacientes acometidos por infecções causadas por Enterobactérias multirresistentes, minimizando as taxas de morbidade e mortalidade, assim como os impactos financeiros consequentes de longos períodos de internação.

Poucas drogas antibacterianas, atualmente, são capazes de combater esses germes. A associação de ativos farmacológicos é uma estratégia viável, a partir do momento que se compreende os mecanismos de ação dos antibióticos associados e o mecanismo de resistência da bactéria a ser combatida.

O presente trabalho confirmou a validação da técnica de sobreposição de tiras de E-test como metodologia de simples execução e baixo custo para a determinação da

CIM de Ceftazidima/Avibactam e Aztreonam associados, demonstrando que o potencial sinérgico, *in vitro*, proveniente da associação da Ceftazidima/Avibactam mais o Aztreonam, pode ser uma excelente opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas por Enterobactérias, multirresistentes e/ou pan-resistentes, produtoras de metalo β -Lactamase, corroborando com os resultados apresentados por Emeraud *et al.* (2019), Pragasan *et al.* (2019), Marshall *et al.* (2017) e Wenzler *et al.* (2017).

Desta forma, a inclusão dos resultados obtidos *in vitro*, da associação de Ceftazidima/Avibactam mais Aztreonam, aos laudos de TSA emitidos pela Subseção de Microbiologia do HNMD, permitirá ao clínico uma abordagem inovadora e mais assertiva no desafiador tratamento das infecções causadas por esses microrganismos.

Os resultados deste trabalho de intervenção são encorajadores, merecendo atenção, consideração e responsabilidade em virtude da crescente redução das opções terapêuticas contra bactérias resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de carbapenemases.

Não menos importante, dados adicionais para avaliar a eficácia e segurança, *in vivo*, desta nova opção terapêutica são indispensáveis. Desta forma, o presente trabalho abre portas para futuros estudos e pesquisas a serem realizados pelo corpo clínico do HNMD.

O estudo de Emeraud *et al.* (2019) também evidenciou resultados positivos desta associação para o tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo metalo β -Lactamase, assim como a associação de Aztreonam mais Amoxicilina/Clavulanato para o tratamento de pneumonia causada por *Stenotrophomonas maltophilia* multirresistente, abrindo horizontes para que a Subseção de Microbiologia do HNMD permaneça na busca incessante por novas metodologias a serem implementadas na solução de problemas relacionados à resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLER, R.P. The structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. B, Biological Sciences**, [S.L.], v. 289, n. 1036, p. 321-331, 16 maio 1980. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (Brasil) (org.). **Tabela de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. 2020. Versão 10.0 do Eucast. Disponível em: brcast.org.br. Acesso em: 31 out. 2020.

BUSH, Karen *et al.* Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New Delhi-Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 455-478, 13 out. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>.

BUSH, Karen. The ABCD's of β -Lactamase nomenclature. **Journal Of Infection And Chemotherapy**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 549-559, 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>.

BUSH, Karen. **Top 10 Beta-lactamase Papers for 2015**. Boston: ASM Microbe, 2016. GISKE, C.G *et al.* **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. 2017. Disponível em: brcast.org.br. Acesso em: 1 jul. 2017.

COSGROVE, Sara E. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 82-89, 15 jan. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/499406>.

DORTET, Laurent *et al.* Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2014, p. 1-12, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/249856>.

D`COSTA, Vanessa M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, [S.L.], v. 477, n. 7365, p. 457-461, 31 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10388>.

EMERAUD, Cécile *et al.* Aztreonam plus Clavulanate, Tazobactam, or Avibactam for Treatment of Infections Caused by Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 63, n. 5, p. 10-19, 11 mar. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00010-19>.

LOGAN, Latania K. *et al.* The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 215, n. 1, p. 28-36, 15 fev. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw282>.

MAHMOOD, Hannah Y. *et al.* Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 1062-1081, 7 abr. 2016. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666160304150522>.

MARSHALL, Steven *et al.* Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome β -Lactam Resistance Conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae? **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 16-25, 6 fev. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02243-16>.

MUNITA, Jose M. *et al.* Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 1-37, 1 abr. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>.

NORDMANN, Patrice *et al.* The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 228-236, abr. 2009. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70054-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70054-4).

PAGÈS, Jean-Marie *et al.* The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 893-903, 10 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1994>.

PATEL, Gopi *et al.* "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 4, p. 1-17, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>.

PATERSON, David L. *et al.* Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 657-686, out. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.18.4.657-686.2005>.

PIDDOCK, Laura J. V.. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 382-402, abr. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.19.2.382-402.2006>.

POIREL, Laurent *et al.* Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 24-38, 31 ago. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01512-08>.

POIREL, Laurent *et al.* Oxa 48-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**: British Society for Antimicrobial Chemotherapy, [S.L.], v. 67, n. 7, p. 1597-1606, jul. 2012. <http://doi.org/10.1093/jac/dks088>.

PRAGASAN, Agila Kumari *et al.* Will ceftazidime/avibactam plus aztreonam be effective for NDM and OXA-48-Like producing organisms: lessons learnt from in vitro study. **Indian Journal Of Medical Microbiology**, Tamil Nadu, v. 37, n. 1, p. 34-41, ago. 2019. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/ijmm.ijmm_19_189.

QUEENAN, Anne Marie *et al.* Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 440-458, jul. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00001-07>.

VIEIRA, Marta Neves Campanelli Marçal; PANÚNCIO-PINTO, Maria Paula. A Metodologia da Problematização (MP) como estratégia de integração ensino-serviço em cursos de graduação na área da saúde. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 241-248, 8 jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v48i3p241-248>. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmnp/article/view/104310/102957>. Acesso em: 31 out. 2020.

WALSH, Timothy R.. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 36, p. 8-14, nov. 2010. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579\(10\)70004-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579(10)70004-2).

WENZLER, Eric *et al.* Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 352-354, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.009>.

World Health Organization (org.). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. 2014. Disponível em: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 31 out. 2020.

WILSON, Daniel N.. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 35-48, 16 dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3155>.

APÊNDICE A - Enterobactérias produtoras de metalo β -lactamase frente a associação, *in vitro*, de CAZ-AVI + ATM

| <i>Enterobacteriaceae</i> sp | Deteção ^a / Classificação ^b | CIM ATM ^c | Interp | CIM CAZ-AVI ^e | Interp | CIM CAZ- AVI + ATM ^d | Interp |
|------------------------------|--|-------------------------|--------|-----------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | 64 | R | >256 | R | 0,064/0,25 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,064/0,25 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,25/0,25 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | 96 | R | >256 | R | 0,094/0,19 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | 48 | R | >256 | R | 0,064/0,064 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | 128 | R | >256 | R | 0,125/0,125 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | 128 | R | >256 | R | 0,094/0,094 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,094/0,094 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,125/0,125 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,125/0,125 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,38/0,38 | S |

| <i>Enterobacteriaceae</i> sp | Detecção ^a / Classificação ^b | CIM ATM ^c | Interp | CIM CAZ-AVI ^c | Interp | CIM CAZ- AVI + ATM ^d | Interp |
|------------------------------|---|-------------------------|--------|-----------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,47/0,47 | S |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,094/0,094 | S |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | MBL/NDM | 0,064 | S | >256 | R | 0,016/0,064 | S |
| <i>Escherichia coli</i> | MBL/NDM | 32 | R | >256 | R | 0,064/0,064 | S |
| <i>Escherichia coli</i> | MBL/NDM | 8 | R | >256 | R | 0,125/0,125 | S |
| <i>Escherichia coli</i> | MBL/NDM | 32 | R | >256 | R | 0,064/0,064 | S |
| <i>Escherichia coli</i> | MBL/NDM | 0,064 | S | >256 | R | 0,016/0,064 | S |
| <i>Escherichia coli</i> | MBL/NDM | 1,5 | I | >256 | R | 0,064/0,064 | S |
| <i>Escherichia coli</i> | MBL/NDM/K | 24 | R | >256 | R | 0,016/0,064 | S |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | MBL/NDM | 0,125 | S | >256 | R | 0,25/0,25 | S |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | MBL/NDM | 6 | R | >256 | R | 0,50/1,5 | I |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | MBL/NDM | 192 | R | >256 | R | 0,38/0,75 | S |

| <i>Enterobacteriaceae</i> sp | Detecção ^a / Classificação ^b | CIM ATM ^c | Interp | CIM CAZ-AVI ^c | Interp | CIM CAZ- AVI + ATM ^d | Interp |
|------------------------------|---|-------------------------|--------|-----------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| <i>Enterobacter cloacae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,064/0,19 | S |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | MBL/NDM | >1024 | R | >256 | R | 0,19/0,50 | S |
| <i>Providencia stuartii</i> | MBL/NDM | 0,064 | S | >256 | R | 0,016/0,064 | S |
| <i>Providencia stuartii</i> | MBL/NDM | 0,064 | S | >256 | R | 0,064/0,016 | S |
| <i>Providencia stuartii</i> | MBL/NDM/K | 0,064 | S | >256 | R | 0,016/0,016 | S |
| <i>Providencia stuartii</i> | MBL | 0,064 | S | >256 | R | 0,016/0,064 | S |
| <i>Citrobacter freundii</i> | MBL/NDM/K | 0,38 | S | >256 | R | 0,094/0,19 | S |
| <i>Proteus mirabilis</i> | MBL | 8 | R | >256 | R | 0,016/0,064 | S |

Nota:

^a detecção obtida pelo método modificado de inativação de carbapenêmico (m-CIM/e-CIM)

^b classificação obtida pelo método imunocromatográfico CORIS[®]

^c CIM obtida a partir da metodologia por E-test

^d CIM obtida a partir da metodologia de sobreposição de tiras de E-test

S sensível, dose padrão

I sensível, aumentando a exposição

R resistente