

Epidemiologia molecular de bacilos Gram-negativos multidroga resistente produtores de carbapenemases isoladas de diferentes sítios de infecção

Molecular epidemiology of carbapenemase-producing multidrug-resistant gram-negative bacilli
isolated from different infection sites

Epidemiología molecular de bacilos gram-negativos multirresistentes productores de
carbapenemasas aislados de diferentes sitios de infección

Recebido: 09/07/2021 | Revisado: 16/07/2021 | Aceito: 19/07/2021 | Publicado: 26/07/2021

Cynthia Regina Pedrosa Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8915-859X>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: cynthiaregina@msn.com

Felipe Rogério Ferreira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2898-0501>

Hospital da Restauração Governador Paulo Guerra, Brasil

E-mail: felipe_rogerio_fs@hotmail.com

Jorge Belém Oliveira Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8130-1598>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: juniorbiologia@hotmail.com

Paulo Sérgio Ramos de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7839-0737>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: psergiora@gmail.com

Elza Ferreira Firmo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5042-4483>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: elzafirmo@gmail.com

Resumo

A resistência a carbapenemases em bacilos gram-negativas (BGN) tornou-se um problema mundial, elevando a taxa de morbidade e mortalidade. O método automatizado foi utilizado para identificação e suscetibilidade dos isolados. E o método molecular foi aplicado na detecção de bacilos gram-negativas (BGN) produtoras de carbapenemase. Um total de 205 BGN foram recuperados a partir de diferentes amostras clínicas, resistentes a carbapenemases. Os genes de resistência *bla_{KPC}* (57,5%), *bla_{VIM}* (30,2%), *bla_{GES}* (17%), *bla_{NDM}* (15%) e *bla_{SPM}* (2,4%) foram recuperados a partir de isolados clínicos. O gene *bla_{IMP}* não foi detectado em nenhum dos isolados. É preocupante que *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* representem a maioria dos isolados (61,6%) recuperados de infecções de diferentes sítios, com alta resistência a carbapenêmicos, carregando simultaneamente os genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* e *bla_{VIM}*, assim como encontrados também em Enterobacteriaceae. A carbapenemase mais prevalente foi *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}*, seguida de *bla_{NDM}* dentre os isolados multidroga resistentes. Esses resultados são um ameaça à saúde pública, configurando altas taxas de resistência, limitando as opções terapêuticas.

Palavras-chave: Bactérias gram-negativas; Carbapenemase; Multidroga resistente; Epidemiologia molecular.

Abstract

Resistance to carbapenemases in gram-negative bacilli (BGN) has become a worldwide problem, increasing the rate of morbidity and mortality. The automated method was used for identification and susceptibility of isolates. And the molecular method was applied in the detection of gram-negative bacilli (BGN) producing carbapenemase. A total of 205 BGN were recovered from different carbapenemase-resistant clinical specimens. Resistance genes *bla_{KPC}* (57,5%), *bla_{VIM}* (30,2%), *bla_{GES}* (17%), *bla_{NDM}* (15%) and *bla_{SPM}* (2,4%) were recovered from clinical isolates. The *bla_{IMP}* gene was not detected in any of the isolates. It is worrying that *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* represent the majority of isolates (61.6%) recovered from infections at different sites, with high resistance to carbapenems, carrying simultaneously the *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* and *bla_{VIM}* genes, as well as found in Enterobacteriaceae. The most prevalent carbapenemase was *bla_{KPC}* and *bla_{VIM}*, followed by *bla_{NDM}* among the resistant multidrug isolates. These results are a threat to public health, configuring high rates of resistance, limiting therapeutic options.

Keywords: Gram-negative bacteria; Carbapenemase; Resistant multidrug; Molecular epidemiology.

Resumen

La resistencia a las carbapenemasas en los bacilos gram-negativos (BGN) se ha convertido en un problema mundial, aumentando la tasa de morbilidad y mortalidad. Se utilizó el método automatizado para la identificación y susceptibilidad de los aislamientos. Y el método molecular se aplicó en la detección de bacilos gram-negativos (BGN) productores de carbapenemasa. Se recuperó un total de 205 BGN de diferentes muestras clínicas resistentes a las carbapenemasas. Los genes de resistencia *bla*_{KPC} (57,5%), *bla*_{VIM} (30,2%), *bla*_{GES} (17%), *bla*_{NDM} (15%) y *bla*_{SPM} (2,4%) se recuperaron de los aislados clínicos. El gen *bla*_{IMP} no se detectó en ninguno de los aislamientos. Es preocupante que *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* representen la mayoría de los aislamientos (61,6%) recuperados de infecciones en diferentes sitios, con alta resistencia a los carbapenémicos, que portan simultáneamente los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{GES} y *bla*_{VIM}, así como los encontrados en Enterobacteriaceae. La carbapenemasa más prevalente fue *bla*_{KPC} y *bla*_{VIM}, seguida de *bla*_{NDM} entre los aislados de múltiples fármacos resistentes. Estos resultados son una amenaza para la salud pública, configurando altas tasas de resistencia, limitando las opciones terapéuticas.

Palabras clave: Bacterias gram-negativas; Carbapenemasa; Multifármaco resistente; Epidemiología molecular.

1. Introdução

Infecções por bacilos gram-negativos produtores de carbapenemases surgiram como uma grande ameaça e está associada a altas taxas de mortalidade (Nordmann, Poirel, 2019; Wilson, Török, 2018).

A prevalência da produção de carbapenemase apesar de estar disseminada mundialmente, essa distribuição varia de acordo com as regiões do mundo. A resistência a carbapenemase em bactérias não fermentadoras incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* embora menos freqüente, apresenta uma ameaça mundial na Alemanha (Hagemann et al, 2018), na Estônia (Telling et al, 2018), na Bulgária (Petrova et al, 2017), na América Latina (Labarca et al, 2016) representando um desafio emergente para a saúde pública agentes terapêuticos ativos contra esses patógenos.

Além disso, a resistência a carbapenemase em Enterobacterales se espalha rapidamente tornando-se endêmicos em alguns países como na Tunísia que chega a 81,6% (Ben Helal et al, 2018), no norte da Califórnia (38,7%) (Senchyna et al, 2019), na China (89%) (Zhang et al, 2018) e Egito (33,8%) (Soliman et al, 2020), assim como também é observado na América Latina incluindo Brasil, Colômbia, Argentina e México (Escandón-Vargas et al, 2017). Geralmente essas infecções causadas por Enterobacterales produtora de carbapenemase são mais comuns no trato urinário, na corrente sanguínea e infecções do trato respiratório (Oteo et al, 2013). E os antibióticos comumente usados no tratamento são geralmente inativos contra CPE.

Os principais grupos de carbapenemase mais comumente encontrados incluem KPC, NDM e OXA-48 (Iovleva; Doi, 2017), limitando desta forma as opções terapêuticas. A rápida expansão da resistência adquirida aos carbapenemes é cada vez mais propagada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos que transferem genes de carbapenemase intra e entre as BGN (Brink, 2019). Os genes da β -lactamase carregados em elementos genéticos móveis são importantes para a rápida disseminação de BGN resistentes à antibióticos em todo o mundo (Logan; Weinstein, 2017). As carbapenemases VIM, NDM, KPC, OXA-48 e IMP são as mais comumente encontradas em centros de saúde incluindo, Grécia, Guatemala, Itália, Espanha, Sérvia e Vietnã (Peirano et al, 2018). Diante disso, o objetivo desse estudo foi analisar a epidemiologia molecular de bacilos Gram-negativos multidrogas resistente produtores de carbapenemases isoladas de diferentes sítios de infecção em um hospital de referência do Estado de Pernambuco, Brasil.

2. Metodologia

Trata-se de um estudo observacional, no qual os bacilos gram-negativos foram isolados de amostras de diferentes sítios de infecção de pacientes de várias unidades do hospital público de referência do Estado de Pernambuco. Foram recuperados 205 isolados por demanda espontânea, no qual foram isolados e identificados bioquimicamente quanto a espécie bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em sistema automatizado VITEK 2 (BIOMERIEUX®). Os isolados foram

mantidos em estoque congelado com glicerol 15% a -80°C para realização das análises moleculares.

Análise molecular

O DNA bacteriano foi extraído através de kit de Extração de DNA da Promega®. Uma colônia pura de cada isolado foram incubados durante 24h a 37°C em ágar MacConkey (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) suspensa em 200 µL de Tris-EDTA pH 8,0. A suspensão foi centrifugada a 13.000 rotações por minuto durante 2 minutos, a suspensão foi descartada e a partir do pellet foi realizado a extração de DNA de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada usando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

Detecção de Carbapenemases em BGN

Todos os isolados resistentes ao carbapenem foram rastreados por PCR para os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}* usando iniciadores e condições específicos listados em tabela 2.

Condições da PCR para identificação dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{GES}*

Os genes de resistência *bla_{KPC}* e *bla_{GES}* foram investigados utilizando os primers 5'-ATGTCAGTGTATCGCCGTCTAGTTC -3' e 5'-CAATCCCTCGAGCGGAGTC -3' para detecção de *bla_{KPC}*. E os primers 5'-CTATTACTGGCAGGGATCG -3' e 5'-CCTCTCAATGGTGTGGGT -3' para detecção de *bla_{GES}*. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo. As amplificações do gene *bla_{KPC}* foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C. A amplificação do gene *bla_{GES}* utilizou as seguintes condições: 3 min a 93°C para desnaturação inicial; seguido de 40 ciclos de 1 min à 93°C, 1 min à 55°C e 1 min à 72°C, e 7 min à 72°C para extensão final (Wang et al, 2006).

Condições da PCR para identificação dos genes *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM}*

Os genes de resistência *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* foram investigados pela técnica de PCR, com os primers descritos por Mendes, 2007. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo. As amplificações dos genes de MBL foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, para anelamento dos primers: 1 minuto à 60°C para *bla_{IMP}* e *bla_{SPM}* (Mendes, 2007) e 1 minuto à 62°C para *bla_{VIM}* e para extensão, 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizado uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68°C.

A presença do gene *bla_{NDM}* foi investigada utilizando os primers descritos na literatura (Nordmann et al., 2011). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 50 µl por tubo, compreendendo: 2µl de DNA genômico, 2,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 0,125 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,1 µmol dos primers. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições térmicas de ciclagem: 10 min à 94° C para desnaturação inicial, 36 ciclos de amplificação consistindo em 30s à 94 °C, 40s à 52° C, 50s à 72° C e para a extensão final 5 min à 72° C.

Condições da PCR para identificação dos genes *bla_{OXA-48}*

A presença do gene *bla_{OXA-48}* foi investigada utilizando os primers descritos por Poirel et al, 2011. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 2 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ e 3,5 pmol dos primers. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições térmicas de ciclagem: 5 min à 94° C para desnaturação inicial, 35 ciclos de amplificação consistindo em 60s à 94 °C, 45s à 55° C, 60s à 72° C e para a extensão final 7 min à 72° C.

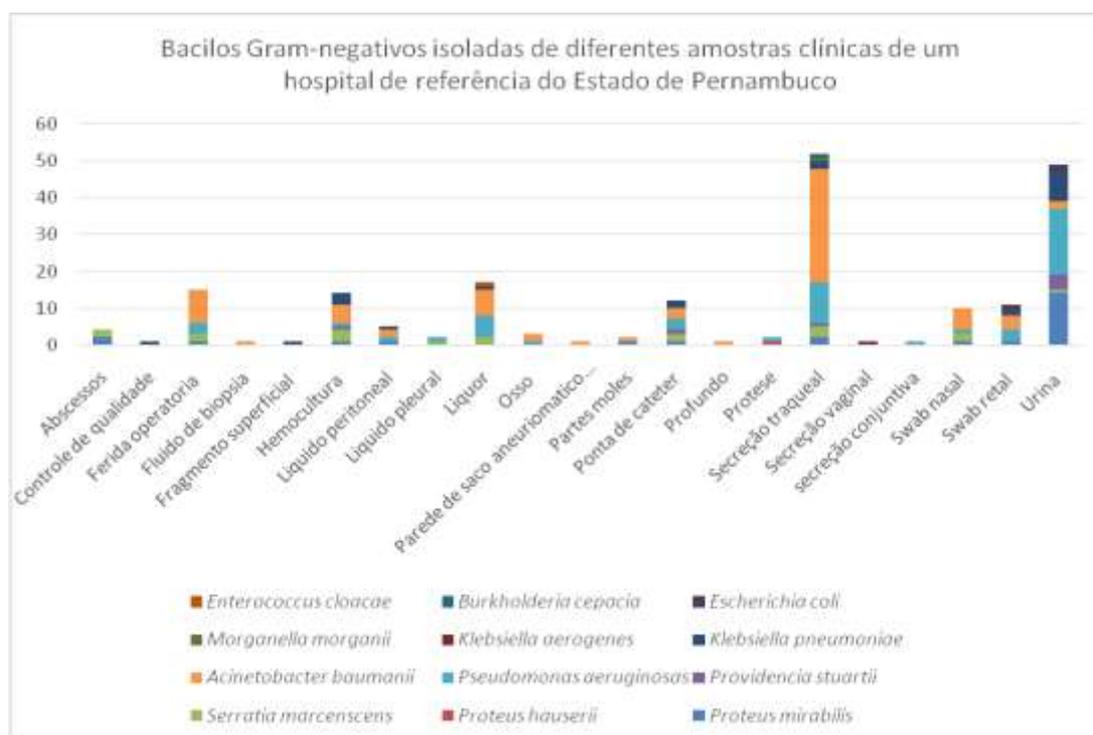
Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética (CAAE: 20195119.3.0000.5586) número de parecer 3.787.364 e (CAAE: 20195119.3.3001.5198) número de parecer 3.838.892, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

3. Resultados

Um total de 205 bacilos Gram-negativos foram isoladas de diferentes sítios de infecções de pacientes atendidos em hospital de referência no estado de Pernambuco, Brasil. Do total de 205 isolados, a maioria foram de amostra de secreção traqueal 52 (25,37%), seguida de amostras de urina 48 (23,9%), liquor 17 (8,3%), ponta de cateter 12 (5,8%), swab retal 12 (5,8%) e swab nasal 10 (4,8%), ferida operatória 15 (7,31%), hemocultura 14 (6,8%), líquido peritoneal 5 (2,4%), líquido pleural 2 (1%), abscesso 4 (2%), osso 3 (1,5%), partes moles 2 (1%), outros fluidos corporais 8 (4%). Entre 205 isolados, 76 (37%) foram *A. baumannii*, 51 (25%) *P. aeruginosa*, 25 (12,7%) *Proteus spp*, 20 (9,75%) *K. pneumoniae*, 18 (8,8%) *Serratia marcescens*, 7 (3,4%) *Providencia stuartii*, 2 (1%) *E. coli*, 2 (1%) *Klebsiella aerogenes*, 1 (0,5%) *Enterobacter cloacae*, 1 (0,5%) *Morganella morganii*, e 1 (0,5%) *Burkholderia cepacia* (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição dos isolados bacterianos Gram-negativos multidroga resistentes isolados de diferentes sítios de infecção.



Fonte: Autores.

Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana

Todos os isolados gram-negativos multidroga resistente (MDR) foram analisados de acordo com a definição do ponto de corte clínico BrCAST versão 10.0 (www.brkast.org.br). Dos isolados de *Proteus mirabilis*, 17 foram produtores de *bla*_{NDM} e 11 de *bla*_{KPC}, apresentando maior resistência à aminoglicosídeos, betalactâmico, cefalosporinas de 2^a, 3^a e 4^a geração e fluoroquinolonas. A resistência intrínseca à colistina e polimixina B foi observada principalmente em *Proteus* spp, *Serratia marsecens*, *Providencia stuartii* e *Klebsiella* spp.

Alto nível de resistência foi observado em cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, cefuroxima axetil, cefepima, ceftazidima, ceftazidima e ceftriaxona).

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos mostrou que os isolados eram mais resistentes à cefazolina (99,38%), cefuroxima (98,5%), cefuroxima/axetil (97,4%), ticarciclina/Ácido clavulânico (97,1%), imipenem (96,5%), ceftriaxona (95,6%), aztreonam (95,3%), meropenem (94,14%), ampicilina/subactam (94,1%), ceftazidima (92,2%), cefepima (89,1%), ceftazidima (87%) ertapenem (84,41%), e eram menos resistentes à ciprofloxacina (73,5%), levofloxacina (70%), ampicilina (56%), gentamicina (41,11%) e amicacina (33,3%) Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de isolados bacterianos de diferentes sítios de infecção.

Antimicrobianos	nº de isolados	nº Suscetível (%)	nº Intermediário (%)	nº Resistente (%)
Amicacina	204	114 (55,8%)	22 (10,8%)	68 (33,3%)
Ampicilina	58	2 (3,44%)	0 (0,0)	56 (%)
Ampicilina/Sulbactam	153	8 (5,22%)	1 (0,65%)	144 (94,1%)
Aztreonam	43	2 (4,65%)	0 (0,0)	41 (95,3%)
Cefepima	203	19 (9,35%)	3 (1,47%)	181 (89,1%)
Cefazolina	162	1 (0,61%)	0 (0,0)	161 (99,38%)
Cefoxitina	62	5 (8,06%)	3 (4,83%)	54 (87,09%)
Ceftazidima	205	14 (6,82%)	2 (0,97%)	189 (92,2%)
Ceftriaxona	205	6 (2,92%)	3 (1,46%)	196 (95,6%)
Cefuroxima	204	3 (1,47%)	0 (0,0)	201 (98,5%)
Cefuroxima Axetil	77	2 (2,6%)	0 (0,0)	75 (97,4%)
Ciprofloxacina	204	42 (20,6%)	12 (5,88%)	150 (73,5%)
Ertapenem	77	12 (15,58%)	0 (0,0)	65 (84,41%)
Gentamicina	204	107 (52,45%)	7 (3,43%)	90 (44,11%)
Imipenem	204	4 (1,96%)	3 (1,47%)	197 (96,5%)
Meropenem	205	12 (5,85%)	0 (0,0)	193 (94,14%)
Levofloxacina	113	34 (30,1%)	0 (0,0)	79 (70%)
Ticarciclina/Ácido clavulânico	141	4 (2,83%)	0 (0,0)	137 (97,1%)
Tobramicina	54	23 (42,6%)	0 (0,0)	31 (57,40%)
Norfloxacina	12	3 (25%)	0 (0,0)	9 (75%)
Pipe/Tazobatam	9	9 (100%)	0 (0,0)	0 (0,0)
Tigeciclina	120	96 (80%)	17 (14,16%)	7 (5,83%)
Colistina	146	130 (89%)	0 (0,0)	16 (11%)
Polimixina B	143	127 (88,8%)	0 (0,0)	16 (11,18%)

Nem todos os antibióticos foram testados para todos os 205 isolados e nem todos os valores de n somaram 205. Fonte: Autores.

Bactérias gram-negativas resistentes a carbapenemases

Dos 205 isolados que apresentaram resistência fenotípica a imipenem e meropenem, 166 (80,9%) foram positivos para a produção de carbapenemase pela detecção de genes de resistência. Os organismos mais frequentes produtores de carbapenemase foram *Proteus* spp 23 (88%), *Serratia marsecens* 18 (100%) e *Pseudomonas aeruginosa* 46 (90%) (Tabela 2). Os resultados da PCR revelam que o gene *bla*_{KPC} foi observado em 11 espécies de *Proteus mirabilis*, 16 *Serratia marsecens*, 4 *Providencia stuartii*, 44 *Pseudomonas aeruginosa*, 22 *Acinetobacter baumannii*, 16 *Klebsiella* spp., 1 *Morganella morganii*, 2 *Escherichia coli*, 1 *Burkholderia cepacia* e 1 *Enterobacter cloacae*. O gene *bla*_{NDM} foi observado em 17 *Proteus mirabilis*, 2

Serratia masecens, 2 *Providencia stuartii*, 4 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Acinetobacter baumannii*, 5 *Klebsiella spp.*

A presença de *bla_{GES}* foi constatada em 5 *Proteus mirabilis*, 16 *Serratia masecens*, 1 *Providencia stuartii*, 6 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *Acinetobacter baumannii*, 1 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Escherichia coli* e 1 *Enterobacter cloacae*.

A produção do gene *bla_{VIM}* foi observada em 20 *Pseudomonas aeruginosa*, 37 *Acinetobacter baumannii*, 5 *Klebsiella pneumoniae*. Apenas 4 isolados de *P. aeruginosa* e 1 *K. aerogenes* foram positivos para o gene *bla_{SPM}*. Um isolado apresentou o gene *bla_{OXA-48-like}*. Nenhum dos isolados apresentaram o gene *bla_{IMP}*. A presença simultânea de genes carbapenemases foi detectada em alguns isolados.

Tabela 2. Identificação dos genes de resistência dos 205 isolados bacterianos resistentes aos carbapenêmicos e a distribuição das cepas coletadas de diferentes unidades e de diferentes sítios em um hospital público de referência de Pernambuco, Brasil.

Isolado bacteriano (n)	Amostra coletada	Unidade	Genes (n) %	Resistência Antimicrobiana (n ^o)
<i>Proteus mirabilis</i> (25)	Abscesso (2)	Enfermaria (13)	KPC (11) 45,8%	AMI (4), AMP (24), ASB (23)
	Ferida operatória (1)	UTI (8)	NDM (18) 70,8%	ATM (23), CPM (23), CFO (23)
	Hemocultura (1)	SRPA (1)	GES (5) 20%	CAZ (23), CRO (23), CRX (23)
	Ponta de cateter (1)	USAN (1)		Cefuroxima Axetil (23), CIP (8), Ertapenem
	Secreção traqueal (2)	Und de Trauma (1)		(20), GEN (2), IPM (24), LVX (11), MER
	Partes moles (1)	Neurocirurgia (1)		(21), TIC (23), TOB (11)
	Urina (14)			
	Swab nasal (1)			
	Swab retal (1)			
	Líquido peritoneal (1)			
<i>Proteus hauseri</i> (1)	Secreção de prótese (1)	Enfermaria (1)	-	AMP, CFZ, CRX, Cefuroxima Axetil, CIP, IPM, LVX
<i>Providencia stuartii</i> (7)	Urina (4)	UTI (3)	KPC (4) 57,14%	AMI (1), AMP (7), ASB (7), CPM (3), CFO
	Hemocultura (1)	UTQ (1)	NDM (2) 28,6%	(4), CAZ (6), CRO (7), CRX (7),
	Ponta de cateter (1)	UCEN (1)	GES (1) 14,28%	Cefuroxima Axetil (7), CIP (1), Ertapenem
	Secreção traqueal (1)	Enfermaria (1) Sala de recuperação (1)	OXA-48 (1) 14,28%	(5), GEN (5), IPM (7), LVX (1), MER (5), TOB (1)
<i>Serratia marcescens</i> (18)	Abscesso (2)	Enfermaria (8)	KPC (16) 88,88%	AMI (8), AMP (18), ASB (18), ATM (18),
	Ferida operatória (2)	UTI (7)	NDM (2) 11,1%	CPM (17), CFO (18), CAZ (18), CRO (18),
	Líquido peritoneal (1)	Neurocirurgia (3)	GES (17) 94,4%	CRX (18), Cefuroxima Axetil (18), CIP (7),
	Líquido pleural (1)	USAN (1)		Ertapenem (18), GEN (6), IPM (18), LVX
	Secreção traqueal (3)			(8), MER (18), TIC (18), TOB (17), TIG (1)
	Hemocultura (3)			
	Ponta de cateter (2)			
	Swab nasal (2)			
	Liquor (2)			
Urina (1)				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (51)	Osso (1)	Enfermaria (21)	KPC (44) 86,27%	AMI (39), CFZ (51), CAZ (47), CRO (51),
	Ferida operatória (3)	UTI (23)	NDM (4) 7,84%	CRX (51), GEN (44), IPM (50), LVX (47),
	Secreção traqueal (11)	UTIP (2)	GES (6) 11,8%	MER (50)
	Secreção conjuntival (1)	SR (1)		
	Liquor (6)	Und de trauma (1)		
	Hemocultura (1)	UCEN (2)		
	Ponta de cateter (3)	USAN (1)		
	Urina (18)			
	Swab nasal (1)			
	Swab retal (3)			
	Líquido peritoneal (1)			
	Líquido pleural (1)			
	Protese (1)			
<i>Acinetobacter baumannii</i> (76)	Secreção traqueal (31)	Enfermaria (19)	KPC (22) 29%	AMI (12), ASB (73), CPM (73), CFZ (75),
	Fluido de biopsia (1)	UTI (42)	NDM (1) 1,31%	CAZ (73), CRO (76), CRX (76), CIP (75),
	Ferida operatória (9)	UTIP (2)	GES (4) 5,26%	GEN (19), IPM (75), MER (76),

	Swab nasal (6) Swab retal (5) Liquor (7) Líquido peritoneal (2) Hemocultura (5) Ponta de cateter (3) Osso (2) Partes moles (1) Urina (2) Parede de saco aneurismático de orta (1) Profundo (1)	UTQ (2) UCEN (2) SR (6) Neurocirurgia (3)		Ticarciclina/Ác clavulanico (76)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (20)	Liquor (1) Ponta de cateter (2) Hemocultura (3) Urina (7) Secreção traqueal (2) Líquido peritoneal (1) Fragmento superficial (1) Swab retal (2) Controle de qualidade (1)	Enfermaria (6) UTI (10) UCEN (2) Sala de recuperação (1) Não informado (1)	KPC (16) 80% NDM (4) 20% GES (1) 5%	AMI (2), ASB (20), CPM (18), CFO (15), CAZ (20), CRO (20), CRX (20), Cefuroxima Axetil (20), CIP (12), Ertapenem (19), GEN (10), IPM (19), LVX (13), MER (19), Ticarciclina/Ác clavulanico (19)
<i>Klebsiella aerogenes</i> (2)	Secreção vaginal (1) Swab retal (1)	UTI (1) Enfermaria (1)	KPC (1) 50% NDM (1) 50%	AMP (2), ASB (2), CPM (2), CFO (2), CAZ (2), CRO (2), CRX (2) Cefuroxima Axetil (2), CIP (1), Ertapenem (2), IPM (2), LVX (1), MER (2), TIC (1)
<i>Morganella morgani</i> (1)	Secreção traqueal (1)	UTI (1)	KPC (1) 100%	AMP, CFZ, CRX, Cefuroxima Axetil,
<i>Escherichia coli</i> (2)	Urina (2)	USAN (2)	KPC (2) 100% GES (1) 50%	AMP (2), ASB (2), CPM (1), CFZ (2), CFO (2), CAZ (2), CRO (2), CRX (2), Cefuroxima Axetil (2), Ertapenem (2), GEN (2), IPM (2), MER (2), Ticarciclina/Ác clavulanico (2)
<i>Bucoderia cepacia</i> (1)	Secreção traqueal (1)	USAN (1)	KPC (1) 100%	CRO (1)
<i>Enterbacter cloaceae</i> (1)	Liquor (1)	Enfermaria (1)	KPC (1) 100% GES (1) 100%	AMP, CFO, CRX, Cefuroxima Axetil, IPM, MER,

UTI – Unidade de Terapia Intensiva, UTIP – Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica, UTQ – Unidade de Tratamento de Queimados, UCEN – Unidade de Cuidados Especiais Neonatos, USAN – Unidade de Serviço em Atendimento Neurológico, SR – Sala de Recuperação, SRPA – Sala de Recuperação Pós-Anestésica. Fonte: Autores.

4. Discussão

Infecções relacionadas a bacilos Gram-negativos multidroga resistentes, especialmente a carbapenemases estão se tornando cada vez mais freqüentes, tornando uma ameaça à saúde pública, limitando cada vez mais as opções terapêuticas. No presente estudo a maioria dos isolados foram recuperados de secreção traqueal 52 (25,3%) e urina 49 (24%). Sendo a maioria dos isolados predominante de UTI (100) e enfermaria (70), 170 (82,9%).

Um estudo de Gana mostrou maior freqüência de infecções em amostras de urina (34,5%), sepse (14,5%), secreção de ferida (11%) resistentes a múltiplos medicamentos (Agyepong et al, 2018).

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados apresentou alto nível de resistência à cefazolina, cefuroxima, ticarciclina/ácido clavulânico, imipenem, meropenem, observado em outros estudos como na Índia (Mohapatra et al, 2018), no México (Uc-Cachón et al, 2019). Em contrapartida, outro estudo mostrou perfil de resistência mais freqüente em aminoglicosídeo e fluoroquinolonas (Zeynudin et al, 2018).

As bactérias não fermentadoras 127 (61,9%) representam a maioria, sendo 51 *Pseudomonas aeruginosa* e 76 *Acinetobacter baumannii*, destes apresentam pelo menos um gene de resistência a carbapenemase em *P. aeruginosa* (49) e em *A. baumannii* (42).

Em nosso estudo a produção de carbapenemase foi de 80,9% (166), com altas taxas entre *Serratia marcescens* e *Klebsiella* spp (100%), *Pseudomonas aeruginosa* (96%) e *Proteus* spp. (88,5%). Dados semelhantes foram observados de resistentes a carbapenemase (74,5%) em BGN, com altas taxas entre *A. baumannii* (89%) e *K. pneumoniae* (78%). As maiores taxas de resistência foram encontradas em agentes penicilinas e cefalosporinas, realizadas por triagem fenotípica em um estudo no Sudão (Dirar et al, 2020).

Dentre 127 bacilos Gram-negativos não fermentadores resistentes a carbapenêmicos 91 (71,6%) produziram carbapenemases. Resultados semelhantes foram observados em estudos recentes, no qual um total de 86% dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemase produziram carbapenemases classe B. E que 60% dos isolados de *A. baumannii* produtores de carbapenemase classe D produzem carbapenemases do tipo OXA (Simmer et al, 2017). Além disso, os genes de metalo-β-lactamase (NDM) carbapenemase de Nova Delhi foram detectados em 92% entre as enterobactérias (Dretler et al, 2020). No presente estudo foi encontrado uma porcentagem relativamente baixa de detecção de carbapenemases dos tipos NDM, SPM e IMP, o que tem sido comumente relatado em outros estudos no Brasil (Carvalho-Assef, et al, 2013, Ferreira et al, 2016 e Firmo et al, 2019).

Os resultados revelaram que *bla_{KPC}* foi o mais prevalente 118 (57,5%), seguido por *bla_{VIM}* 62 (30,2%), depois *bla_{GES}* 35 (17%), *bla_{NDM}* 31 (15%) e *bla_{SPM}* 5 (2,4%). Curiosamente, alguns isolados abrigavam mais de um tipo de metalo-β-lactamase. Seis isolados de *Proteus mirabilis* abrigavam *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, e três destes isolados também abrigavam o gene *bla_{GES}*. Embora, o gene *bla_{KPC}* tenha sido identificado em isolados de *Klebsiella* spp desde então, já foram documentadas nas Américas (Castanheira et al, 2020, Cuaical-Ramos et al, 2019) incluindo o Brasil (Firmo et al, 2020, Araújo et al, 2018). A carbapenemase *bla_{VIM}* foi predominante, seguida de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em infecção da corrente sanguínea em um estudo Grego (Papadimitriou-Olivgeris et al, 2019), diferentemente do nosso estudo, o qual mostrou uma predominância de 57,5% (118/205) entre *bla_{KPC}*.

O gene *bla_{VIM}* foi relatado como o segundo gene mais prevalente com 30,2% entre os isolados *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. O gene *bla_{VIM-4}* já foi encontrado em isolados de *P. aeruginosa* produtoras de metalo β-lactamases (Merradi et al, 2019). Isolados de *P. aeruginosa* (20) que carregavam simultaneamente os genes *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}* MDR, suscetíveis apenas à colistina, conforme já relatado em estudos (Pacheco et al, 2019). Giriya e colaboradores (2018) mostraram uma detecção de *bla_{VIM}* em 34,24% em isolados de *A. baumannii* de infecção do trato urinário, não apresentando genes *bla_{IMP}* e *bla_{NDM}*. Em nosso estudo o gene *bla_{NDM}* foi documentado em *Proteus*

mirabilis, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella aerogenes*. Na China o gene *bla_{NDM-5}* foram identificados em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* e *Escherichia coli*, apresentaram resistência significativamente alta aos antibióticos β-lactâmicos, sendo suscetíveis à tigeciclina e colistina. As estirpes de *K. pneumoniae* e *K. aerogenes* foram respectivamente definidas como isolados clonais homólogos por electroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (Tian et al, 2020). O gene *bla_{OXA-48-like}* foi detectado em apenas um isolado de *Providencia stuartii*. Relatado anteriormente no Nepal (Sah et al, 2019), Italia (Barbarini et al, 2015). A presença do gene *bla_{IMP}* não foi detectada em nenhum dos isolados. Resultado semelhante encontrado no Egito (Hassuna et al, 2020). Nenhum dos isolados com resistência intrínseca à colistina abrigava gene *mcr-1*, similar em estudo (Lopes et al, 2020).

Os resultados mostraram uma alta taxa de resistência ao carbapenem. Apresentando isolados que abrigam mais um gene simultaneamente. Três isolados de *Proteus mirabilis* expressaram simultaneamente os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{GES}*. Um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* expressou os genes *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* e *bla_{SPM}* simultaneamente. Outro isolado de *P. aeruginosa* abrigava os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{VIM}*. Assim como também foi encontrado em três isolados de *P. aeruginosa* os genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* e *bla_{VIM}* simultaneamente. Em 14 isolados de *Acinetobacter baumannii* foram detectados simultaneamente os genes *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}*. Em dois isolados foram detectados os genes *bla_{KPC}* e *bla_{GES}*. E em apenas um isolado de *A. baumannii* foi encontrado simultaneamente os genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* e *bla_{VIM}*. Em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* abrigava simultaneamente os genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* e *bla_{VIM}*. E em 4 isolados *K. pneumoniae* expressavam os genes *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}*. Os genes *bla_{KPC}* e *bla_{GES}* foram detectados simultaneamente em isolados de *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacea*.

A coexistência simultânea de diversas β-lactamases também foram detectados no Egito (Benmahmod et al, 2019), no Iran (Kiaei et al, 2019), no Líbano (Yaghi et al, 2020).

Na China, espécie de *Klebsiella pneumoniae* co-abrigava os genes *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}* (Yan et al, 2017). A coexistência dos genes *bla_{NDM-5}* e *bla_{OXA-181}* já foram identificados em um hospital terciário da Coréia em isolados de *E coli* (Baek et al, 2019). No Brasil, culturas ativas de vigilância de pacientes de UTI de um hospital do Rio de Janeiro, co-abrigava até quatro carbapenemases NDM, KPC, OXA-48 e VIM (Flores et al, 2020). Em *P. mirabilis* e *S. marcescens* foi descrito a associação de *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}* em Pernambuco, Brasil (Firmo et al, 2020). O gene *bla_{NDM}* foi detectado em um isolado de *Klebsiella aerogenes* pela primeira vez como citado (Soares et al, 2020) e o gene *bla_{SPM}*. Os genes *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* e *bla_{NDM}* foram os mais comuns relatados no estudo, assim como os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foram os mais comuns na China (Wang et al., 2018).

Resistência a carbapenemase em gram-negativos tem sido causa de grande preocupação para a saúde pública, tornando-se cada vez mais difíceis de tratar infecções por cepas metalo-β-lactamases.

5. Considerações Finais

As carbapenemases foram frequentes nestes isolados de gram-negativas, principalmente os genes *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* e *bla_{NDM}*. O conhecimento sobre a epidemiologia local dessa bactéria produtora de metaloβ-lactamases é fundamental para estabelecer uma estratégia terapêutica apropriada. A prevalência de gram-negativas produtoras de carbapenemase tem se tornado grande preocupação na rotina clínica, uma vez que, o aumento da resistência tem limitado as opções de terapia empírica, tornando-se um desafio o tratamento de infecções anteriormente tratáveis.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os funcionários do Laboratório de Bacteriologia do HR por fornecer os isolados de gram-negativas e ao Instituto Aggeu Magalhães pela infraestrutura e a todos que contribuiu para elaboração do manuscrito.

Referências

- Agyepong, N., et al. (2018). Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in a teaching hospital in Ghana. *Antimicrob Resist Infect Control*. 9;7:37.
- Araújo B. F., et al. (2018). Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *J Med Microbiol*. 67(4):523-528.
- Baek, J. Y., et al. (2019). Plasmid analysis of *Escherichia coli* isolates from South Korea co-producing NDM-5 and OXA-181 carbapenemases. *Plasmid*. 104:102417.
- Barbarini, D., et al. (2015). Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in an Italian setting: report from the trench. *Infect Genet Evol*. 30:8-14.
- Ben Helal, R., et al. (2018). Occurrence and Characterization of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital. *Microb Drug Resist*. 24(9):1361-1367.
- Benmahmod, A. B, et al. (2019). Prevalence and Mechanisms of Carbapenem Resistance Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Egypt. *Microb Drug Resist*. 25(4):480-488.
- Brink, A. J. (2019). Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis*. 32(6):609-616.
- Carvalho-Assef, A. P, et al. (2013). Isolation of *Providencia rettgeri* producing NDM in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 68: 2956 - 2957.
- Castanheira, M, et al. (2020). Meropenem-Vaborbactam Activity against Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates Collected in U.S. Hospitals during 2016 to 2018. *Antimicrob Agents Chemother*. 64(2). pii: e01951-19.
- Cuaical-Ramos, N. M, et al. (2019). Genetic variability of carbapenemase KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated at different states in Venezuela. Variabilidad genética de *Klebsiella pneumoniae* con carbapenemasa tipo KPC proveniente de diferentes estados de Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 37(2):76-81.
- Dirar, M, et al. (2020). Resistance Patterns and Phenotypic Detection of β -lactamase Enzymes among Enterobacteriaceae Isolates from Referral Hospitals in Khartoum State, Sudan. *Cureus*. 13;12(3):e7260.
- Dretler, A.W, et al. (2020). High Rates of New Delhi Metallo- β -Lactamase Carbapenemase Genes in Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 102(2):384-387.
- Escandón-Vargas, K, et al. (2017). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 15(3):277-297.
- Ferreira, A M, et al. (2016). First report of a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing metallo- β -lactamase in New Delhi in Brazil. *J Hosp Infect*. 94: 73-74.
- Firmo, E. F, et al. (2019). Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzymes genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratiamarcescens* clinical isolates in Brazil. *J GlobAntimicrobResist*. 21:255-61
- Firmo, E. F, et al. (2020). Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 21:255-261
- Flores, C, et al. (2020). Genetic Relatedness of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Co-Occurring VIM, KPC, and OXA-48 Enzymes from Surveillance Cultures from an Intensive Care Unit. *Microb Drug Resist*. 26(10):1219-1226
- Girija, S A, et al. (2018). Prevalence of VIM- and GIM-producing *Acinetobacter baumannii* from patients with severe urinary tract infection. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 65(4):539-550
- Hagemann, J. B, et al. (2018). KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. *J Antimicrob Chemother*. 1;73(7):1812-1814
- Hassuna, N. A, et al. (2020). Molecular Epidemiology and Mechanisms of High-Level Resistance to Meropenem and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist*. 13:285-293
- Iovleva, A., & Doi, Y. (2017). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med*. 37(2):303-315
- Kiaei, S, et al. (2019). Emergence of co-existence of bla_{NDM} with rmtC and qnrB genes in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in burning center from southeast of Iran. *Folia Microbiol (Praha)*. 64(1):55-62
- Labarca, J. A., et al. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 42(2):276-92
- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 15;215(suppl_1):S28-S36
- Lopes, E, et al. (2020). Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in northern Portugal: Predominance of KPC-2 and OXA-48. *J Glob Antimicrob Resist*. (20):30101-6
- Mendes, R. E., et al. (2007). Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J ClinMicrobiol*. 45(2):544-7. 10.1128/JCM.01728-06.
- Merradi, M, et al. (2019). Occurrence of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an Algerian hospital. *J Infect Dev Ctries*. 13(4):284-290.

- Mohapatra, D. P., et al.. (2018). Extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacteria in a tertiary-care hospital in Eastern India: A 4-year retrospective study. *J Glob Antimicrob Resist.* 15:246-249
- Nordmann, P., et al. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 13;69(Suppl 7):S521-S528
- Oteo, J, et al. (2013). Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Program. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(12):6344-7.
- Pacheco, T., et al. (2019). Pseudomonas aeruginosa Coharboring BlaKPC-2 and BlaVIM-2 Carbapenemase Genes. *Antibiotics (Basel)* 20;8(3). pii: E98.
- Papadimitriou-Oliveris, M, et al. (2019). Reversal of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae epidemiology from blaKPC- to blaVIM-harboring isolates in a Greek ICU after introduction of ceftazidime/avibactam. *J Antimicrob Chemother.* 1;74(7):2051-2054
- Peirano, G, et al. (2018). Genomic epidemiology of global Carbapenemase - producer of Enterobacter spp., 2008-2014. *Emerg Infect Dis.* (6):1010-1019
- Petrova, A. P, et al. (2017). Carbapenemase Production of Clinical Isolates Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa from a Bulgarian University Hospital. *Folia Med (Plovdiv).* 20;59(4):413-422.
- Poirel, L., et al. (2012). Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 56 (1): 559-562. 10.1128 / AAC.05289-11
- Sah, R, et al. (2019). Detection of Pan drug resistance OXA-48 producing Providencia in an ICU patient for the first time in Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control.* 8:155.
- Senchyna, F, et al. (2019). Diversity of resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a health care system in Northern California, from 2013 to 2016. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 93(3):250-257
- Simner, P. J, et al. (2017). Carbapenemase Detection among Carbapenem-Resistant Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 55(9):2858-2864.
- Soares, C. R. P., et al. (2020). First report of a bla_{NDM}-resistant gene in a *Klebsiella aerogenes* clinical isolate from Brazil. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.* 21;54:e02622020.
- Soliman, A. M, et al. (2020). Genetic analysis of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated from a university teaching hospital in Egypt. *Infect Genet Evol.* 77:104065.
- Telling, K., et al. (2018). Multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa in Estonian hospitals. *BMC Infect Dis.* 11;18(1):513
- Tian D, et al. (2020). Dissemination of the bla_{NDM-5} Gene via IncX3-Type Plasmid among Enterobacteriaceae in Children. *mSphere.* 5(1). pii: e00699-19
- Uc-Cachón, A. H., et al.. (2019). High Prevalence of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Isolated Bacilli in Intensive Care Units at a Tertiary-Care Hospital in Yucatán Mexico. *Medicina (Kaunas).* 13;55(9):588
- Wang, C, et al. (2006). An isolate of Pseudomonas aeruginosa that produces the extended spectrum beta-lactamase GES-5. *J Antimicrob Chemother.* 57 (6): 1261-2. 10.1093 / jac / dk1116
- Wang, Q, et al. (2018). Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Data From a Longitudinal Large-scale CRE Study in China (2012-2016). *Clin Infect Dis.* 13;67(suppl_2):S196-S205
- Wilson, H., & Török, M. E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb Genom.* 4(7):e000197.
- Yaghi, J, et al. (2020). Unusually High Prevalence of Cosecretion of Ambler Class A and B Carbapenemases and Nonenzymatic Mechanisms in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Lebanon. *Microb Drug Resist.* 26(2):150-159
- Yan, J, et al. (2017). Multidrug Resistance Mechanisms of Carbapenem Resistant Klebsiella pneumoniae Strains Isolated in Chongqing, China. *Ann Lab Med.* 37(5):398-407
- Zeynudin, A., et al.. (2018). Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of gram-negative bacilli in Jimma, Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 20;18(1):524
- Zhang, Y., et al. (2018). Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother.* 25;62(2):e01882-17