

LAURO VIEIRA PERDIGÃO NETO

**Microrganismos gram-negativos multirresistentes:
mecanismos de resistência e alternativas terapêuticas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna Sara Shafferman
Levin

**SÃO PAULO
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Perdigão Neto, Lauro Vieira
Microorganismos gram-negativos multirresistentes
: mecanismos de resistência e alternativas
terapêuticas / Lauro Vieira Perdigão Neto. -- São
Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Anna Sara Shafferman Levin.

Descritores: 1.Bactérias gram-negativas
2.Resistência microbiana a medicamentos 3.Genes MDR
4.Carbapenêmicos 5.Polimixinas 6.Sequenciamento
completo do genoma 7.Testes de sensibilidade
microbiana 8.Fosfomicina 9.Sinergismo farmacológico

USP/FM/DBD-458/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Avia, meu filho, vai estudar”

(Mãe)

DEDICATÓRIA

A meus pais José Feitosa e Vilma Perdigão, pela dedicação para comigo e
para com toda nossa família.

A meus irmãos, cunhada e sobrinhos, pela torcida.

Ao Kelson, pelo companheirismo e por concordar com todas as aventuras.

Dedico esta tese a vocês, por quem tenho amor infinito.

AGRADECIMENTOS

À Professora Anna Sara Levin, pelos ensinamentos, pela retidão, pela motivação, pela honestidade, pela inspiração, por ter me recebido como seu aluno e por acreditar sempre.

À Professora Sílvia Costa, pela amizade, pela liderança, pelo exemplo de dedicação profissional e pela energia inesgotável.

Aos amigos do GCIH. Bia, Sueli, Luiz, Renata e Ana Rúbia, vocês são muito importantes para meu aprendizado e co-responsáveis por essa tese ter acontecido. Tenho muito orgulho de ser desse time.

Ao LIM54. Sou grato pela paciência de todos que me ensinaram e que puderam participar desse processo de construção, em especial a Inneke, Andréia, Camila, Mariama, Gleice, Ana Paula, Roberta, Tatiana e Juzinha.

Aos amigos da CCIH do Instituto Central do HCFMUSP. Obrigado a todos da equipe, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar a encontrar locais desconhecidos e a meu lado fazer a pesquisa acontecer.

À Farmácia do HCFMUSP, que sempre se mostrou parceira, em especial às farmacêuticas Gabriela e Ana Carolina.

Ao Laboratório de Microbiologia do HCFMUSP, responsável pela detecção e guarda dos microrganismos utilizados nessa pesquisa. Minha gratidão em especial aos que participaram diretamente desse processo: Dra Flávia Rossi, Rosilaine, Luciana Santana e Débora Barros. À Ana Paula Cury, obrigado pelo carinho, pela amizade e pela disponibilidade em tirar minhas dúvidas.

À Mârcia do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, pela paciência em me ajudar a desvendar os mistérios da Plataforma Brasil. À Roseli, pelo suporte sobre a pós-graduação.

Aos amigos da CCIH do Hospital Geral de Fortaleza: Christianne Takeda, Lia Fernandes e Lucianna Auxi, que se mobilizaram com tanta atenção e com tanto carinho para a extensão da pesquisa a seu hospital.

Aos pacientes e seus responsáveis, pela disponibilidade em participar dos estudos.

Aos profissionais da CCIH do Hospital Paulistano, pela compreensão de uma jornada de pós-graduação. À Ana Paula Porto, a gratidão de ter me permitido

conhecer essa casa. A Daila, Sandrinha, Eloísa, Chayenne e Brunno, conviver com vocês é tão divertido quanto engrandecedor.

Aos membros da banca de qualificação (Prof Antonio Carlos Campos Pignatari, Prof Ícaro Boszczowski e Prof Nilton Lincopan), pelos ajustes e sugestões tão pertinentes para essa pesquisa.

Aos demais amigos construídos durante esse anos, vocês foram muito importantes nessa caminhada. Anninha, Elisa, Denise, Gladys, Evelyn e Lígia: obrigado pelas risadas, pelos conselhos, pela germinação, pelos brindes sociais que deixaram a rotina mais leve, por resgatarem a TV Pirata, pela inspiração profissional e pelos planos mirabolantes. Aos amigos André Benatti e Milena Castro, por tornarem os dias mais divertidos.

À Maura. Pelo que você representa para todos. Por ter aberto um lugar na sua vida para mim. Por sua amizade. Por sua preocupação. Pelo seu equilíbrio. Por sua sensatez. Pelo seu bom humor. Pela suas inteligências. Por suas qualidades intermináveis. Pelos seus três defeitos. Pelas gargalhadas compartilhadas. Por ser uma profissional irretocável. Nos momentos a seu lado, tudo é mais fácil, mais divertido. Tudo é possível, inclusive começar, desenvolver e terminar essa tese. Tenho orgulho de ser seu colega de trabalho e seu amigo.

Recebi muita força e muita torcida de longe desde os primeiros dias do caminho dessa pesquisa. Sou muito grato por essa energia.

Aos amigos do Colégio 7 de Setembro (Melissa, Azinha, Liza, Moacir, Xalalá, Bacora, Kelma e Fernanda Cremasco), de faculdade (Silviane, Laura, Jailson, Grayce, Muse, Mariana, Júnior e Juliana Sobral), de CCIH (Waldélia, Regina, Ana Paula, Luana e Dr Iran) e do Hospital São José (especialmente Ruth, Sávio, Roseanne, Bruno Tavares, Tânia, Dra Evelyne, Dr Érico). Às Satiro.

À Dra Lara, pelo exemplo de pessoa e de profissional e por ter me permitido o primeiro contato com a Prof Anna Sara.

Aos “Perdigões” e afins. Tenho uma família muito torcedora e presente, da qual tenho maior orgulho. Ao papai, à mamãe, a meus irmãos, cunhada, sobrinhos, tios, tias e primos. Administrar a saudade foi difícil.

Ao Proteus e à Leka, que nunca saberão de suas importâncias. Ao Kelson, pelo altruísmo, pela coragem e pela dedicação. Você é meu exemplo de ser humano, e minha gratidão por ter feito essa história acontecer é eterna.

Esta tese foi confeccionada no formato que enfatiza a produção de artigos científicos e está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Objetivos.....	27
3. Métodos.....	29
3.1. Desenhos e locais dos estudos.....	30
3.2. Investigação do gene <i>mcr-1</i> e a possível transmissão interespécie.....	31
3.3. Drogas alternativas a carbapenêmicos e polimixinas em gram negativos multirresistentes.....	34
3.4. Estudo clínico com fosfomicina.....	38
4. Resultados.....	44
4.1. Identificação de isolados de Enterobacteriales portadores de <i>mcr-1</i>	45
Manuscrito “Simultaneous colonization by <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> harboring <i>mcr-1</i> in Brazil”.....	46
4.2. Estudo microbiológico.....	57
Manuscrito “Alternative drugs against multiresistant Gram negative bacteria”.....	58
4.3. Estudo clínico sobre uso da fosfomicina.....	88
Manuscrito “Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pandrug resistant Gram-negative microorganisms: synergy with Meropenem.....	89
Discussão.....	108
Conclusões.....	125
Anexos.....	126
Referências.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APACHE II	- <i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
CAPpesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CONEP	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DM	- <i>Diabetes mellitus</i>
ECDC	- <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EUCAST	- <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FIC	- <i>Fractional Inhibitory Concentration</i>
FICI	- <i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
HAS	- Hipertensão Arterial Sistêmica
HCFMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HGF	- Hospital Geral de Fortaleza
IPCS-CVC	- Infecção Primária de Corrente Sanguínea associada a Cateter Venoso Central
LIM15	- Laboratório de Investigação Médica nº 15
LIM54	- Laboratório de Investigação Médica nº 54
MIC	- <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MLST	- <i>Multilocus Sequence Typing</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	- <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
SGC	- Sequenciamento de Genoma Completo
ST	- <i>Sequence Type</i>
SUS	- Sistema Único de Saúde

- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- USP - Universidade de São Paulo
- UTI - Unidade de Terapia Intensiva
- WGS - *Whole Genome Sequencing*
- WHO - *World Health Organization*

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Métodos de avaliação de sensibilidade utilizados em 50 microrganismos gram negativos multirresistentes.....	36
Quadro 2 – Pontos de corte (concentrações inibitórias mínimas em mg/L e halos em mm) utilizados na categorização de sensibilidade de 50 isolados de microrganismos gram-negativos panresistentes.....	36
Tabela 1 – Características demográficas de 13 pacientes tratados com fosfomicina endovenosa de 2013 a 2016.....	105
Tabela 2 – Características clínicas de 13 pacientes tratados com fosfomicina endovenosa de 2013 a 2016.....	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química da fosfomicina. 23
- Figura 2 – Fluxograma sobre os estudos em multirresistentes da pesquisa.31
- Figura 3 – Plasmídeo presente em cepa de *E.coli* C600 transconjugante, resultado de conjugação de isolado de *E. coli* resistente às polimixinas isolado em paciente internada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 2016..... 57
- Figura 4 – Sinergismo entre fosfomicina e meropenem em oito cepas de gram negativos panresistentes isolados de infecções tratadas com fosfomicina e meropenem combinados.....107

RESUMO

Perdigão Neto, LV. ***Microrganismos Gram-negativos multirresistentes: mecanismos de resistência e alternativas terapêuticas*** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019

Gram negativos multirresistentes têm se tornado uma ameaça em todo o mundo. Os objetivos desse estudo foram apresentar o relato de caso de uma paciente colonizada por microrganismos distintos carreadores do gene *mcr-1*, descrever sensibilidade de microrganismos multirresistentes a alternativas terapêuticas e seus mecanismos de resistência e avaliar eficácia e segurança do uso de fosfomicina endovenosa. O estudo descreve o caso de uma paciente internada colonizada concomitantemente com *E. coli* ST744 e *K. pneumoniae* ST101, ambos portadores de *mcr-1*, presente em um plasmídeo de 33.304pb. Além disso, 50 microrganismos multirresistentes (14 *A. baumannii*, 1 *P. aeruginosa*, 8 *S. marcescens* e 27 *K. pneumoniae*), frequentemente produtores de carbapenemase – *bla*_{KPC-2} (n=28; 56%), *bla*_{OXA-23} (n=11; 22%), e outros mecanismos, como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (n=49; 98%), foram avaliados quanto a opções terapêuticas a carbapenêmicos e polimixinas. Destacaram-se os desempenhos de tigeciclina (96% de sensibilidade); minociclina (100%) e doxiciclina (93%) em *A. baumannii*, ceftazidima/avibactam (96%) em *K. pneumoniae* e fosfomicina (88%) em *S. marcescens*. Por último, descrevemos uma série de 13 pacientes com infecções graves tratadas com fosfomicina. Oito pacientes (62%) foram curados. Sinergismo entre fosfomicina e meropenem foi descrito em nove (82%) isolados. Concluiu-se pela possível transmissão *in vivo* de *mcr-1* em espécies distintas, que tigeciclina, minociclina, doxiciclina, ceftazidima/avibactam e fosfomicina podem ser úteis para tratamento de gram negativos multirresistentes, e que fosfomicina é um antimicrobiano seguro e eficaz, especialmente se combinada com o meropenem.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias Gram-Negativas; Resistência Microbiana a Medicamentos; Genes MDR; Carbapenêmicos; Polimixinas; Sequenciamento Completo do Genoma; Testes de Sensibilidade Microbiana; Fosfomicina; Sinergismo Farmacológico.

ABSTRACT

Perdigão Neto, LV. **Multiresistant Gram-negative microorganisms: mechanisms of resistance and therapeutic alternatives** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Multiresistant gram negatives have become a threat worldwide. The objectives of this study were to present the case report of a patient colonized by distinct microorganisms harboring *mcr-1*; to describe susceptibility of multiresistant microorganisms to therapeutic alternatives and their mechanisms of resistance; and to evaluate the efficacy and safety of intravenous fosfomicin. The study describes the case of an inpatient colonized concomitantly with *E. coli* ST744 and *K. pneumoniae* ST101; both carried *mcr-1*, present in a 33,304bp plasmid. In addition, 50 multiresistant microorganisms (14 *A. baumannii*, 1 *P. aeruginosa*, 8 *S. marcescens* and 27 *K. pneumoniae*), that frequently produce carbapenemases – *bla*_{KPC-2} (n=28; 56%), *bla*_{OXA-23} (n= 11; 22%), and other mechanisms such as aminoglycoside modifying enzymes (n=49; 98%), were evaluated for therapeutic alternatives. The performances of tigecycline globally (96% susceptibility); minocycline (100%) and doxycycline (93%) in *A. baumannii*; as well as ceftazidime/avibactam (96%) in *K. pneumoniae*, and fosfomicin (88%) in *S. marcescens* were outstanding. Finally, we described a series of 13 patients with severe infections treated with fosfomicin. Eight patients (62%) were cured. Synergism between fosfomicin and meropenem was described in nine (82%) isolates. We concluded that there is a possible *in vivo mcr-1* transmission; that tigecycline, minocycline, doxycycline, ceftazidime/avibactam, and fosfomicin may be helpful for treating gram-negative multiresistant, and that fosfomicin is a safe and effective antimicrobial, especially if combined with meropenem.

Descriptors: Gram-Negative Bacteria; Drug Resistance, Microbial; Genes, MDR; Carbapenems; Polymyxins; Whole Genome Sequencing; Microbial Sensitivity Tests; Fosfomicin; Drug Synergism.

1 INTRODUÇÃO

A história da resistência bacteriana tem acompanhado o desenvolvimento e a comercialização dos antimicrobianos desde o início do uso dessas drogas, por volta da metade do século XX (MOHR, 2016; GONZÁLEZ, 2007). No começo da era dos antibióticos, a preocupação esteve voltada para a resistência antimicrobiana de bactérias gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus* à penicilina e aos antimicrobianos identificados nos anos subsequentes (TSERING, 2011; DELEO, 2009; GÓMEZ, 2008). Por outro lado, nas últimas décadas, uma maior apreensão tem sido deslocada para o padrão de sensibilidade dos microrganismos gram-negativos.

Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. e *Serratia marcescens*, bem como microrganismos pertencentes ao grupo dos não-fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, têm se tornado uma ameaça em todo o mundo, pela frequência de multirresistência apresentada por estes patógenos (MORENO-GARCÍA, 2017; RICE, 2012; FRITSCH, 2005). A facilidade da dispersão destes microrganismos em ambiente hospitalar, promovendo uma velocidade alarmante de disseminação de bactérias com perfil desfavorável de sensibilidade a antimicrobianos, complica este cenário, reforçando a necessidade de políticas adequadas de uso racional de antimicrobianos e prevenção de infecções cruzadas (MORENO-GARCÍA, 2017; RICE, 2012; CANTÓN, 2011).

As espécies mencionadas acima têm fenótipos de multirresistência cada vez mais frequentes, consequência da capacidade de contornar os mecanismos que as drogas possuem contra eles. A velocidade de descrição de resistência não diminui: as redes de vigilância epidemiológica nos Estados Unidos, na Europa e na Ásia têm documentado que as bactérias multirresistentes têm se tornado muito mais prevalentes durante a última década (CHRISTAKI, 2019; ECDC, 2018; WHO, 2017). Além disso, de acordo com os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), a cada ano nos Estados Unidos, pelo menos dois milhões de pessoas são infectados com bactérias multirresistentes e pelo menos 23.000 pessoas morrem como

resultado dessas infecções (CDC, 2013). Em todo o mundo, estima-se que aproximadamente 700.000 mortes sejam atribuídas anualmente à resistência antimicrobiana, e que em 2050 tal número possa chegar a 10 milhões de mortes por ano (O'NEILL, 2014).

No mundo, até 40% das infecções adquiridas em unidades de terapia intensiva (UTI) são causadas por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ou *K. pneumoniae* (THEURETZBACHER, 2017). O reconhecimento da rápida expansão da resistência aos carbapenêmicos como consequência da transferência de elementos genéticos móveis, em isolados de uma mesma espécie e entre isolados de espécies distintas, mudou a perspectiva da magnitude do problema e exige uma reavaliação dos desafios imediatos e futuros (SHORTRIDGE, 2019). Os padrões de resistência geográfica e temporal a antibióticos ao longo de 20 anos (1997–2016) do programa de vigilância SENTRY alertam para um ponto importante para o Brasil e seus países vizinhos: os gram negativos resistentes a carbapenêmicos são mais frequentemente isolados na América Latina (41,1%), seguidos pela Europa (28,4%), América do Norte (18,9%) e região Ásia-Pacífico (18,8%) (SHORTRIDGE, 2019; CHRISTAKI, 2019). Em São Paulo, Brasil, o Núcleo de Infecção Hospitalar do Centro de Vigilância Epidemiológica compila sistematicamente o resultado de sensibilidade de isolados de infecções primárias de corrente sanguínea associadas a cateter em UTI, e alguns dados chamam atenção na série histórica: de 2005 a 2018, a resistência de *A. baumannii* a carbapenêmicos foi de 20% a 89%, e de 2011 a 2018 tal perfil de resistência em *K. pneumoniae* subiu de 14% para 53% (CVE, 2019). É importante ressaltar ainda que a circulação de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos cada vez mais é descrita em pacientes sem fatores de risco para multirresistência e provenientes da comunidade (SALOMÃO, 2018), e que, devido à resistência intrínseca às polimixinas e ao alto número de genes de bombas de efluxo presentes em seus genomas, a aquisição de resistência aos carbapenêmicos em *S. marcescens* é suficiente para tornar de extrema dificuldade o tratamento das infecções por essa espécie (SANDNER-MIRANDA, 2018).

A descoberta de cada nova geração de antibióticos seguiu rapidamente a mesma tendência: uso e resistência. Vários estudos demonstraram a associação do uso de antibióticos com o surgimento de microrganismos multirresistentes. Em 2001, por exemplo, a Vigilância Europeia do Consumo de Antimicrobianos encontrou uma ligação clara entre a incidência de resistência com o uso de antimicrobianos em países europeus (GOOSSENS, 2005). É importante ressaltar que o uso excessivo desses fármacos tem sido correlacionado com prescrição inadequada de antibioticoterapia (VENTOLA, 2015). Um estudo analisou os dados de prescrições de antibióticos escritas entre 2010 e 2011 e mostrou que aproximadamente 30% das prescrições de antibióticos administrados por via oral eram desnecessárias (FLEMING-DUTRA, 2016). Além disso, em muitos países os antibióticos podem ser comprados legalmente em farmácias e na internet sem receita médica (LOBANOVSKA, 2017; MOURA, 2015).

Outro fator que contribui para a resistência aos antibióticos é o uso extensivo de antibióticos na pecuária, principalmente como promotores de crescimento e como medida de prevenção de infecções em animais de consumo (LANDERS, 2012; VAN BOECKEL, 2015; GRACE, 2015; VENTOLA, 2015). O excesso de uso de antibióticos também pode modificar o microbioma ambiental, não só pelo uso direto de conservantes para plantas, mas também através de urina e fezes excretadas por animais tratados com antibióticos. Desta forma, espécies ambientais não patogênicas ou oportunistas podem ser expostas a antibióticos e atuar como um reservatório de genes de resistência (BARTLETT, 2013; WRIGHT, 2010).

No hospital esse cenário parece ser pior, já que o uso de antimicrobianos de largo espectro é usual pela ameaça frequente de bactérias multirresistentes envolvidas em infecções hospitalares, o que promove a seleção de microrganismos com mecanismos de resistência distintos, caracterizando um ciclo vicioso (XIA, 2016).

As taxas de mortalidade por infecções por microrganismos multirresistentes são inaceitavelmente altas. Todos os anos, cerca de 25.000 e 63.000 pacientes morrem por infecções por bactérias multirresistentes na União Europeia e nos Estados Unidos, respectivamente. Os custos econômicos

estimados devido a infecções por bactérias multirresistentes na União Europeia resultam em custos adicionais de saúde e perdas de produtividade mensuradas em milhões de euros por ano (AMINOV, 2010).

Embora muito breve, a era dos antibióticos passou por muitos altos e baixos. A descoberta e o uso de antibióticos, bem como a descrição de genes cromossomais e elementos móveis, como plasmídeos, são pontos importantes dessa história. Por meio deles, os microrganismos usam os mesmos mecanismos naturais para se proteger contra a ação de antimicrobianos continuamente lançados pela humanidade desde a descoberta de antibióticos (MOHR, 2016; AMINOV, 2010; FALAGAS, 2010).

As possibilidades terapêuticas para infecções causadas por microrganismos multirresistentes têm se tornado cada vez mais difíceis, tendo em vista que a velocidade de descoberta e a disponibilização de novos antimicrobianos para uso clínico não têm acompanhado a velocidade de novos padrões de resistência bacteriana (ZHANG, 2018; FALAGAS, 2010).

Se um agente antimicrobiano inadequado é escolhido para o tratamento de infecção por microrganismos multirresistentes, a terapia pode não ser benéfica e, além disso, pode levar a um pior prognóstico. Além disso, a depender do sítio de infecção, pode haver uma escolha bastante limitada de agentes para a terapia antimicrobiana (VENTOLA, 2015). Atualmente, menos agentes antimicrobianos novos estão entrando no mercado. Considerando esta situação, juntamente com a crescente conscientização sobre a segurança das drogas, agora enfrentamos uma situação de opções severamente limitadas (THEURETZBACHER, 2017; AMINOV, 2010).

Dessa forma, o uso dos antibióticos agora está cada vez mais restrito devido ao aumento progressivo da resistência, e esse fenômeno é observado entre todos os medicamentos antimicrobianos. Cada vez mais, há relatos de espécies bacterianas que são resistentes a todos os antibióticos conhecidos. Por esse contexto, antimicrobianos antigos têm sido considerados novamente como opções interessantes de tratamento (VENTOLA, 2015).

Embora as polimixinas sejam drogas de eficácia comprovada, *in vitro*, contra bactérias gram-negativas, como as pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* e

Acinetobacter (SHORTRIDGE, 2019; GALES, 2006; LEVIN, 1999), relatos de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes às polimixinas têm sido descritos (SHORTRIDGE, 2019; MELETIS, 2011; SUN, 2011; DURANTE-MANGONI, 2011). Neste contexto de resistência a esta classe de drogas e com a possibilidade de disseminação do recém-descoberto mecanismo de transmissão horizontal de resistência a essa classe de drogas (gene *mcr-1*) (LIU, 2016), algumas pesquisas tentam evidenciar opções terapêuticas possíveis para infecções causadas por tais microrganismos (CAY, 2012). No entanto, os estudos realizados com antimicrobianos possivelmente ativos contra microrganismos multirresistentes são, em sua quase totalidade, experimentos *in vitro* (SHANKAR, 2017; APISARNTHANARAK, 2012; SANTIMALEEWORAGUN, 2011).

Alguns antimicrobianos mais antigos mantêm excelente atividade *in vitro* contra patógenos multirresistentes. Em alguns casos, o uso de agentes velhos, como aminoglicosídeos, sulfametoxazol/trimetoprim e o cloranfenicol, é limitado por características farmacocinéticas/farmacodinâmicas desfavoráveis e/ou toxicidades, mas, diante do cenário de poucas opções terapêuticas, a sensibilidade a essas drogas tem se tornado cada vez mais valiosa (KAYE, 2017) e o uso adequado e racional de novas drogas (como ceftazidima/avibactam) se faz mantatório para que não se perca rapidamente novas opções terapêuticas (GUIMARÃES, 2019). Outras classes de antimicrobianos consideradas são a tigeciclina e antigas tetraciclina (minociclina e doxiciclina). Uma possibilidade que tem ganhado atenção é a possibilidade de uso da fosfomicina (ZAYYAD, 2017).

A fosfomicina foi descoberta na Espanha em 1969, isolada a partir de culturas de cepas de *Streptomyces* spp. Estruturalmente, é definida como o ácido cis-1,2-epóxi-propil-fosfônico (C₃H₇O₄P.C₄H₁₁NO₃), um derivado do ácido fosfônico, de extremo baixo peso molecular (RAZ, 2012; YUN, 2011) (Figura 1). Quimicamente não é relacionado a outros antimicrobianos (MICHAPOULOS, 2011). Sua ação bactericida é justificada pela interferência na síntese da parede celular, tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas. Após penetrar na célula bacteriana, a molécula deste antimicrobiano se liga na enzima UDP-GlcNAc-3-O-enolpiruviltransferase

(MurA), responsável pelo primeiro passo na biossíntese de peptidoglicano, ao catalisar a formação de ácido N-acetilmurâmico (KARAGEORGOPOULOS, 2012; YUN, 2011; MICHAPOULOS, 2011). Ao inibir a atividade da enzima MurA, a fosfomicina impede a seqüência de reações de polimerização necessárias para a integridade da parede celular (MICHAPOULOS, 2011).

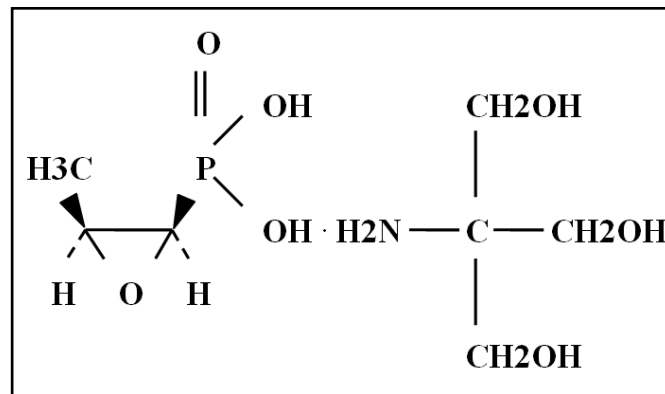


Figura 1. Estrutura química da fosfomicina. Adaptado de Michalopoulos et al., 2011.

A fosfomicina tem um espectro contra um considerável número de bactérias gram-positivas e gram-negativas (KARAGEORGOPOULOS, 2012). Na avaliação de sensibilidade a este antimicrobiano, os pontos de corte variam conforme as sociedades que padronizam testes microbiológicos (resistência se concentrações inibitórias mínimas – CIM – superiores ou iguais a 256 µg/mL para o *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI, superiores a 128 µg/mL para a *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* e superiores a 32 µg/mL para o *Committee on Antibiogram of the French Society of Microbiology* e para o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility* – EUCAST). O CLSI, no entanto, padroniza o teste com fosfomicina apenas para *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* isolados a partir de trato urinário, pelas técnicas de disco-difusão e ágar-diluição. Mesmo com diferentes pontos de corte, de acordo com estas diversas organizações, costumam ser sensíveis à fosfomicina as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* e *Salmonella typhi* selvagens e causadoras de infecções da comunidade

(FALAGAS, 2008; FALAGAS, 2010; CLSI, 2012). Além disto, a atividade *in vitro* da fosfomicina têm sido corroborada em estudos que evidenciam padrões de sinergismo com outros antimicrobianos (SANTIMALEEWORAGUN, 2011; OKAZAKI, 2002). A resistência é descrita com certa frequência em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, e *Acinetobacter baumannii* parece ser resistente a este antimicrobiano (MICHAPOULOS, 2011).

A fosfomicina entra na célula bacteriana utilizando as proteínas dos sistemas de transporte GlpT e UhpT (KARAGEORGOPOULOS, 2012). A resistência bacteriana a este fármaco decorre principalmente de mutações dos genes cromossomais responsáveis pela síntese destes sistemas de transporte. A alteração de um único sistema de transporte basta para diminuir a permeabilidade suficientemente para gerar a resistência à droga. Outra forma de resistência é a produção de enzimas capazes de inativar a fosfomicina, codificadas por genes plasmidiais; quatro enzimas (glutathione transferases) já foram identificadas como capazes de degradar a fosfomicina (MICHAPOULOS, 2011).

Por seu baixo peso molecular e meia-vida longa, a fosfomicina penetra em vários tecidos com facilidade, atingindo concentrações séricas necessárias para inibir a maioria dos patógenos. No líquido, este antimicrobiano atinge concentrações quando existe inflamação das meninges (FALAGAS, 2008). Pfausler et al. (2004) perceberam que o tempo acima da concentração inibitória mínima, nas doses de 24g/dia para paciente com meningite, foi de 98%, 92% e 61% para *Staphylococcus aureus* com CIM de 8mg/L, 16mg/L e 32mg/L, respectivamente (PFAUSLER, 2004). Outros estudos têm mostrado eficácia semelhante em microrganismos Gram-negativos (FALAGAS, 2008).

No Brasil, somente a fosfomicina oral é disponível, com o nome comercial de Monuril® (Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda.), e autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Para uso endovenoso, a apresentação comercializada em outros países é a fosfomicina dissódica (MICHAPOULOS, 2011). Tal composição é associada com uma oferta alta de sódio, o que pode se tornar uma limitação em tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca ou hemodiálise (MICHAPOULOS, 2011; FALAGAS, 2008). Apesar de não haver secreção tubular, a droga é eliminada

principalmente pela urina, em sua forma não-modificada, atingindo níveis terapêuticos em trato urinário. Em pacientes com insuficiência renal, especialmente quando o clearance de creatinina se encontra abaixo de 50mL/min, a meia vida da fosfomicina aumenta de 11 horas para 50 horas, e a quantidade de fosfomicina na urina cai em torno de 60% (RAZ, 2012; MICHAPOULOS, 2011; FALAGAS, 2008).

Os eventos adversos relacionados à fosfomicina administrada em via oral são mais frequentemente relacionados ao trato gastrointestinal (náuseas e vômitos) e à pele (RAZ, 2012). Normalmente o tratamento não precisa ser descontinuado, uma vez que os efeitos costumam ser discretos (FALAGAS, 2008). Com relação à via inalatória, foi descrito que tosse e sibilância podem ser percebidas quando do uso de fosfomicina associada a tobramicina em infecções respiratórias de pacientes com fibrose cística (TRAPNELL, 2012).

Com relação à fosfomicina intravenosa, os relatos são esporádicos. Um estudo francês avaliou a tolerância a esta droga, em um período de 67 meses. Foram incluídos 72 pacientes, com diagnósticos variados (otite, sinusite, bacteremia, pneumonia, infecções de ossos ou articulações, sistema nervoso central, trato urinário e pele e partes moles), causados mais frequentemente por bactérias representantes da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococci*. A maioria das infecções foi associada à assistência à saúde (60%). Foram avaliados, pelo menos uma vez por semana, os efeitos adversos relatados em literatura (distúrbios gastrointestinais, exantema, dor no local da injeção, flebite, eventos cardiovasculares – hipertensão ou insuficiência cardíaca –, alteração nos níveis de potássio, nas contagens de leucócitos, eosinófilos e plaquetas e nos níveis de transaminases). Vinte e cinco pacientes (34,7%) apresentaram 27 relatos de efeitos adversos atribuíveis à fosfomicina, nenhum responsável por indicação de terapia intensiva ou causador de morte. Dezenove pacientes (26%) apresentaram hipocalcemia – relacionada fortemente a uma velocidade de infusão de dose inferior a uma hora, três pacientes (4%) relataram dor no local da injeção, dois (3%) evoluíram com insuficiência cardíaca, dois (3%) com hipertensão, e um único paciente teve níveis de transaminases alterados (1%) (FLORENT, 2011). São relatados ainda ototoxicidade, nefrotoxicidade,

neutropenia e eosinofilia (FERNANDEZ-VALENCIA, 2011; MIRAKHUR, 2003; MEISSNER, 1989; SCHWEITZER, 1986). Embora sejam eventos raros, as reações de anafilaxia, incluindo o choque, já foram descritos (GAMBOA, 2011; SÁNCHEZ-MORILLAS, 2010).

Embora as indicações clínicas mais frequentes para a terapia com fosfomicina sejam as infecções do trato urinário, uma vez que é alta a concentração deste fármaco nesta topografia e que os microrganismos causadores destas infecções costumam ser sensíveis a esta droga, vários estudos mostram o papel da fosfomicina no êxito terapêutico em infecções nas mais diversas topografias, como infecções de sítio cirúrgico e de corrente sanguínea, enterite, meningite, prostatite e infecções respiratórias, causadas tanto por bactérias gram-positivas quanto por bactérias gram-negativas (RAZ, 2012; YUN, 2011; FALAGAS, 2008). A administração intravenosa de fosfomicina foi testada em pacientes críticos com sepse ou infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina e *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos; a principal conclusão destes trabalhos é que a fosfomicina pode ser uma alternativa terapêutica para as infecções por microrganismo multirresistente (SOULI, 2010; MICHALOPOULOS, 2010; YAMAGUCHI, 2009). No entanto, na maioria destas pesquisas o microrganismo causador apresentava perfil de sensibilidade favorável ao sucesso terapêutico. Faltam estudos que testem microrganismos panresistentes contra antimicrobianos antigos correlacionem sucesso ou falha terapêutica com o uso da fosfomicina em infecções por microrganismos multirresistentes.

2 OBJETIVOS

Os objetivos dessa tese são:

- 2.1. Apresentar o relato de caso de uma paciente colonizada por microrganismos distintos carreadores do gene mcr-1;
- 2.2. Descrever sensibilidade de microrganismos multirresistentes a antimicrobianos alternativos a carbapenêmicos e polimixinas e seus mecanismos de resistência;
- 2.3. Avaliar eficácia e segurança do uso de fosfomicina endovenosa em infecções causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes.

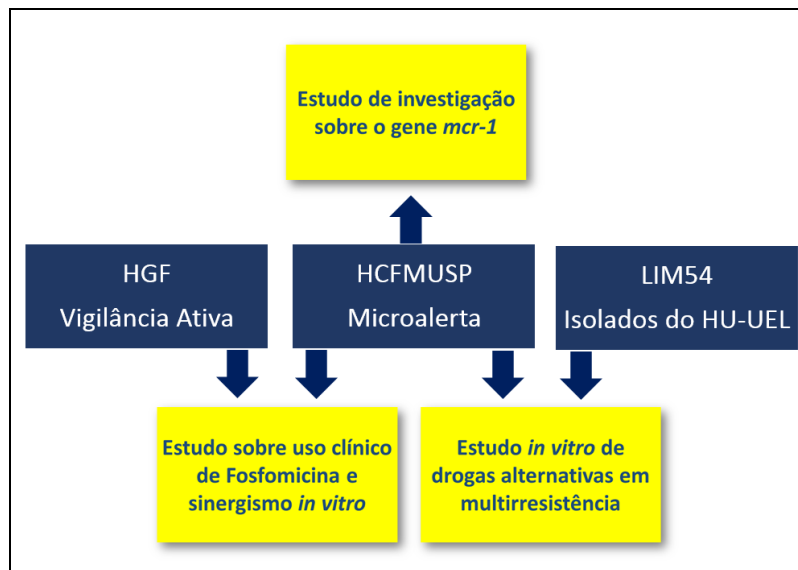
3 MÉTODOS

3.1. Desenhos e locais dos estudos

A internação da paciente colonizada com microrganismos portadores de *mcr-1* aconteceu no Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFUMSP), que é um hospital terciário e de ensino, conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS), constituído por sete institutos especializados e dois hospitais auxiliares, que somam cerca de 2.200 leitos. O estudo genotípico e de sensibilidade de microrganismos multirresistentes a alternativas terapêuticas aconteceu no Laboratório de Investigação Médica 54 – LIM54 – do HCFMUSP, um laboratório de pesquisa com foco em pesquisas em multirresistência; os isolados utilizados foram provenientes de pacientes internados no HCFMUSP e no Hospital Universitário de Londrina. O estudo clínico com a fosfomicina foi desenvolvido no HCFMUSP e no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), que também é hospital público, de alta complexidade, voltado para o ensino (Figura 2).

No HCFMUSP, os resultados de culturas com isolamento de microrganismos com padrão de multirresistência, com fenótipos raros ou que representam valores de pânico (como isolados a partir de cultura de líquido, por exemplo) são informados pela ferramenta de notificação “Microalerta”, um aviso por e-mail. Esse aviso é enviado sistematicamente para as comissões de controle de infecção hospitalar do HCFMUSP e aos envolvidos no processo de vigilância. O Microalerta foi o gatilho para os estudos microbiológicos e clínico dessa pesquisa.

Figura 2: Fluxograma sobre os estudos em multirresistentes da pesquisa.



3.2. Investigação do gene *mcr-1* e a possível transmissão interespécie

3.2.1. Apresentação do estudo

Durante esse processo de avaliação de pacientes infectados por microrganismos multirresistentes e de captação de isolados para estudos microbiológicos, houve identificação de um isolado de *E. coli* resistente a vários betalactâmicos (mas sensível aos carbapenêmicos) e resistente às polimixinas, em uma paciente com infecção urinária com pouca exposição prévia a internações hospitalares. Pelo perfil de sensibilidade, esse isolado foi considerado suspeito de ser carreador do gene *mcr-1*. O isolado não estava mais disponível para estudos e, portanto, foram realizadas nova urocultura (negativa) e culturas de *swabs* de vigilância na tentativa de resgatá-lo. Com essa estratégia, a partir destes *swabs* foram identificados isolados de *E. coli* e de *K. pneumoniae* com fenótipos semelhantes aos da urina (carbapenêmicos-sensíveis e polimixinas-resistentes) e, dessa forma, também suspeitos de carregarem *mcr-1*. Esses achados foram o gatilho para as investigações sobre a circulação desse gene como o responsável por resistência às polimixinas nos isolados dessa paciente, sua possível transmissão interespécies e em ambiente hospitalar, e nas outras cepas multirresistentes desse estudo (Figura 2).

3.2.2. Descrição do caso clínico

Em março de 2016, foi internada no HCFMUSP uma paciente feminina de 55 anos, natural de Princesa Isabel – PB, procedente de Mogi das Cruzes – SP havia três meses, solteira, sem filhos, católica, agricultora. A paciente chegou com história de alguns dias de confusão, letargia e inversão do sono vigília e apresentava-se em estado geral regular, descorada 2+/4+, ictérica +/4+, hidratada, acianótica, afebril, eupnéica em ar ambiente, escala de coma de Glasgow de 14 e edema simétrico em membros inferiores +/4+, sem outros achados ao exame físico. Em Princesa Isabel, uma cidade rural do interior do Estado da Paraíba, a paciente morava com sua família no campo, trabalhava na lavoura e criava animais. Suas principais fontes de alimentação eram os alimentos que produzia, incluindo frangos e porcos que criava. Tais animais costumavam comer apenas comida natural, e a paciente nunca usou ração para alimentar os animais. Três meses antes da admissão se mudara para Mogi das Cruzes, no Estado de São Paulo, em busca de assistência médica. Nunca havia viajado até sua mudança para São Paulo.

A paciente teve diagnóstico de esquistossomose 10 anos antes, e posteriores diagnósticos de hipertensão portal, cirrose hepática, pancitopenia por hiperesplenismo e *diabetes mellitus* tipo 2, com acompanhamento irregular em pronto-socorros e postos de saúde, sob uso regular nos últimos 6 meses de lactulose, neomicina, insulina e omeprazol. À admissão, a principal hipótese diagnóstica foi encefalopatia hepática desencadeada por constipação. Portanto, durante internação, a paciente recebeu diuréticos, neomicina 1-4g/d por 30 dias e ceftriaxona 2g/d por 2 dias para profilaxia para encefalopatia hepática e peritonite bacteriana espontânea. Pela persistência do quadro de desorientação, a paciente foi investigada com urocultura em sua terceira semana de internação, com crescimento de mais de 100.000 UFC/mL de *E. coli* produtora de betalactamase de espectro estendido, sensível a amicacina, ertapenem, imipenem e meropenem, mas resistente às cefalosporinas, a piperacilina/tazobactam, à ciprofloxacina e à colistina. Após um curso de meropenem de cinco dias, a paciente teve melhora importante do quadro neurológico e recebeu alta. Pelo perfil atípico de resistência, foi realizada ainda,

antes da alta, nova urocultura e culturas de vigilância a partir de *swabs* retais e orofaríngeos.

3.2.3. Estudos fenotípicos e PCR para *mcr-1* nos isolados

A identificação dos gram negativos resistentes a polimixina B que cresceram nas culturas de *swabs* coletados de reto e de orofaringe foi realizada por meio de API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), conforme orientações do fabricante. A sensibilidade a antimicrobianos foi determinada por Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, EUA) e a resistência à polimixina B também foi testada por E-test (AB Biodisk, Solna, Suécia), conforme orientações dos fabricantes e interpretação conforme apresentado no Quadro 2.

Esses isolados foram avaliados para a presença de *mcr-1* por PCR com o uso dos primers CLR5-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') e CLR5-R (5'-CTTGGTCGGTCTGTA GGG-3') (LIU, 2016). Os produtos de amplificação foram sequenciados pelo método Sanger usando MegaBACE 1000 (ABI 3730 DNA Analyzer; Applied Biosystems, Alameda, CA).

3.2.4. Estudo do plasmídeo: conjugação e determinação de família de compatibilidade

A transferência de plasmídeo por conjugação foi realizada por experimentos em caldo usando *E. coli* C600 como a cepa receptora (LI, 2018). Os isolados transconjugantes foram também testados para *mcr-1* e foram submetidos a pesquisa do subgrupo de incompatibilidade plasmidial IncX4 por PCR (JOHNSON, 2012).

3.2.5. Sequenciamento do genoma e seu detalhamento

Os isolados resistentes à colistina foram sequenciados por Sequenciamento de Genoma Completo (SGC), conforme apresentado no item 3.3.3 desse texto. As montagens *de novo* foram realizadas usando o SPAdes

v.3.7.1, e o plasmídeo contendo *mcr-1* foi sequenciado e analisado com Geneious (v.9.1.8). Multilocus sequence types (ST) foram determinados a partir do genoma montado (LARSEN, 2012).

3.2.6. Questões éticas

Esse relato de caso e seu detalhamento foi aprovado para publicação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (número de protocolo 3.212.259).

3.3. Drogas alternativas a carbapenêmicos e polimixinas em gram negativos multirresistentes

Para a avaliação *in vitro* de alternativas terapêuticas, determinação de linhagens e detecção de mecanismos de resistência, os isolados selecionados resistentes a betalactâmicos e polimixinas foram submetidos a SGC e a métodos dilucionais para avaliação de sensibilidade dos microrganismos.

3.3.1. Microrganismos

O LIM54 tem um banco de cepas com aproximadamente 4000 microrganismos. A maioria dos microrganismos é isolada em pacientes do HCFMUSP e têm sua identificação e seu teste de sensibilidade a antimicrobianos realizados no Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do HCFMUSP, onde são utilizados rotineiramente, para identificação e teste de sensibilidade a antimicrobianos, os sistemas automatizados Vitek-MS e Vitek-2 (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA) e provas bioquímicas convencionais. Os resultados são interpretados conforme as recomendações do CLSI (CLSI, 2012; CLSI, 2018).

Para este estudo, foram selecionados 50 isolados de gram negativos resistentes a carbapenêmicos e às polimixinas, determinado por método automatizado, armazenados no LIM54 a partir do fluxo apresentado na Figura 2. Esses microrganismos (27 *K. pneumoniae*, 14 *A. baumannii*, 8 *S.*

marcescens e 1 *P. aeruginosa*) foram isolados de colonização ou de infecção relacionada à assistência à saúde, de acordo com critérios dos CDC, de 50 pacientes diferentes, internados no Hospital Universitário de Londrina (n=6) e no Hospital das Clínicas (n=44) entre 2011 e 2016 (um isolado por paciente).

3.3.2. Avaliação de sensibilidade a antimicrobianos

Para determinação das CIM e do perfil de resistência, os microrganismos foram submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos:

- para confirmação da resistência a meropenem e polimixinas e para determinação da CIM de amicacina, tigeciclina e sulfametoxazol/trimetoprim, foram utilizadas placas Sensititre GNX3F e caldo Müeller-Hinton cátion-ajustado (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA) (MATUSCHEK, 2018);
- para determinação da CIM de gentamicina, estreptomicina, tobramicina, doxiciclina, minociclina e cloranfenicol foi realizada microdiluição com sais comercializados (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (CLSI, 2018);
- a CIM para fosfomicina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) foi determinada por ágar diluição, considerado padrão ouro para esse antimicrobiano (CLSI, 2018).
- para a avaliação de sensibilidade a ceftazidima/avibactam, foram realizados testes de disco difusão (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) e microdiluição convencional com a formulação intravenosa (AztraZeneca, Verona, Italy) em uma taxa 4:1 (CLSI, 2018; MARSHALL, 2017) (Quadro 1).

Utilizamos os critérios de interpretação do CLSI para categorizar os resultados. Pela ausência de alguns critérios para algumas espécies, alguns pontos de corte foram extrapolados (Quadro 2). Para a tigeciclina, foram utilizados os pontos de corte preconizados pela *Food and Drug Administration* – FDA (ZHANG, 2018).

Quadro 1: Métodos de avaliação de sensibilidade utilizados em 50 microrganismos gram negativos multirresistentes.

Antimicrobiano	Microdiluição	Ágar diluição	Disco difusão
Meropenem	x		
Polimixinas	x		
Amicacina	x		
Gentamicina	x		
Tobramicina	x		
Estreptomicina	x		
Doxiciclina	x		
Minociclina	x		
Cloranfenicol	x		
Tigeciclina	x		
Sulfametoxazol/trimetoprim	x		
Fosfomicina		x	
Ceftazidima/avibactam	x		x

Quadro 2: Pontos de corte (concentrações inibitórias mínimas em mg/L e halos em mm) utilizados na categorização de sensibilidade de 50 isolados de microrganismos gram-negativos panresistentes.

Categoria	<i>Acinetobacter</i>			<i>Pseudomonas</i>			Enterobacteriaceae		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Imipenem	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤1	2	≥4
Meropenem	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤1	2	≥4
Doripenem	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤1	2	≥4
Colistina	≤2	-	≥4	≤2	-	≥4	≤2 ¹	-	≥4 ¹
Polimixina B	≤2	-	≥4	≤2	4	≥8	≤2 ¹	-	≥4 ¹
Amicacina	≤16	32	≥64	≤16	32	≥64	≤16	32	≥64
Gentamicina	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16
Tobramicina	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16
Estreptomicina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Doxiciclina	≤4	8	≥16	≤4 ¹	8 ¹	≥16 ¹	≤4	8	≥16
Minociclina	≤4	8	≥16	≤4 ¹	8 ¹	≥16 ¹	≤4	8	≥16
Tigeciclina (FDA)	≤2 ²	4 ²	≥8 ²	-	-	-	≤2	4	≥8
SXT	≤2/38	-	≥4/76	≤2/38 ¹	-	≥4/76 ¹	≤2/38	-	≥4/76
Cloranfenicol	≤8 ²	16 ²	≥32 ²	≤8 ²	16 ²	≥32 ²	≤8	16	≥32
Fosfomicina (CLSI)	≤64 ²	128 ²	≥256 ²	≤64 ²	128 ²	≥256 ²	≤64 ³	128 ³	≥256 ³
Fosfomicina (EUCAST)	≤32 ²	-	>32 ²	≤32 ²	-	>32 ²	≤32	-	>32
Ceft/Avib (microdiluição)	< 16/4 ²	-	≥ 16/4 ²	< 16/4	-	≥ 16/4	< 16/4	-	≥ 16/4
Ceft/Avib (disco difusão)	≤ 20 ²	-	≥ 21 ²	≤ 20	-	≥ 21	≤ 20	-	≥ 21

S – sensível; I – intermediário; R – resistente; FDA – *Food and drug administration*; SXT – sulfametoxazol/trimetoprim; Ceft/Avib – Ceftazidima/Avibactam; CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST – *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*. 1 – utilizados os pontos de corte para *Acinetobacter* spp; ND – não definido; 2 – utilizados os pontos de corte para Enterobacteriaceae; 3 – pontos de corte definidos apenas para *E. coli* e *E. faecalis* isolados de urina.

3.3.3. Sequenciamento e montagem de genoma completo

Os isolados foram submetidos ao SGC. O DNA total foi inicialmente extraído com o *kit* *illustra* bacteria genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA). A qualidade do DNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, USA). A concentração do DNA foi verificada com o fluorômetro Qubit® (Thermo Scientific, Delaware, USA), e sua integridade foi verificada em gel de agarose 1,5%. Os isolados foram então submetidos ao SGC pela metodologia de MiSeq Illumina™. As bibliotecas foram preparadas com o *kit* comercial Nextera XT Illumina™ de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* usa um transposon para simultaneamente fragmentar e marcar o DNA com adaptadores. A seguir, o DNA foi amplificado com uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e marcado com índices. A qualidade das bibliotecas geradas foi avaliada em sistema TapeStation (Agilent, Santa Clara, USA). Segmentos pareados de leitura (*paired end reads*) com mais de 500 pares de bases foram processados na plataforma de sequenciamento MiSeq Illumina™ da Rede Premium de multiusuários da Universidade de São Paulo (USP), localizado no Laboratório de Investigação Médica 15 – LIM15, locado na Faculdade de Medicina da USP. A qualidade dos arquivos gerados no sequenciamento foi avaliada pelo programa FastQC v. 0.11.3, e os fragmentos de menor qualidade trimados pelo programa Trimmomatic v. 0.33. Foi realizada montagem do genoma *de novo* com o programa VelvetOptimiser v. 2.2.5. Os contigs formados foram ordenados pelo Abacas v. 1.3.1 usando-se as cepas referências *A. baumannii* ATCC17978 (Acesso GenBank: CP000521), *S. marcescens* CAV1492 (Acesso GenBank: NZ_CP011642.1), *P. aeruginosa* PAO (Acesso GenBank: AE004091) e *K. pneumoniae* MGH78578 (Acesso GenBank: CP000647), cujos genomas estão disponíveis no site do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ZHOU, 2011). O genoma foi anotado com o programa Prokka v. 1.11 (GALENS, 2011; ZERBINO, 2008; ZERBINO, 2010).

3.3.4. *Multilocus sequence typing* e investigação dos mecanismos de resistência

Após a montagem do genoma, o *multilocus sequence typing* (MLST) e a investigação pelos genes que podem levar à resistência bacteriana puderam ser realizados. Os *sequence types* (ST) dos isolados foram determinados através da ferramenta MLSTfinder, com exceção dos isolados de *S. marcescens*, para os quais não há tipagem determinadas. Os genes de resistência foram investigados pela ferramenta Resfinder e por curadoria manual com o uso do programa Artemis (LARSEN, 2012).

3.4. Estudo clínico com fosfomicina

3.4.1. Desenho do estudo

O estudo clínico se caracterizou como uma série de casos de pacientes hospitalizados com diagnóstico de infecção por bactérias gram-negativas resistentes a betalactâmicos e colistina tratada com fosfomicina.

3.4.2. Local e período do estudo

O estudo foi desenvolvido entre 2013 e 2016 no HCFMUSP e no HGF, ambos hospitais terciários e de ensino, conveniados ao SUS. O HCFMUSP é um hospital constituído por sete institutos. Os pacientes do HCFMUSP estiveram internados no Instituto Central do HCFMUSP, o maior instituto, com 24 enfermarias clínicas, doze enfermarias cirúrgicas e doze UTI, abrangendo um total de 987 leitos.

3.4.3. Fluxo do estudo

Após aprovação pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e do comitê de ética do Hospital das Clínicas, o estudo foi divulgado no

complexo hospitalar em reuniões clínicas, em reuniões de serviços de controle de infecção hospitalar e por e-mail.

O estudo foi o resultado de um protocolo compassionado: uma vez diagnosticada a infecção por microrganismo sem possibilidade terapêutica disponível, com base na sensibilidade e na farmacocinética dos antimicrobianos avaliados nos testes de sensibilidades de antimicrobianos realizados, era oferecido o tratamento com fosfomicina à equipe assistente e, posteriormente, à família.

3.4.4. Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes internados no Instituto Central do HCFMUSP e no HGF, com sinais e sintomas de infecção causada por bactéria gram-negativa resistente a carbapenêmicos e colistina, com decisão de tratamento por parte do médico assistente. Foram considerados causadores de infecção os isolados provenientes de material clínico estéril ou de secreção do trato respiratório após avaliação quantitativa ($\geq 10^5$ UFC/mL para secreção traqueal ou $\geq 10^4$ UFC/mL para lavado broncoalveolar). Somente foram incluídos os casos de infecção sem outra possibilidade terapêutica, e foi considerado apenas o primeiro tratamento com fosfomicina. Para definição do sítio da infecção foram utilizados os critérios dos CDC (CDC, 2013; FERNANDEZ-VALENCIA, 1976).

3.4.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo:

- Menores de 18 anos;
- Gestantes ou lactantes;
- Pacientes com alergia documentada à fosfomicina;
- Pacientes incapazes de assinar o consentimento informado e que não tiveram responsáveis que o fizessem;
- Pacientes com insuficiência renal grave/dialítica;
- Pacientes com diagnóstico de infecção por espécie resistente à

fosfomicina (*Acinetobacter* spp., por exemplo) ou infecção polimicrobiana;

- Pacientes com alto risco de óbito nas 48h seguintes;
- Pacientes com infecções que necessitassem terapêutica por tempo maior do que 30 dias (osteomielite, endocardite, por exemplo).

3.4.6. Terapêutica

Uma vez que o paciente preenchesse critérios de inclusão, a ele foi apresentado e explicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Em caso de este não ter podido assumir tal responsabilidade, o TCLE foi apresentado e explicado ao seu responsável legal.

Após o interesse da equipe assistente pela terapia e aceite do paciente ou do seu responsável legal, foi instituída então a terapia com fosfomicina endovenosa, na dose de 3-4g EV 6/6h, por 10 a 14 dias. Ficou a cargo dos médicos assistentes dos pacientes a manutenção ou modificação da terapêutica, bem como a combinação entre antimicrobianos, de acordo com suas decisões próprias.

A fosfomicina utilizada foi a Fosfocina (nome comercial), intravenosa, pó para injeção, fabricada por Laboratórios ERN-S.A. (C/Pedro IV, 499-08020, Barcelona, Espanha) e doado para o estudo pela empresa OPEM Representação, Importadora e Distribuidora LTDA (Rua Frei Caneca, 348/356, São Paulo-SP, CEP-01307-000).

Cada frasco contém dessa droga contém Fosfomicina dissódica 4g e ácido succínico recristalizado (qsp). As empresas doadora e fabricante não tiveram nenhuma interferência ou outra participação neste estudo ou em sua publicação. Não houve nenhum tipo de pagamento ou outros benefícios aos pesquisadores.

3.4.7. Avaliação dos pacientes

Os pacientes tiveram dados coletados no momento da admissão ao protocolo de pesquisa e dados referentes à evolução coletados diariamente. As informações relativas ao desfecho do tratamento foram coletadas no final da terapêutica e da alta hospitalar.

À admissão foram investigados: sexo, idade, data e motivo da internação hospitalar, data e motivo da internação em UTI, co-morbidades, diagnóstico de infecções prévias, utilização prévia de antimicrobianos, realização de procedimentos invasivos (intubação oro-traqueal, traqueostomia, ventilação mecânica, drenagem de tórax, diálise peritoneal ou hemodiálise, cirurgia), escore de APACHE II (*Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II*), no momento da admissão da UTI (se aplicável) e uso de drogas vasoativas.

Durante a evolução, foram analisados e compilados: uso de drogas vasoativas, infecções hospitalares concomitantes, uso de antimicrobianos associados, troca de cateteres venosos centrais, necessidade de tratamento cirúrgico da infecção, sinais e sintomas e achados laboratoriais sugestivos de eventos adversos relacionados à fosfomicina (exantema, náuseas, vômitos, diarreia, flebite ou dor no local da administração, hipertensão ou insuficiência cardíaca, ototoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, choque anafilático, neutropenia, eosinofilia e hipocalemia).

Foram avaliados os seguintes desfechos:

- Evolução clínica
 - Resposta indeterminada: óbito, suspensão da fosfomicina ou associação de outro antimicrobiano antes de 72h a partir do início da antibioticoterapia.
 - Falha terapêutica: óbito com mais de 72h de terapia com fosfomicina, diagnóstico de sepse no final do tratamento instituído, suspensão da fosfomicina antes de completar o tratamento, introdução de outro antimicrobiano para tratamento de infecção por bactérias Gram-negativas com mais de 72h de terapia com fosfomicina ou reisolamento do agente até 10 dias

após suspensão do antimicrobiano.

- Melhora/cura: ausência de sepse, atenuação ou resolução de sinais e sintomas clínicos, melhora dos parâmetros de suporte definidos pela equipe assistente e melhora ou normalização dos exames relacionados à avaliação de resposta terapêutica (leucograma, lactato, PCR).
- Mortalidade até o final do tratamento
- Mortalidade até o final da internação

3.4.8. Avaliação dos isolados

Os isolados de pacientes admitidos ao protocolo de tratamento com fosfomicina, tratados com a combinação de fosfomicina e meropenem, foram testados para sinergismo entre essas drogas. O teste de sinergismo por microdiluição utilizando o método de *checkerboard* foi realizado em duplicata e lido após 20-24 h de incubação a 35°C. Os isolados foram submetidos a combinações de fosfomicina e meropenem. O *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) foi então calculado, utilizando-se a concentração inibitória fracionada (FIC, do inglês *Fractional Inhibitory Concentration*) para cada fármaco, como $FICI = FICA + FICB$, expressão na qual $FICA = CIM$ do fármaco A em combinação / CIM do fármaco A quando sozinho e $FICB = CIM$ do fármaco B em combinação / CIM da droga B quando sozinha. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: sinergismo se $FICI \leq 0,5$, indiferente se $FICI > 0,5$ e ≤ 4 e antagonismo se $FICI > 4$ (ODDS, 2003). Os isolados de *K. pneumoniae* referentes ao estudo clínico com fosfomicina foram submetidos ao *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), após digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição Bcul (Thermo Fisher Scientific) (HAN, 2013; LIU, 2017).

3.4.9. Aspectos éticos

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o número 260.359. As informações obtidas foram analisadas em conjunto e a identidade dos participantes foi mantida em sigilo.

3.4.10. Análise estatística

Os resultados foram compilados em tabelas de frequência e gráficos de acordo com o tipo de variável analisada (contínuas ou categóricas). Para as variáveis contínuas foram calculadas média, mediana e desvio-padrão.

O grupo de pacientes que recebeu meropenem combinado com fosfomicina foi comparado ao grupo que não recebeu carbapenêmico no esquema com fosfomicina. As médias e os desvios padrões do APACHE II de cada grupo foram comparados utilizando-se o teste t, com significância estatística se $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

A partir dos resultados de culturas de fenótipos de multirresistentes informados pelo e-mail Microalerta do HCFMUSP e pela vigilância da Subcomissão de Controle de Infecção Hospitalar do Instituto Central do HCFMUSP e do Hospital Geral de Fortaleza, bem como a partir do estoque de cepas de microrganismos resistentes a carbapenêmicos e/ou polimixinas no LIM54, foram possíveis os resultados desse estudo.

4.1. Identificação de isolados de Enterobacteriales portadores de *mcr-1*

Detalhes desse estudo estão contidos no artigo intitulado “Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil”, publicado no periódico *Infection* [Aug;47(4):661-664, 2019, doi: 10.1007/s15010-019-01309-2], na íntegra abaixo.

1 **Artigo publicado no periódico Infection**

2 **(Aug;47(4):661-664, 2019, doi: 10.1007/s15010-019-01309-2)**

3 **Article Title:** Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella*
4 *pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil

5 **Authors names:** Perdigão Neto LV^{1#}, Corscadden L², Martins RCR³, Nagano
6 DS³, Cunha MPV⁴, Neves PR³, Franco LAM¹, Moura MLN¹, Rizek CF³,
7 Guimarães T¹, Boszczowski I¹, Rossi F⁵, Levin AS^{1,3}, Stabler RA², Costa SF³

8 **Affiliations:**

9 1- Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Brazil

10 Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225, Sala 629; São Paulo-SP; 05403-010;
11 Brazil.

12 2- Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene
13 and Tropical Medicine, London WC1E 7HT, United Kingdom

14 3- Department of Infectious Diseases and LIM-54, University of São Paulo,
15 Brazil

16 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470; São Paulo-SP; 05403-000; Brazil.

17 4- School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo,
18 Brazil

19 Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87; São Paulo-SP; 05508-270; Brazil.

20 5- Microbiology Laboratory, Hospital das Clínicas, University of São Paulo,
21 Brazil

22 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo-SP; 05403-000; Brazil

23 **#Corresponding author:** Lauro Vieira Perdigão Neto. Address: Rua Arruda
24 Alvim, 107, #142, São Paulo-SP, 05410-020, Brazil. Phone/fax: 55-11-2661-
25 7066. e-mail: lauro_perdigao@hotmail.com

26 **Abstract**

27 We present a case report of a woman, concurrently colonized by polymyxin-
28 resistant *E. coli* and *K. pneumoniae*. A Brazilian female patient, in her mid-
29 fifties, was hospitalized with schistosomiasis. During hospitalization, polymyxin-
30 resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* were isolated from surveillance cultures.
31 Identification, antimicrobial susceptibility testings, PCR for *mcr-1*, plasmid
32 transfer by conjugation and Whole Genome Sequencing were performed. *E. coli*
33 ST744 and *K. pneumoniae* ST101 carrying *mcr-1* gene were described.
34 Transconjugant *E. coli* was positive for *mcr-1* and IncX4 by PCR. The plasmid is
35 a 33,304 base pairs plasmid, and the *mcr-1* gene was the only antimicrobial
36 resistance gene present in the plasmid. This study presents a case report of a
37 hospitalized woman, concurrently colonized by *mcr-1*-harboring *E. coli* ST744, a
38 different ST from previously described in Brazil, and a *K. pneumoniae* ST101 for
39 the first time.

40 **Keywords:** Antimicrobial susceptibility; *mcr-1*; Resistance; Colistin

41

42 Polymyxins are peptide antimicrobials active against most Gram-negative
43 bacteria, and multidrug resistance and slowdown in antibiotic discoveries were
44 responsible for the clinical return to use of this class of antimicrobials.
45 Unfortunately, recent data has shown a significant increase in the number of
46 isolates with high minimum inhibitory concentration for polymyxins in Gram-
47 negative microorganisms, especially *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*
48 *aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* [1]. Until recently, polymyxin
49 resistance has involved only vertical transmission due to chromosomal
50 mutations, but a novel plasmidial colistin resistance gene (*mcr-1*) was identified,
51 which can lead to horizontal transmission [2]. Most *mcr-1* positive isolates origin
52 from food animals and meat, with only a few clinical isolates reported [3]. The
53 *mcr-1* gene has previously been identified in Brazil [4], but co-colonization has
54 not been reported to date in the country.

55 A female patient, in her mid-fifties, was hospitalized in March 2016 with
56 schistosomiasis. She was born and lived in a rural town in the state of Paraiba,
57 Northeastern Brazil. Her main diet was foods she produced, including chickens
58 and pigs fed only locally sourced natural food. Three months before admission
59 she moved to São Paulo in search of medical care. In the third week after
60 admission, she developed disorientation and a urine culture with ESBL-
61 producing *E. coli*, susceptible to amikacin and carbapenems, but resistant to
62 cephalosporins, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam and colistin. Surveillance
63 swabs were collected three days after the diagnosis of the urinary infection.
64 One colistin-resistant *E. coli* (TMS4) and two *K. pneumoniae* (TMS1 and TMS5)
65 were isolated from surveillance cultures (Table 1). Infection control measures
66 were implemented in attempt to minimize the risk of dissemination: the patient

67 was placed in a single bed room and healthcare workers were required to wear
68 personal protective equipment, as recommended for contact precautions (gown
69 and gloves at each contact to the patient or to the patient environment). She
70 was discharged after 5 days of meropenem. Two months after discharge, the
71 patient was re-screened, and one surveillance culture using rectal swab in
72 selective media was performed [5], which resulted negative for polymyxin-
73 resistant microorganisms. We report the case of a patient simultaneously
74 colonized by *E. coli* and *K. pneumoniae* harboring *mcr-1*. The report was
75 approved for publication by the Research Ethics Committee of the Hospital das
76 Clínicas.

77 Identification was achieved using API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)
78 and antibiotic susceptibility by Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Cleveland,
79 USA). PCR for *mcr-1* was performed as described previously [2]; amplification
80 products were sequenced by Sanger method using MegaBACE 1000 (ABI 3730
81 DNA Analyser; Applied Biosystems, Alameda, CA). Plasmid transfer by
82 conjugation was performed by broth mating experiments using *E. coli* C600 as
83 the recipient strain. Transconjugants isolates were tested for *mcr-1* and
84 incompatibility subgroup IncX4 by PCR [6]. Colistin-resistant isolates were
85 whole genome sequenced (WGS) using two different platforms (MiSeq,
86 Illumina, and Ion Torrent). *De novo* assemblies were carried out using SPAdes
87 v.3.7.1. The plasmid harboring *mcr-1* was sequenced and analyzed with
88 Geneious (v.9.1.8). Multilocus sequence type (ST) was determined from the
89 assembled draft genome [7]. Unfortunately, it was not possible to evaluate the
90 *E. coli* isolated from urine.

91 All isolates carried *mcr-1* confirmed by Sanger sequencing. *E. coli* TMS4 was
92 able to conjugate and transconjugant *E. coli* was positive for *mcr-1* and IncX4
93 by PCR; *K. pneumoniae* isolates did not conjugate *in vitro*. Using Illumina and
94 Ion Torrent assemblies, it was possible to determine the complete sequence of
95 IncX4 plasmid from *E. coli* isolate (GenBank accession number MH298055).
96 The plasmid, named pTMS4-1, was a 33,304 base pairs plasmid and showed
97 high nucleotide identity (99%) with pICBEC72Hmcr, a *mcr-1* bearing plasmid
98 from an *E. coli* strain isolated in Brazil [4]. The *mcr-1* gene was the only
99 antimicrobial resistance gene present in the plasmid.

100 Dissemination of *mcr-1* gene has been attributed to extensive use of polymyxins
101 in livestock, since the presence of *mcr-1* positive strains is more frequent in
102 animals or meat than in humans [4]. Few data on colistin resistance in Brazil are
103 currently found in the literature. In our hospital, colistin resistance is increasing
104 among Gram negative isolates, specially *K. pneumoniae* and *A. baumannii* [8].
105 This case report alerts to the horizontal transmission of polymyxin resistance
106 mechanism involving two species: *E. coli* and *K. pneumoniae*. This patient was
107 a Brazilian woman who always lived in the rural environment, had never
108 travelled outside Brazil and worked in small scale agriculture. She denied
109 feeding her animals with industrialized food, and they were not available for
110 testing for *mcr-1*.

111 Although there is no consensus about the sensitivity of the rectal swab culture
112 (as it has been considered the gold standard to detect colonizing multiresistant
113 microorganisms), we cannot ensure that the rectal swab culture has had a false
114 negative result. On the other hand, the patient this strategy has been
115 considered the main strategy to describe decolonization. In a previous work at

116 our institution, a culture-based method was compared to a polymerase chain
117 reaction method and the authors found high agreement between the two
118 strategies [5].

119 *E. coli* ST744 has been isolated from humans, pets and wild animals, but rarely
120 carry *mcr* genes [9]. *K. pneumoniae* ST101 has sometimes been described as
121 multidrug resistant [10], but not yet carrying *mcr-1*. In general, *K. pneumoniae* is
122 a rare carrier of *mcr-1*, and to our knowledge *mcr-1* co-colonization descriptions
123 are scarce [11] and this is the first in Latin America. The finding of *mcr-1* gene in
124 *K. pneumoniae* is particularly important because it is frequently multidrug
125 resistant [12]. Our study presents a case report of a woman concurrently
126 colonized by *mcr-1*-harboring *E. coli* ST744, a different ST from previously
127 described in Brazil, and a *K. pneumoniae* ST101 for the first time.

128 **Acknowledgments**

129 None.

130 **Funding**

131 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de
132 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

133 **Declarations of interest**

134 None.

135

136 **References**

- 137 1. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity,
138 Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by
139 Plasmids or Chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017;30(2):557-596.
- 140 2. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated
141 colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in
142 China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis
143 2016;16(2):161-8.
- 144 3. El Garch F, Sauget M, Hocquet D, et al. *mcr-1* is borne by highly diverse
145 *Escherichia coli* isolates since 2004 in food-producing animals in Europe.
146 Clin Microbiol Infect 2017;23(1):51.e1-51.e4.
- 147 4. Fernandes MR, McCulloch J, Vianello MA, et al. First report of the
148 globally disseminated IncX4 plasmid carrying *mcr-1* gene in a colistin-
149 resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human
150 infection in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2016;60(10):6415-7.
- 151 5. Salomão MC, Guimarães T, Duailibi DF, et al. Carbapenem-resistant
152 Enterobacteriaceae in patients admitted to the emergency department:
153 prevalence, risk factors, and acquisition rate. J Hosp Infect.
154 2017;97(3):241-246.
- 155 6. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, et al. Expansion of the IncX plasmid
156 family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-
157 resistant Enterobacteriaceae. Plasmid 2012;68(1):43-50.
- 158 7. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus Sequence
159 Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. J Clin Microbiol
160 2012;50(4):1355-1361.

- 161 8. Rossi F, Girardello R, Cury AP, et al. Emergence of colistin resistance in
162 the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five
163 years. *Braz J Infect Dis* 2017;21(1):98-101.
- 164 9. Loncaric I, Beiglböck C, Feßler AT, et al. Characterization of ESBL- and
165 AmpC-Producing and Fluoroquinolone-Resistant Enterobacteriaceae
166 Isolated from Mouflons (*Ovis orientalis musimon*) in Austria and
167 Germany. *PLoS One* 2016;11(5):e0155786.
- 168 10. Avgoulea K, Di Pilato V, Zarkotou O, et al. Characterization of
169 extensively- or pandrug-resistant ST147 and ST101 OXA-48-producing
170 *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bloodstream infections in ICU
171 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; doi: 10.1128/AAC.02457-
172 17.
- 173 11. Gu DX, Huang YL, Ma JH, et al. Detection of colistin resistance gene
174 *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*
175 isolates from an infant with diarrhea in China. *Antimicrob Agents*
176 *Chemother* 2016;60(8):5099-100.
- 177 12. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella*
178 *pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control.
179 *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(10):749-761.

180 Table 1. Antimicrobial susceptibility, antimicrobial resistance genotypes and colistin resistance-
 181 associated mutations identified by Whole Genome Sequencing and PCR of *mcr-1* positive
 182 Enterobacteriaceae isolates from a single patient with schistosomiasis complications.

Isolate	TMS4	TMS1	TMS5
Species	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Site	Rectal	Oropharyngeal	Rectal
Susceptibility*			
Colistin	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)
Polymyxin B	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)
Ceftazidime	> 16 (R)	> 16 (R)	> 16 (R)
Cefepime	≤ 2 (S)	> 16 (R)	> 16 (R)
Ampicillin / Sulbactam	32/16 (R)	> 64/32 (R)	> 64/32 (R)
Piperacillin / Tazobactam	≤ 8/4 (S)	> 64/4 (R)	> 64/4 (R)
Aztreonam	8 (S)	> 16 (R)	> 16 (R)
Imipenem	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)
Meropenem	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)
Doripenem	≤ 0.5 (S)	≤ 0.5 (S)	≤ 0.5 (S)
Amikacin	8 (S)	8 (S)	8 (S)
Gentamicin	> 8 (R)	> 8 (R)	≤ 1 (S)
Tigecycline**	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
Ciprofloxacin	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)
Sulfamethoxazole / Trimethoprim	> 4/76 (R)	> 4/76 (R)	> 4/76 (R)
Levofloxacin	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)
MLST sequence type	744	101	101
Resistance genes			
Aminoglycosides	<i>aac(3)-Vla</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> <i>aadA1</i> <i>aadA5</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>strA, strB</i>	<i>aac(3)-IId</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>strA, strB</i>	<i>aac(3)-IId</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>strA, strB</i>
Beta-lactams	<i>bla_{CMY-2}</i> <i>bla_{OXA-1}</i> <i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{OXA-1}</i> <i>bla_{SHV-1}</i> <i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{OXA-1}</i> <i>bla_{SHV-1}</i> <i>bla_{TEM-1B}</i>
Fluoroquinolones	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> <i>oqxA, oqxB</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> <i>oqxA, oqxB</i>
Fosfomycin	-	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
Sulphonamides	<i>sul1, sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>
Tetracyclines	<i>tet(B)</i>	<i>tet(D)</i>	<i>tet(D)</i>
Trimethoprim	<i>dfrA14, dfrA17</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA14</i>
Colistin	<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i>
<i>pmrA</i>	S31T; N128I; S144G	T245A	T157P; T245A
<i>pmrB</i>	R2H; D123E; G283D; I351V	A217V	A217V
<i>pmrC (eptA)</i>	F14L; S15A; T21A; V26I; C27Y; V39A; G69S; T106A; R123Q; L130F; I137L; T147A; I163V; S211L; I217V; G232E; Q257P; V332A; I341V; G348D; S373G; L376V	G25S; I138V; Q319R	G25S; I138V; Q319R
<i>eptB</i>	V505A; R558K	-	-

<i>phoP</i>	L44I	-	-
<i>phoQ</i>	H6R	-	-
<i>mgrB</i>	-	M1V	M1V
<i>lpxM</i>	C45R; V66A; I94M	S253G	S253G
<i>yciM</i>	Y72H	-	-
<i>acrB</i>	N596H	-	-

183 * - minimal inhibitory concentrations (mg/L); S – susceptible, I – intermediate, R – resistant, according to
184 Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints. ** - For Tigecycline, Food and Drug Administration
185 breakpoints were used.

Pontos importantes

Conforme exposto anteriormente, durante o período de avaliação dos microrganismos multirresistentes, foi identificado um isolado de fenótipo exótico de *E. coli* (carbapenem-sensível e polimixinas-resistente), sugestivo de cepa portadora do gene *mcr-1*, recém-descrito na literatura.

O isolado de *E. coli* da urina não estava disponível para estudo, mas os swabs de vigilância identificaram microrganismos com perfil semelhante nas culturas.

No resultado das culturas de vigilância, foram encontrados isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, com perfis diferentes de sensibilidade, alguns sugestivos de genótipos *mcr-1*. À pesquisa do gene *mcr-1* por reação em cadeia da polimerase, o isolado de *E. coli* e dois isolados de *K. pneumoniae*, todos colistina resistentes, tiveram resultado positivo.

Todos esses isolados carregavam *mcr-1*, resultado confirmado pelo sequenciamento de Sanger. O isolado de *E. coli* foi capaz de conjugar para *E. coli* C600. O isolado transconjugante foi positivo para *mcr-1* e IncX4 por PCR; os isolados de *K. pneumoniae* não conjugaram. Usando os resultados de SGC, foi possível determinar a sequência completa do plasmídeo IncX4 do isolado de *E. coli* (Número de acesso ao GenBank MH298055).

22 Abstract

23 Enterobacteriales and other non-fermenting Gram-negative have become a
24 threat worldwide, due to the frequency of multidrug resistance presented by
25 these pathogens, and they are in the World Health Organization priority
26 pathogens list. On the other hand, efficacious therapeutic options are quickly
27 diminishing. The aims of this study were to describe the susceptibility of 50
28 multiresistant Gram-negative bacteria, mostly panresistant, against old and less
29 used antimicrobial drugs and to investigate the presence of resistance genes
30 using Whole Genome Sequencing: 14 *A. baumannii* (belonging to ST79,
31 ST317, ST835 and ST836), 1 *P. aeruginosa* (ST245), 8 *S. marcescens* and 27
32 *K. pneumoniae* (belonging to ST11, ST340, ST258, ST16, ST23, ST25, ST101,
33 ST234, ST437 and ST442), frequently producers of carbapenemases - *bla*_{KPC-2}
34 (n=28; 56%), *bla*_{OXA-23} (n= 11; 22%) and other mechanisms such as
35 aminoglycoside modifying enzymes (n=49; 98%), were evaluated. High
36 susceptibility rates of tigecycline (96%) in all species (except *P. aeruginosa*),
37 minocycline (100%) and doxycycline (93%) in *A. baumannii*,
38 ceftazidime/avibactam in *K. pneumoniae* (96%) and fosfomicin in *S.*
39 *marcescens* (88%) were highlighted. Chloramphenicol and quinolones (6% of
40 susceptibility each) did not perform well, which makes unlikely their use in an
41 empirical scenario.

42

43 **Introduction**

44 Bacterial resistance has accompanied the development and commercialization
45 of antimicrobials. At the beginning of the antimicrobial era, concern was focused
46 on resistance of Gram-positive bacteria (DURAND, 2019). However, in recent
47 decades, greater apprehension has shifted towards the susceptibility pattern of
48 Gram-negative bacteria (DIEKEMA, 2019).

49 Enterobacteriales and other non-fermenting Gram-negative have become a
50 threat worldwide due to the frequency of multidrug resistance presented
51 (DIEKEMA, 2019; THEURETZBACHER, 2017). The emergence of
52 cephalosporinases had as consequence the widespread use of carbapenems,
53 which, in turn, resulted in the emergence of mechanisms of resistance,
54 especially carbapenemases (CUI, 2019; LIM, 2019; HARRIS, 2018).

55 As carbapenemases became frequent, polymyxins, abandoned in the 1970s for
56 toxicity, were reintroduced. Resistance mechanisms to polymyxins were rare for
57 a long time (VELKOV, 2018). However, in recent years, it has become
58 increasingly frequent (MOFFATT, 2019). Thus, treatment is particularly
59 problematic, because efficacious therapeutic options are quickly diminishing
60 against lifethreatening infections caused by these pathogens (WHO, 2017).

61 Studies that test susceptibility of multiresistant Gram-negative microorganisms
62 against old and less used antimicrobials are still lacking.

63

64 Objectives

65 The aims of this study were to describe the susceptibility of multiresistant Gram-
66 negative bacteria to old and less used antimicrobial drugs and to investigate the
67 presence of resistance genes using Whole Genome Sequencing (WGS).

68

69 Methods

70 We studied 50 clinical Gram-negative isolates, resistant to carbapenems and
71 polymyxins previously determined by automated methods in clinical
72 microbiology laboratories. We did susceptibility testing of alternative
73 antimicrobials and genotypic characterization by WGS. There were: 27 *K.*
74 *pneumoniae*, 8 *S. marcescens*, 14 *A. baumannii* and 1 *P. aeruginosa*, from
75 patients hospitalized at Hospital Universitário de Londrina (n=6), Londrina, in
76 the State of Paraná, and Hospital das Clínicas (n=44), in the State of São
77 Paulo, between 2011 and 2016 (one isolate per patient).

78 The microorganisms were tested against imipenem, meropenem, polymyxin B
79 and colistin using Sensititre GNX3F (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH,
80 USA) (MATUSCHEK, 2018) to confirm the susceptibility pattern determined
81 previously by automated methods. To determine minimum inhibitory
82 concentrations (MIC) and susceptibility to the other drugs, the microorganisms
83 were submitted to testings against:

- 84 • gentamicin, streptomycin, tobramycin, doxycycline, minocycline and
85 chloramphenicol using in-house microdilution (salts by Sigma-Aldrich,
86 Missouri, USA) (CLSI, 2018);
- 87 • amikacin, tigecycline and sulfamethoxazole/trimethoprim using
88 microdilution with Sensititre GNX3F (TREK Diagnostic Systems,
89 Cleveland, OH, USA) (MATUSCHEK, 2018);
- 90 • fosfomicin using agar dilution (salt by Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
91 (CLSI, 2018).
- 92 • ceftazidime/avibactam using in-house microdilution with intravenous
93 formulation (AztraZeneca, Verona, Italy) in a 4:1 ratio, as previously
94 described (MARSHALL, 2017).

95 We used Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) interpretation
96 criteria to categorize most susceptibility results. Due to the lack of interpretation
97 criteria, the criteria for colistin for *Acinetobacter* spp. were applied to
98 Enterobacteriales isolates (CLSI, 2018). For fosfomicin, both CLSI and
99 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria
100 were used (CLSI, 2018; EUCAST, 2018). For tigecycline, the breakpoints
101 recommended by the Food and Drug Administration (FDA) were used (ZHANG,
102 2018).

103 To describe lineages and resistance mechanisms, the isolates were submitted
104 to WGS using MiSeq Illumina™ methodologies (Illumina Inc., San Diego, CA,
105 United States) (BOGATY, 2018). Reference strains *A. baumannii* ATCC17978
106 (GenBank Access Number: CP000521), *S. marcescens* CAV1492 (GenBank
107 Accession Number: NZ_CP011642.1), *P. aeruginosa* PAO (GenBank Access

108 Number: AE004091) and *K. pneumoniae* MGH78578 (Accession GenBank
109 Number: CP000647) were used for assembling the genome *de novo*
110 (ZERBINO, 2008). Sequence types (ST) and resistance genes were determined
111 using MLSTfinder, Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) and manual
112 curation using the Artemis program.

113

114 **Results**

115 Gram negatives used are genetically distinct and do not represent polyclonal
116 microorganisms, since only one isolate per patient was used, from different
117 units of two hospitals, belonged to different lineages, with several mechanisms
118 of resistance and difficult to treat profiles (Table 1).

119 Using microdilution, 86% of the isolates were confirmed as resistant to
120 meropenem: all *A. baumannii* isolates, the isolate of *P. aeruginosa* and 28
121 Enterobacteriales. Three (6%) *S. marcescens* isolates were susceptible: all
122 *ampC*-producers (*bla*_{SRT-2}), two ESBL-producers (*bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{SHV-129}) and
123 one also a *bla*_{KPC}-harboring isolate. Four (8%) *K. pneumoniae* not resistant to
124 meropenem belonged to ST340 (n=2), ST258 (n=1) and ST11 (n=1) and are
125 ESBL-producers; the susceptible ST11 *K. pneumoniae* harbored *bla*_{KPC-2} (Table
126 1 and supplementary material). Overall, twenty-nine different beta-lactamases
127 genes were harbored in the 50 Gram negative tested. The carbapenemase
128 encoding genes *bla*_{KPC-2} was detected in 28 (56%) Enterobacteriales isolates.
129 All *A. baumannii* isolates harbored *bla*_{OXA-51} and ISAba1; *bla*_{OXA-23} was detected
130 in 11 (22%) isolates (Table 2).

131 Twenty-three (85%) *K. pneumoniae* isolates, all but one (93%) *A. baumannii*
132 and the isolate of *P. aeruginosa* were confirmed as resistant to polymyxins.
133 Intrinsic resistance of *S. marcescens* was confirmed in all strains. None of the
134 strains had the *mcr* genes, responsible for horizontal transfer of polymyxin
135 resistance.

136 Forty-eight (96%) isolates were susceptible to tigecycline; only the isolate of *P.*
137 *aeruginosa* and an isolate of *S. marcescens* were not susceptible. Genes that
138 may lead to glycylycyclines resistance were described in 42 (84%) strains (not
139 found in the resistant strain of *S. marcescens* nor in the *P. aeruginosa* isolate)
140 (Table 2).

141 Overall, 29 isolates (58%) were susceptible to doxycycline and 30 (60%) to
142 minocycline. Susceptibility to doxycycline and minocycline occurred in 13 (93%)
143 and 14 (100%) *A. baumannii*; two (25%) and two (25%) *S. marcescens* and 14
144 (52%) and 15 (56%) of *K. pneumoniae*, respectively. The isolate of *P.*
145 *aeruginosa* was intermediate to doxycycline and resistant to minocycline.
146 Genes from several encoding efflux pumps families that may cause resistance
147 to tetracyclines were found (Table 2).

148 Overall, 18 (36%) and seven (14%) isolates were susceptible to fosfomicin,
149 using CLSI and EUCAST criteria, respectively. MIC50 and MIC90 for
150 fosfomicin were 256 and > 1024 µg/mL, respectively. Using CLSI and EUCAST
151 criteria, 9 (64%) and none (0%) *A. baumannii*, seven (88%) and seven (88%) *S.*
152 *marcescens* and one (4%) and none (0%) *K. pneumoniae* were susceptible,
153 respectively. The isolate of *P. aeruginosa* was susceptible using CLSI, but

154 resistant using EUCAST. The only fosfomicin resistance gene found was *fosA*
155 gene, detected in 26 (52%) of the isolates (Tables 1 and 2).

156 Regarding susceptibility to ceftazidime/avibactam, all *S. marcescens*, the isolate
157 of *P. aeruginosa* and 26 (96%) *K. pneumoniae* were susceptible. All isolates of
158 *A. baumannii* were resistant. The gene *bla*_{KPC-3} was not present in any strain. All
159 KPC-producing strains were *bla*_{KPC-2}.

160 Four aminoglycosides were tested. Susceptibility to amikacin was shown in 20
161 (40%) isolates: one (8%) *A. baumannii*, one (13%) *S. marcescens* and 18 (67%)
162 *K. pneumoniae*. Susceptibility to gentamicin was shown in 21 (42%) isolates: 11
163 (79%) *A. baumannii*, four (8%) *S. marcescens* and six (22%) *K. pneumoniae*.
164 Susceptibility to tobramycin was described in 11 isolates: nine (64%) *A.*
165 *baumannii* and two (7%) *K. pneumoniae*. Regarding streptomycin (for which
166 there are no breakpoints), MIC range, MIC50 and MIC90 were 8-> 256 µg/mL,
167 32 µg/mL and > 256 µg/mL. Aminoglycoside modifying enzymes (AME) were
168 found in 49 strains (98%); six *K. pneumoniae* strains (12%) had methylases in
169 their genomes: *rmtB* (n=5) and *rmtG* (n=1) (Table 2).

170 Forty-one (82%) isolates were resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim. Nine
171 isolates were susceptible: seven *K. pneumoniae* (ST11, n=3; ST340, n=2;
172 ST101, n=1; ST437, n=1), one *S. marcescens* and one *A. baumannii* (ST317).
173 The most frequent resistance genes were *sul1* and *sul2*, detected in 25 (50%)
174 and 27 (54%) isolates, respectively.

175 Resistance to chloramphenicol and resistance to quinolones were shown in 47
176 (94%) isolates each. the most frequently described resistance mechanisms as
177 possible causes of these phenotypes were efflux pumps. (Tables 1 and 2).

178 Discussion

179 In this study, we evaluated the susceptibility of multiresistant microorganisms
180 belonging to different genotypes, with distinct mechanisms of resistance,
181 against alternative drugs to carbapenems and polymyxins. We focused on old,
182 non-beta-lactam drugs, and ceftazidime/avibactam, all with limited experience
183 against multidrug-resistant microorganisms, especially in panresistant ones in
184 our setting. The performance of tigecycline in all species (except *P.*
185 *aeruginosa*), of minocycline and doxycycline in *A. baumannii* and of
186 ceftazidime/avibactam in *K. pneumoniae* and fosfomicin in *S. marcescens* was
187 good.

188 We hypothesized that the pattern of multidrug resistance is a matter of
189 perspective, since the diagnosis and treatment of nosocomial infections are
190 usually carbapenem- and polymyxins- centered.

191 As the initial selection by carbapenem and polymyxin resistant microorganisms
192 was based on the susceptibility profile determined by automated method, we
193 submitted the isolates to broth microdilution to confirm such phenotypes.
194 Overall, multidrug resistance could be confirmed by microdilution, and
195 categorical agreement was 86% for meropenem and 90% for polymyxins,
196 similar to previously described (CHEW, 2017; BOBENCHIK, 2015). In this
197 situation, treatment is difficult, as few isolates were truly susceptible or
198 intermediate to these drugs. We did not exclude any of the isolates because,
199 from a practical point of view, for the clinician, these isolates were marked as
200 resistant by the automated method, and alternative therapies would be needed
201 to treat the infected patient.

202 The loss of polymyxins as an alternative greatly complicates treatment and
203 makes other options more valuable. Interestingly, although horizontal
204 transmission genes encoding polymyxin resistance mechanisms are
205 increasingly being described (MELETIS, 2018), we believe that the selective
206 pressure exerted by the frequent use of polymyxins has allowed the emergence
207 of chromosomal mutations and the consequent selection of Gram negative with
208 this phenotype. We looked for *mcr* genes in all isolates and found none, which
209 suggests the hypothesis of chromosomal mutation.

210 Tigecycline was the most active antimicrobial in this study. The role of
211 tigecycline in the treatment of multidrug resistant Gram-negative bacteria has
212 been discussed, but, unfortunately, tigecycline has certain pharmacokinetics
213 disadvantages, which have limited its use in the treatment of carbapenem-
214 resistant organisms. On the other hand, if the multiresistant organisms causes
215 infections in sites where tigecycline can penetrate, the success of the treatment
216 is feasible (SHANKAR, 2017). Moreover, some studies have emphasized the
217 possible synergism of tigecycline with other drugs (LI, 2017).

218 In *A. baumannii*, tetracyclines minocycline and doxycycline were very active in
219 almost all isolates, despite the frequent presence of efflux pumps in their
220 genomes. Minocycline has been shown to overcome many resistance
221 mechanisms that affect other tetracyclines in *A. baumannii*, including
222 tigecycline. Additionally, it has more favorable pharmacokinetic and
223 pharmacodynamic properties, and may represent a good option to treat these
224 infections (LASHINSKY, 2017).

225 The activity of the combination ceftazidime/avibactam in *K. pneumoniae* isolates
226 with many different beta-lactamases (ESBL, AmpC, serinocarbenemases -
227 KPC-2 and OXA, and one metallobeta-lactamase NDM-1-harboring isolate) was
228 relevant. It is important to find a beta-lactam still active against carbapenemic
229 resistant microorganisms (including *P. aeruginosa*). This importance is
230 reinforced by the results in a previous Brazilian clinical study, in which the
231 outcomes using ceftazidime/avibactam for infections by carbapenem-resistant
232 Enterobacteriales (*K. pneumoniae*; n=28 and *S. marcescens*; n=2) were
233 described. All isolates were producers of KPC-2, were susceptible to
234 ceftazidime/avibactam (MIC90, 1 µg/ml), and clinical success was high (83%),
235 even for the bacteremic cases (75%) (GUIMARÃES, 2019).

236 In *S. marcescens* isolates, in which fosfomicin resistance-encoding genes were
237 not found, fosfomicin was very active. This result is promising as the potential
238 for panresistance in this species is real, and as fosfomicin has been shown to
239 be active against Enterobacteriales (WILLIAMS, 2019). Isolates of multiresistant
240 *S. marcescens* have been increasingly described as opportunistic nosocomial
241 pathogens (GAUDERETO, 2019). Due to the intrinsic resistance to polymyxins
242 and the high number of efflux pump genes usually present in their genomes, the
243 acquisition of carbapenem resistance mechanisms in this species is sufficient to
244 make treatment very difficult (SANDNER-MIRANDA, 2018).

245 Gram-negative susceptibility to aminoglycosides ranged from 22 to 42%. The
246 most relevant results are that amikacin had its best performance in *K.*
247 *pneumoniae*, and gentamicin in *S. marcescens* and *A. baumannii*. Tobramycin
248 has rarely been investigated against *A. baumannii*, but our results show that it

249 may be an aminoglycoside option. Streptomycin has shown high MIC for
250 isolates and therefore should not be considered in monotherapy. Overall, the
251 activity of aminoglycosides in multidrug resistant Enterobacteriales has been
252 investigated, but studies are still rare (SERIO, 2018).

253 Sulfamethoxazole/trimethoprim was considered promising, in the remote past,
254 in *A. baumannii*. Falagas et al. reviewed the literature, and in studies regarding
255 multiresistant *Acinetobacter* spp., non-susceptibility rates ranged from 5.9% to
256 100% (FALAGAS, 2015). In our results, seven of nine susceptible isolates were
257 *K. pneumoniae*, we think that the activity of sulfamethoxazole/trimethoprim
258 against this species should be more investigated, clinically and
259 microbiologically. Chloramphenicol and quinolones presented catastrophic
260 susceptibility results, which, in our opinion, excludes their use as empirical
261 drugs.

262 Antimicrobials are drugs that have changed the history of mankind, capable of
263 decreasing mortality worldwide over the last century (TRAVIS, 2018). However,
264 these drugs are losing effectiveness dramatically and the main reason for this is
265 the increasing incidence of bacterial resistance (DURAND, 2018). Worryingly,
266 many large pharmaceutical companies abandoned the antimicrobial market,
267 because the development of new antibiotics is difficult and not as profitable as
268 drugs used to treat chronic conditions (LI, 2017). This is what motivated our
269 study.

270 In conclusion, we had hoped to find options against multidrug resistance, if we
271 evaluated other antimicrobials in routine testings against Gram-negative
272 bacteria. Our results were not as expected for most combinations, but they did

273 show some interesting points: promising tigecycline results for all Gram-
274 negative (except *P. aeruginosa*), good activity of minocycline against *A.*
275 *baumannii*, of ceftazidime/avibactam against *K. pneumoniae*, and of fosfomicin
276 against *S. marcescens*.

277

278 **References**

- 279 BOBENCHIK AM, DEAK E, HINDLER JA, CHARLTON CL, HUMPHRIES RM.
280 Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of
281 Enterobacteriaceae with Vitek 2 (2009 FDA) and 2014 CLSI breakpoints. J Clin
282 Microbiol; 53(3):816-23, 2015.
- 283 BOGATY C, MATASEJE L, GRAY A, LEFEBVRE B, LÉVESQUE S, MULVEY
284 M, LONGTIN Y. Investigation of a Carbapenemase-producing *Acinetobacter*
285 *baumannii* outbreak using whole genome sequencing versus a standard
286 epidemiologic investigation. Antimicrob Resist Infect Control; 7:140, 2018.
- 287 CHEW KL, LA MV, LIN RTP, TEO JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility
288 Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae:
289 Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth
290 Microdilution. J Clin Microbiol; 55(9):2609-2616, 2017.
- 291 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)-Performance
292 Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S28.
293 Wayne, PA: CLSI, 2018.
- 294 DIEKEMA DJ, HSUEH PR, MENDES RE, PFALLER MA, ROLSTON KV,
295 SADER HS, JONES RN. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year
296 Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob
297 Agents Chemother; 63(7), 2019.
- 298 DURAND GA, RAOULT D, DUBOURG G. Antibiotic discovery: history, methods
299 and perspectives. Int J Antimicrob Agents; 53(4):371-382, 2019.

300 EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS
301 DISEASES. Clinical breakpoints version 8.0. In European Committee on
302 antimicrobial susceptibility testing. Växjö: EUCAST; 2018. Available from:
303 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

304 FALAGAS ME, VARDAKAS KZ, ROUSSOS NS.
305 Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: A review of current
306 microbiological and clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents*; 46(3):231-41,
307 2015.

308 GAUDERETO JJ, PERDIGÃO NETO LV, LEITE GC, RUEDAS MARTINS R,
309 BOAS DO PRADO GV, ROSSI F, GUIMARÃES T, LEVIN AS, COSTA SF.
310 Synergistic Effect of Ceftazidime-Avibactam with Meropenem against
311 Panresistant, Carbapenemase-Harboring *Acinetobacter baumannii* and *Serratia*
312 *marcescens* Investigated Using Time-Kill and Disk Approximation Assays.
313 *Antimicrob Agents Chemother*; 63(5). pii: e02367-18, 2019.

314 GUIMARÃES T, NOUÉR SA, MARTINS RCR, PERDIGÃO NETO LV,
315 MARTINS WMBS, NARCISO BARBOSA AC, FERREIRA ALP, COSTA SF,
316 GALES AC. Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused
317 by Enterobacteriales Coresistant to Carbapenems and Polymyxins. *Antimicrob*
318 *Agents Chemother*; 63(10), 2019.

319 HARRIS PNA, TAMBYAH PA, LYE DC, MO Y, LEE TH, YILMAZ M, ALENAZI
320 TH, ARABI Y, FALCONE M, BASSETTI M, RIGHI E, ROGERS BA, KANJ S,
321 BHALLY H, IREDELL J, MENDELSON M, BOYLES TH, LOOKE D, MIYAKIS S,
322 WALLS G, AL KHAMIS M, ZIKRI A, CROWE A, INGRAM P, DANEMAN N,
323 GRIFFIN P, ATHAN E, LORENC P, BAKER P, ROBERTS L, BEATSON SA,

324 PELEG AY, HARRIS-BROWN T, PATERSON DL; MERINO TRIAL
325 INVESTIGATORS AND THE AUSTRALASIAN SOCIETY FOR INFECTIOUS
326 DISEASE CLINICAL RESEARCH NETWORK (ASID-CRN). Effect of
327 Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients with *E.*
328 *coli* or *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection and Ceftriaxone
329 Resistance: A Randomized Clinical Trial. JAMA; 320(10):984-994, 2018.

330 <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>

331 LASHINSKY JN, HENIG O, POGUE JM, KAYE KS. Minocycline for the
332 Treatment of Multidrug and Extensively Drug-Resistant *A. baumannii*: A
333 Review. Infect Dis Ther;6(2):199-211, 2017.

334 LI J, YANG X, CHEN L, DUAN X, JIANG Z. In Vitro Activity of Various
335 Antibiotics in Combination with Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii*: A
336 Systematic Review and Meta-Analysis. Microb Drug Resist; 23(8):982-993,
337 2017.

338 LI J. Reviving Polymyxins: Achievements, Lessons and the Road Ahead. Adv
339 Exp Med Biol; 1145:1-8, 2019.

340 LIM CL, SPELMAN D. Mortality impact of empirical antimicrobial therapy in
341 ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae bacteremia in an Australian
342 tertiary hospital. Infect Dis Health; 24(3):124-133, 2019.

343 MARSHALL S, HUJER AM, ROJAS LJ, PAPP- WALLACE KM, HUMPHRIES
344 RM, SPELLBERG B, HUJER KM, MARSHALL EK, RUDIN SD, PEREZ F,
345 WILSON BM, WASSERMAN RB, CHIKOWSKI L, PATERSON DL, VILA AJ,
346 VAN DUIN D, KREISWIRTH BN, CHAMBERS HF, FOWLER VG, JR, JACOBS

- 347 MR, PULSE ME, WEISS WJ, BONOMO RA. Can ceftazidime-avibactam and
348 aztreonam overcome β -lactam resistance conferred by metallo- β -lactamases in
349 Enterobacteriaceae? *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02243-16, 2017.
- 350 MATUSCHEK E, ÅHMAN J, WEBSTER C, KAHLMETER G. Antimicrobial
351 susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products
352 against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
353 *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*;
354 24(8):865-870, 2018.
- 355 MELETIS G, SKOURA L. Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic
356 Resistance to mcr Genes. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*; 13(3):198-206,
357 2018.
- 358 MOFFATT JH, HARPER M, BOYCE JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance.
359 *Adv Exp Med Biol*; 1145:55-71, 2019.
- 360 ORSI TD, PERDIGÃO NETO LV, MARTINS RCR, LEVIN AS, COSTA SF.
361 Polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* assigned as ST245: First report
362 in an intensive care unit in São Paulo, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*; 16:147-
363 149, 2019.
- 364 SANDNER-MIRANDA L, VINUESA P, CRAVIOTO A, MORALES-ESPINOSA
365 R. The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the
366 Genus *Serratia*. *Front Microbiol*; 9:828, 2018.
- 367 SERIO AW, KEEPERS T, ANDREWS L, KRAUSE KM. Aminoglycoside
368 Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing
369 Rejuvenation. *EcoSal Plus*; 8(1), 2018.

- 370 SHANKAR C, NABARRO LEB, ANANDAN S, VEERARAGHAVAN B.
371 Minocycline and Tigecycline: What Is Their Role in the Treatment of
372 Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms? *Microb Drug Resist*;
373 23(4):437-446, 2017.
- 374 THEURETZBACHER U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative
375 pathogens and clinical need. *Curr Opin Microbiol*; 39:106-112, 2017.
- 376 TRAVIS A, CHERNOVA O, CHERNOV V, AMINOV R. Antimicrobial drug
377 discovery: lessons of history and future strategies. *Expert Opin Drug Discov*;
378 13(11):983-985, 2018.
- 379 VELKOV T, DAI C, CICCOTOSTO GD, CAPPAL R, HOYER D, LI J. *Pharmacol*
380 *Ther.* Polymyxins for CNS infections: Pharmacology and neurotoxicity;181:85-
381 90, 2018.
- 382 WILLIAMS PCM, WAICHUNGO J, GORDON NC, SHARLAND M, MURUNGA
383 S, KAMAU A, BERKLEY JA. The potential of fosfomycin for multi-drug resistant
384 sepsis: an analysis of in vitro activity against invasive paediatric Gram-negative
385 bacteria. *J Med Microbiol*; 68(5):711-719.
- 386 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO priority pathogens list for
387 R&D of new antibiotics. [https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-](https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)
388 [publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed), 2017.
389 (Last accessed 29 September 2019).
- 390 ZERBINO DR AND BIRNEY E. Velvet: algorithms for de novo short read
391 assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821-829, 2008.

392 ZHANG Z, CHEN M, YU Y, PAN S, LIU Y. Antimicrobial susceptibility among
393 gram-positive and Gram-negative blood-borne pathogens collected between
394 2012-2016 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial.
395 Antimicrob Resist Infect Control; 7:152, 2018.
396

397 Table 1. Antimicrobial susceptibility of 50 multiresistant microorganisms.

Species	Amik	Gent	Tobr	Cipr	Levo	SXT	Doxy	Mino	Tige	Chlor	Fosfo (CLSI)	Fosfo (EUCAST)	Ceft/Avib
<i>A. baumannii</i> (n=14)	7%	79%	64%	0%	0%	7%	93%	100%	100%	0%	64%	0%	0%
<i>P. aeruginosa</i> (n=1)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	100%
<i>S. marcescens</i> (n=8)	13%	50%	0%	0%	0%	13%	25%	25%	88%	0%	88%	88%	100%
<i>K. pneumoniae</i> (n=27)	67%	22%	7%	7%	11%	26%	52%	56%	100%	11%	4%	0%	96%
TOTAL (n=50)	40%	42%	22%	4%	6%	18%	58%	60%	96%	6%	36%	14%	72%

398 Amik – Amikacin; Gent – Gentamicin, Tobr – Tobramycin, Cipr – Ciprofloxacin, Levo –
399 Levofloxacin, SXT – Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Doxy – Doxycycline, Mino – Minocycline,
400 Tige – Tigecycline, Chlor – Chloramphenicol, Fosfo – Fosfomicin, CLSI – Clinical and
401 Laboratory Standards Institute, EUCAST – European Committee of Antomicrobial Susceptibility
402 Testing, Ceft/Avib – Ceftazidime/Avibactam

403 Table 2. Resistance codifying genes of 50 multiresistant microorganisms.

Species	Betalactamases encoding genes	Aminoglycosides resistance mechanisms	Sulfonamides resistance mechanisms	Tetracycline resistance mechanisms	Chloramphenicol resistance mechanisms	Fluoroquinolones resistance mechanisms	Fosfomycin resistance mechanisms	Tigecycline resistance mechanisms
A. baumannii (n=14)	<i>bla</i> OXA-51 (n=14) <i>bla</i> TEM-1A (n=12) <i>bla</i> ADC-25 (n=12) <i>bla</i> OXA-23 (n=11) <i>bla</i> OXA-65 (n=7) <i>bla</i> OXA-117 (n=3) <i>bla</i> OXA-116 (n=2) <i>bla</i> OXA-88 (n=1) <i>bla</i> OXA-231 (n=1)	<i>aadA</i> 1 (n=12) <i>aph</i> (3')- <i>Via</i> (n=12) <i>strB</i> (n=12) <i>strA</i> (n=11) <i>aadB</i> (n=1)	<i>sul2</i> (n=9)	<i>adeF</i> (n=14)*; <i>adeG</i> (n=14)*; <i>adeI</i> (n=14)*; <i>adeJ</i> (n=14)*; <i>adeK</i> (n=14)*; <i>adeA</i> (n=13)*; <i>adeB</i> (n=13)*; <i>adeL</i> (n=13)*; <i>adeC</i> (n=10)*; <i>adeH</i> (n=10)*; <i>adeN</i> (n=10)*; <i>adeR</i> (n=9)*; <i>adeS</i> (n=8)*	<i>adeI</i> (n=14)* <i>adeJ</i> (n=14)* <i>adeK</i> (n=14)* <i>adeN</i> (n=10)* <i>floR</i> (n=2)*	<i>abeM</i> (n=14)* <i>adeI</i> (n=14)* <i>adeJ</i> (n=14)* <i>adeK</i> (n=14)* <i>adeL</i> (n=13)* <i>adeH</i> (n=10)* <i>adeN</i> (n=10)*	-	<i>adeF</i> (n=14)* <i>adeG</i> (n=14)* <i>adeA</i> (n=13)* <i>adeB</i> (n=13)* <i>adeC</i> (n=10)* <i>adeR</i> (n=9)* <i>adeS</i> (n=8)*
P. aeruginosa (n=1)	<i>bla</i> OXA-50 <i>bla</i> OXA-129 <i>bla</i> PAO	<i>aacA</i> 4; <i>aadA</i> 6; <i>aadB</i> ; <i>aph</i> (3')- <i>Ilb</i> ; <i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i> ; <i>MexC</i> *; <i>MexD</i> *; <i>MexZ</i> *; <i>opmE</i> *; <i>OprJ</i> *; <i>OprM</i> *	<i>sul1</i> <i>MexA</i> * <i>nalC</i> * <i>opmE</i> *	<i>MexA</i> *; <i>MexC</i> *; <i>MexD</i> *; <i>MexG</i> *; <i>MexH</i> *; <i>MexI</i> *; <i>MexJ</i> *; <i>MexK</i> *; <i>MexL</i> *; <i>MexP</i> *; <i>MexR</i> *; <i>MexV</i> *; <i>MexW</i> *; <i>MexZ</i> *; <i>MuxA</i> *; <i>MuxB</i> *; <i>MuxC</i> *; <i>nalC</i> *; <i>nalD</i> *; <i>OpmB</i> *; <i>OpmD</i> *; <i>opmE</i> *; <i>OprJ</i> *; <i>OprM</i> *; <i>soxR</i> *; Type A <i>NfxB</i> *	<i>catB</i> 3; <i>catB</i> 7; <i>bcr-1</i> *; <i>MexA</i> *; <i>MexC</i> *; <i>MexD</i> *; <i>MexE</i> *; <i>MexF</i> *; <i>mexM</i> *; <i>mexN</i> *; <i>mexP</i> *; <i>MexR</i> *; <i>MexS</i> *; <i>MexT</i> *; <i>MexV</i> *; <i>MexW</i> *; <i>MexZ</i> *; <i>nalC</i> *; <i>nalD</i> *; <i>opmE</i> *; <i>OprJ</i> *; <i>OprM</i> *; <i>soxR</i> *; Type A <i>NfxB</i> *	<i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i> ; <i>CpxR</i> *; <i>emrR</i> *; <i>MexA</i> *; <i>MexC</i> *; <i>MexD</i> *; <i>MexE</i> *; <i>MexF</i> *; <i>MexG</i> *; <i>MexH</i> *; <i>MexI</i> *; <i>MexR</i> *; <i>MexS</i> *; <i>MexT</i> *; <i>MexV</i> *; <i>MexW</i> *; <i>MexZ</i> *; <i>nalC</i> *; <i>nalD</i> *; <i>OpmD</i> *; <i>opmE</i> *; <i>OprJ</i> *; <i>OprM</i> *; <i>soxR</i> *; Type A <i>NfxB</i> *	<i>fosA</i>	<i>soxR</i> *
S. marcescens (n=8)	<i>bla</i> SRT-2 (n=8) <i>bla</i> KPC-2 (n=6) <i>bla</i> OXA-101 (n=2) <i>bla</i> SHV-129 (n=2) <i>bla</i> TEM-1A (n=1) <i>bla</i> CTX-M-2 (n=1)	<i>aadB</i> (n=8) <i>aac</i> (6')- <i>Ic</i> (n=8) <i>aacA</i> 4 (n=6) <i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i> (n=6) <i>aph</i> (3')- <i>Via</i> (n=5) <i>aadA</i> 6 (n=2)	<i>sul1</i> (n=2) <i>sul2</i> (n=6)	<i>tet</i> (41) (n=6)* <i>tet</i> (D) (n=6)*	<i>cmx</i> (n=2)*	<i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i> (n=6) <i>crp</i> (n=8)*	-	-
K. pneumoniae (n=27)	<i>bla</i> KPC-2 (n=22) <i>bla</i> TEM-1B (n=18) <i>bla</i> SHV-11 (n=14) <i>bla</i> CTX-M-2 (n=10) <i>bla</i> OXA-2 (n=10) <i>bla</i> CTX-M-15 (n=8) <i>bla</i> CTX-M-14 (n=5) <i>bla</i> OXA-1 (n=4) <i>bla</i> TEM-1A (n=3) <i>bla</i> OXA-9 (n=3) <i>bla</i> LEN12 (n=3) <i>bla</i> CTX-M-8 (n=2) <i>bla</i> SHV-27 (n=1) <i>bla</i> LEN9 (n=1) <i>bla</i> SHV-36 (n=1)	<i>aadA</i> 2 (n=19) <i>baeR</i> (n=18)* <i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> (n=17) <i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i> (n=15) <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (n=11) <i>aacA</i> 4 (n=10) <i>strA</i> (n=9) <i>strB</i> (n=9) <i>aac</i> (3)- <i>Ild</i> (n=9) <i>aadA</i> 1 (n=5) <i>mtB</i> (n=5) <i>aph</i> (3')- <i>Via</i> (n=4) <i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> (n=2) <i>mtG</i> (n=1) <i>aac</i> (6')- <i>Iq</i> (n=1)	<i>sul1</i> (n=22) <i>sul2</i> (n=12)	<i>marA</i> (n=27)*; <i>H-NS</i> (n=26)*; <i>oqxA</i> (n=26)*; <i>marR</i> (n=25)*; <i>acrA</i> (n=22)*; <i>oqxB</i> (n=20)*; <i>tet</i> (D) (n=5)*; <i>tet</i> (G) (n=5)*; <i>tet</i> (B) (n=2)*; <i>tet</i> (A) (n=2)*; <i>tetR</i> (n=2)*; <i>tet</i> (C) (n=1)*	<i>marA</i> (n=27)* <i>marR</i> (n=25)* <i>acrA</i> (n=22)* <i>catA</i> 1 (n=12) <i>catB</i> 4 (n=3) <i>cmIA</i> 1 (n=2) <i>cmIA</i> (n=2)* <i>catA</i> 2 (n=1) <i>catB</i> 3 (n=1)	<i>emrR</i> (n=27)*; <i>marA</i> (n=27)*; <i>CRP</i> (n=26)*; <i>H-NS</i> (n=26)*; <i>oqxA</i> (n=26)*; <i>oqxA</i> (n=26); <i>oqxB</i> (n=25); <i>marR</i> (n=25)*; <i>emrB</i> (n=23)*; <i>patA</i> (n=23)*; <i>acrA</i> (n=22)*; <i>oqxB</i> (n=20)*; <i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i> (n=15); <i>qnrB</i> 19 (n=2); <i>qnrE</i> (n=2); <i>qnrB</i> 2 (n=1); <i>qnrB</i> 66 (n=1)	<i>fosA</i> (n=25)	<i>marA</i> (n=27)* <i>oqxA</i> (n=26)* <i>marR</i> (n=25)* <i>acrA</i> (n=22)* <i>oqxB</i> (n=20)* <i>tet</i> (A) (n=2)* <i>tetR</i> (n=2)*

404 * - efflux pumps

1

Supplementary Material

2 Table S1 – Sequence types, betalactamases and susceptibility to meropenem and polymyxin B
3 of 50 multiresistant Gram-negative isolates.

4

Isolate	Species	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)	
				Meropenem	Polymyxin B
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-117, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
2	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-117, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
3	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
5	<i>A. baumannii</i>	836	<i>blaOXA-23, blaOXA-117, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-116, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
9	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-65, blaTEM-1A, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
13	<i>A. baumannii</i>	317	<i>blaADC-25, blaOXA-23, blaOXA-88, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>blaADC-25, blaOXA-116, blaOXA-231, blaOXA-51</i>	> 8 (R)	0,5 (S)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>blaOXA-50, blaOXA-129, blaPAO</i>	8 (R)	> 4 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaKPC-2, blaSRT-2</i>	> 8 (R)	4 (R)
17	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaKPC-2, blaSRT-2</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
18	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaKPC-2, blaSRT-2</i>	8 (R)	> 4 (R)
19	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaCTX-M-2, blaOXA-101, blaSRT-2, blaTEM-1A</i>	≤ 1 (S)	> 4 (R)
20	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaKPC-2, blaSRT-2</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
21	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaKPC-2, blaSHV-129, blaSRT-2</i>	≤ 1 (S)	> 4 (R)
22	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaKPC-2, blaSHV-129, blaSRT-2</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
23	<i>S. marcescens</i>	-	<i>blaOXA-101, blaSRT-2</i>	≤ 1 (S)	> 4 (R)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaTEM-1B</i>	8 (R)	1 (S)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>blaOXA-9, blaKPC-2, blaTEM-1A</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>blaCTX-M-14, blaSHV-27, blaTEM-1B</i>	≤ 1 (S)	1 (S)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>blaCTX-M-15, blaKPC-2, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	8 (R)	2 (S)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>blaCTX-M-14, blaKPC-2, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>blaCTX-M-8, blaLEN9, blaOXA-9, blaTEM-1A</i>	≤ 1 (S)	1 (S)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>blaCTX-M-15, blaKPC-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaCTX-M-8, blaKPC-2, blaOXA-2, blaSHV-11</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaOXA-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaOXA-2, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>blaCTX-M-14, blaKPC-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaOXA-2, blaSHV-11</i>	2 (I)	> 4 (R)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaOXA-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaKPC-2, blaOXA-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaOXA-2, blaOXA-9, blaSHV-36, blaTEM-1A</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaLEN12, blaOXA-2, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-2, blaLEN12, blaOXA-2, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-15, blaKPC-2, blaSHV-11</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>blaKPC-2, blaLEN12, blaSHV-11</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>blaCTX-M-15, blaKPC-2, blaOXA-1, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>blaCTX-M-2, blaKPC-2, blaOXA-2, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>blaCTX-M-14, blaKPC-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>blaCTX-M-15, blaKPC-2, blaOXA-1</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>blaCTX-M-15, blaKPC-2, blaSHV-11</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>blaCTX-M-14, blaKPC-2, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	> 8 (R)	> 4 (R)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>blaCTX-M-15, blaSHV-11, blaTEM-1B</i>	2 (I)	> 4 (R)

5 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible. I-
6 intermediate.

7

8 Table S2 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to aminoglycosides in 50
9 multiresistant Gram-negative isolates.

10

Isolate	Species	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)			
				Amika	Genta	Estrept	Tobra
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	2 (S)
2	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	4 (S)
3	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	8 (I)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	4 (S)
5	<i>A. baumannii</i>	836	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	2 (S)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	8 (I)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	2 (S)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	≤ 1 (S)
9	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	16 (R)	>256	2 (S)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	4 (S)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	32 (R)	>256	8 (I)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>aadA1, aph(3')-Vla, strA, strB</i>	> 32 (R)	4 (S)	>256	2 (S)
13	<i>A. baumannii</i>	317	-	8 (S)	4 (S)	64	8 (I)
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>aadB, aph(3')-Vla</i>	> 32 (R)	32 (R)	8	8 (I)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>aacA4, aadA6, aadB, aph(3')-Iib, aac(6')Ib-cr, MexC*, MexD*, MexZ*, oprM*, OprJ*, OprM*</i>	> 32 (R)	>256 (R)	>256	> 8 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aacA4, aac(6')-Ic, aadB, aph(3')-Vla, aac(6')Ib-cr</i>	32 (R)	2 (S)	2	> 8 (R)
17	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aacA4, aac(6')-Ic, aadB, aph(3')-Vla, aac(6')Ib-cr</i>	> 32 (R)	4 (S)	4	> 8 (R)
18	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aacA4, aac(6')-Ic, aadB, aph(3')-Vla, aac(6')Ib-cr</i>	> 32 (R)	32 (R)	64	> 8 (R)
19	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')-Ic, aadA6, aadB, aph(3')-Vla</i>	> 32 (R)	16 (R)	32	> 8 (R)
20	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aacA4, aac(6')-Ic, aadB, aph(3')-Vla, aac(6')Ib-cr</i>	> 32 (R)	4 (S)	1	> 8 (R)
21	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aacA4, aac(6')-Ic, aadB, aac(6')Ib-cr</i>	32 (R)	16 (R)	2	> 8 (R)
22	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aacA4, aac(6')-Ic, aadB, aac(6')Ib-cr</i>	> 32 (R)	4 (S)	4	> 8 (R)
23	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')-Ic, aadA6, aadB</i>	8 (S)	16 (R)	16	> 8 (R)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aadA1, aadA2, aph(3')-Ia, aph(3')-Via, baeR*</i>	≤ 4 (S)	8 (I)	16	2 (S)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>aac(6')-Ib, aadA1, aadA2, aph(3')-Ia, rmtG, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	> 32 (R)	>256 (R)	32	> 8 (R)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>aac(3)-Ild, aadA2, rmtB, strA, strB, baeR*</i>	> 32 (R)	>256 (R)	128	> 8 (R)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>aac(3)-Ild, aadA2, aph(3')-Ia</i>	8 (S)	64 (R)	8	> 8 (R)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>aac(3)-Ild, aadA2, aph(3')-Ia, rmtB, strA, strB</i>	> 32 (R)	>256 (R)	256	> 8 (R)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>aac(6')-Ib, aadA1, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	16 (S)	4 (S)	32	> 8 (R)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>aac(3)-Ild, aadA2, aph(3')-Vla, strA, strB, baeR*</i>	≤ 4 (S)	32 (R)	>256	> 8 (R)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	≤ 4 (S)	32 (R)	2	> 8 (R)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aadA2, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	8 (S)	128 (R)	8	> 8 (R)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aadA2, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr</i>	8 (S)	128 (R)	16	> 8 (R)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>aac(3)-Ild, aadA2, aph(3')-Ia, rmtB, strA, strB, baeR*</i>	> 32 (R)	>256 (R)	128	> 8 (R)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aacA4, aadA1, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr</i>	16 (S)	>256 (R)	32	> 8 (R)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aadA2, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	8 (S)	128 (R)	8	> 8 (R)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aadA2, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	≤ 4 (S)	64 (R)	8	> 8 (R)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	8 (S)	64 (R)	1	> 8 (R)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>aac(3)-Ila, aac(6')-Iq, aacA4, aadA1, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	≤ 4 (S)	64 (R)	2	> 8 (R)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ila, aacA4, aadA2, aac(6')Ib-cr</i>	> 32 (R)	256 (R)	8	> 8 (R)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aadA2, aph(3')-Ia, aph(3')-Via, baeR*</i>	> 32 (R)	≤0,5 (S)	16	> 8 (R)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>aadA2, aph(3')-Ia</i>	≤ 4 (S)	≤0,5 (S)	16	> 8 (R)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>aac(3)-Ila, aac(6')Ib-cr, aph(3')-Ia, strA, strB, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	≤ 4 (S)	≤0,5 (S)	8	8 (I)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>aacA4, aac(3)-Ila, aadA2, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr</i>	≤ 4 (S)	64 (R)	4	> 8 (R)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>aac(3)-Ild, aadA2, rmtB, strA, strB</i>	> 32 (R)	>256 (R)	256	> 8 (R)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>aac(6')Ib-cr, aadA2, aph(3')-Ia, aac(6')Ib-cr, baeR*</i>	≤ 4 (S)	≤0,5 (S)	16	8 (I)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>aac(3)-Ild, aac(6')Ib-cr, aph(3')-Ia, strA, strB, aac(6')Ib-cr</i>	≤ 4 (S)	32 (R)	256	> 8 (R)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>aph(3')-Ia, baeR*</i>	≤ 4 (S)	≤0,5 (S)	1	≤ 1 (S)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>aac(3)-Ild, aadA2, rmtB, strA, strB, baeR*</i>	> 32 (R)	>256 (R)	128	> 8 (R)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>aac(3)-Ild, aadA2, aph(3')-Vla, strA, strB, baeR*</i>	32 (R)	64 (R)	>256	8 (I)

11 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible. I-
12 intermediate. Amika – amikacin; Genta – gentamicin; Estrepto – estreptomycin; Tobra –
13 tobramycin. * – efflux pump.

14

15 Table S3 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to quinolones in 50
 16 multiresistant Gram-negative isolates.

17

Isolate	Species	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)	
				Cipro	Levo
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
2	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
3	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
5	<i>A. baumannii</i>	836	<i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>abeM*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
9	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	8 (R)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
13	<i>A. baumannii</i>	317	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i> , <i>adeN*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>adeH*</i> , <i>adel*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeL*</i> , <i>abeM*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>CpxR*</i> ; <i>emrR*</i> ; <i>MexA*</i> ; <i>MexC*</i> ; <i>MexD*</i> ; <i>MexE*</i> ; <i>MexF*</i> ; <i>MexG*</i> ; <i>MexH*</i> ; <i>MexI*</i> ; <i>MexR*</i> ; <i>MexS*</i> ; <i>MexT*</i> ; <i>MexV*</i> ; <i>MexW*</i> ; <i>MexZ*</i> ; <i>nalC*</i> ; <i>nalD*</i> ; <i>OpmD*</i> ; <i>opmE*</i> ; <i>OprJ*</i> ; <i>OprM*</i> ; <i>soxR*</i> ; Type A <i>NfxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>crp*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
17	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>crp*</i>	> 2 (R)	8 (R)
18	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>crp*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
19	<i>S. marcescens</i>	-	<i>crp*</i>	> 2 (R)	8 (R)
20	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>crp*</i>	> 2 (R)	8 (R)
21	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>crp*</i>	> 2 (R)	4 (I)
22	<i>S. marcescens</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>crp*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
23	<i>S. marcescens</i>	-	<i>crp*</i>	> 2 (R)	4 (R)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	≤ 0,06 (S)	≤ 1 (S)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> ; <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i> , <i>qnrB2</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i> , <i>qnrE</i>	2 (I)	≤ 1 (S)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i> , <i>qnrB19</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i> , <i>qnrE</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	4 (R)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	8 (R)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	8 (R)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	0,5 (S)	≤ 1 (S)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i> , <i>qnrB66</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i>	> 2 (R)	8 (R)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i>	> 2 (R)	> 8 (R)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>emrB*</i> , <i>emrR*</i> , <i>marA*</i> , <i>CRP*</i> , <i>H-NS*</i> , <i>marR*</i> , <i>patA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>oqxA*</i> , <i>oqxB*</i> , <i>qnrB19</i>	> 2 (R)	> 8 (R)

18 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible. I-
 19 intermediate. Cipro – ciprofloxacin; Levo – Levofloxacin. * – efflux pump.

20

21 Table S4 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to
 22 sulfamethoxazol/trimethoprim in 50 multiresistant Gram-negative isolates.

23

Isolate	Species	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
2	<i>A. baumannii</i>	79	-	> 4/76 (R)
3	<i>A. baumannii</i>	79	-	> 4/76 (R)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
5	<i>A. baumannii</i>	836	-	> 4/76 (R)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
9	<i>A. baumannii</i>	79	-	> 4/76 (R)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
13	<i>A. baumannii</i>	317	-	≤ 0,5/9,5 (S)
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>MexA*</i> , <i>nalC*</i> , <i>opmE*</i> , <i>sul1</i>	> 4/76 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
17	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
18	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
19	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
20	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
21	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul2</i>	2/38 (S)
22	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
23	<i>S. marcescens</i>	-	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	1/19 (S)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	1/19 (S)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	-	≤ 0,5/9,5 (S)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	≤ 0,5/9,5 (S)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	≤ 0,5/9,5 (S)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>sul2</i>	≤ 0,5/9,5 (S)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>sul1</i>	> 4/76 (R)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>sul2</i>	> 4/76 (R)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	-	≤ 0,5/9,5 (S)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	> 4/76 (R)

24 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible.
 25 * – efflux pump.
 26

27 Table S5 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to tetracyclines in 50
 28 multiresistant Gram-negative isolates.

29

Isolate	Species	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)	
				Doxy	Mino
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeR</i> [*]	0,5 (S)	0,5 (S)
2	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*]	0,5 (S)	1 (S)
3	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	2 (S)	0,5 (S)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	0,5 (S)	0,5 (S)
5	<i>A. baumannii</i>	836	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*]	0,5 (S)	0,25 (S)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*]	1 (S)	0,5 (S)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeR</i> [*]	1 (S)	1 (S)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	2 (S)	0,5 (S)
9	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	8 (I)	4 (S)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	1 (S)	0,5 (S)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	0,5 (S)	0,25 (S)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeC</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeR</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	0,5 (S)	1 (S)
13	<i>A. baumannii</i>	317	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adeA</i> [*] ; <i>adeB</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeH</i> [*] ; <i>adeN</i> [*] ; <i>adeS</i> [*]	0,5 (S)	≤0,125
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>adeF</i> [*] ; <i>adeG</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeJ</i> [*] ; <i>adeK</i> [*] ; <i>adel</i> [*] ; <i>adeH</i> [*]	1 (S)	0,5 (S)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>MexA</i> [*] ; <i>MexC</i> [*] ; <i>MexD</i> [*] ; <i>MexG</i> [*] ; <i>MexH</i> [*] ; <i>MexI</i> [*] ; <i>MexJ</i> [*] ; <i>MexK</i> [*] ; <i>MexL</i> [*] ; <i>MexP</i> [*] ; <i>MexR</i> [*] ; <i>MexV</i> [*] ; <i>MexW</i> [*] ; <i>MexZ</i> [*] ; <i>MuxA</i> [*] ; <i>MuxB</i> [*] ; <i>MuxC</i> [*] ; <i>nalC</i> [*] ; <i>nalD</i> [*] ; <i>OpmB</i> [*] ; <i>OpmD</i> [*] ; <i>opmE</i> [*] ; <i>OprJ</i> [*] ; <i>OprM</i> [*] ; <i>soxR</i> [*] ; Type A <i>NfxB</i> [*]	8 (R)	16 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	<i>tet(41)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	>64 (R)	>64 (R)
17	<i>S. marcescens</i>	-	<i>tet(41)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	>64 (R)	>64 (R)
18	<i>S. marcescens</i>	-	<i>tet(41)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	4 (S)	4 (S)
19	<i>S. marcescens</i>	-	-	4 (S)	8 (I)
20	<i>S. marcescens</i>	-	<i>tet(41)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	>64 (R)	>64 (R)
21	<i>S. marcescens</i>	-	<i>tet(41)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	>64 (R)	>64 (R)
22	<i>S. marcescens</i>	-	<i>tet(41)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	>64 (R)	>64 (R)
23	<i>S. marcescens</i>	-	-	8 (I)	4 (S)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*]	2 (S)	2 (S)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>tet(G)</i> [*]	8 (I)	4 (S)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	64 (R)	32 (R)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(G)</i> [*]	32 (R)	8 (I)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*]	1 (S)	4 (S)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(A)</i> [*] ; <i>tet(B)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*] ; <i>tetR</i> [*]	64 (R)	>64 (R)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	2 (S)	4 (S)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	2 (S)	2 (S)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(G)</i> [*]	16 (R)	8 (I)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*]	8 (I)	8 (I)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*]	4 (S)	4 (S)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	4 (S)	4 (S)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	8 (I)	8 (I)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	4 (S)	4 (S)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	2 (S)	4 (S)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(G)</i> [*]	32 (R)	8 (I)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>tet(A)</i> [*] ; <i>tet(C)</i> [*]	8 (I)	8 (I)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*]	64 (R)	64 (R)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*]	8 (I)	16 (R)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(G)</i> [*]	16 (R)	32 (R)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA</i> [*] ; <i>H-NS</i> [*] ; <i>marR</i> [*] ; <i>acrA</i> [*] ; <i>oqxA</i> [*] ; <i>oqxB</i> [*] ; <i>tet(A)</i> [*] ; <i>tet(B)</i> [*] ; <i>tet(D)</i> [*] ; <i>tetR</i> [*]	64 (R)	32 (R)

30 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible. I-
 31 intermediate. Doxy – Doxycycline; Mino – Minocycline. * – efflux pump.

32

33 Table S6 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to tigecycline in 50
34 multiresistant Gram-negative isolates.

35

Isolate	Espécie	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i>	2 (S)
2	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i>	1 (S)
3	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	2 (S)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeL*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
5	<i>A. baumannii</i>	836	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i>	1 (S)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeR*</i>	2 (S)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i>	1 (S)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
9	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeI*</i> ; <i>adeJ*</i> ; <i>adeK*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeL*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeH*</i> ; <i>adeN*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeC*</i> ; <i>adeR*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
13	<i>A. baumannii</i>	317	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i> ; <i>adeA*</i> ; <i>adeB*</i> ; <i>adeS*</i>	1 (S)
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>adeF*</i> ; <i>adeG*</i>	0,5 (S)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>soxR*</i>	8 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	-	1 (S)
17	<i>S. marcescens</i>	-	-	2 (S)
18	<i>S. marcescens</i>	-	-	1 (S)
19	<i>S. marcescens</i>	-	-	1 (S)
20	<i>S. marcescens</i>	-	-	1 (S)
21	<i>S. marcescens</i>	-	-	4 (I)
22	<i>S. marcescens</i>	-	-	0,5 (S)
23	<i>S. marcescens</i>	-	-	2 (S)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>marA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i>	0,5 (S)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i>	0,5 (S)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>H-NS*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>tet(D)*</i>	≤ 0,25 (S)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i>	0,5 (S)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i> ; <i>tet (A)*</i> ; <i>tet(D)*</i> ; <i>tetR*</i>	0,5 (S)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i>	1 (S)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i>	0,5 (S)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	0,5 (S)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	2 (S)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i> ; <i>tet(D)*</i>	0,5 (S)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>tet(A)*</i>	2 (S)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i> ; <i>tet(D)*</i>	2 (S)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	2 (S)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i>	1 (S)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> ; <i>marR*</i> ; <i>acrA*</i> ; <i>oqxA*</i> ; <i>oqxB*</i> ; <i>tet(A)*</i> ; <i>tet(D)*</i> ; <i>tetR*</i>	0,5 (S)

36 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible. I-
37 intermediate. * – efflux pump.

38

39 Table S7 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to chloramphenicol of 50
 40 multiresistant Gram-negative isolates.

41

Isolate	Espécie	ST	Genes	MIC (Category of susceptibility)
1	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i>	256 (R)
2	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i> , <i>floR</i>	>256 (R)
3	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	>256 (R)
4	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
5	<i>A. baumannii</i>	836	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i>	256 (R)
6	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
7	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i>	256 (R)
8	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
9	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
10	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
11	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
12	<i>A. baumannii</i>	79	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	256 (R)
13	<i>A. baumannii</i>	317	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>adeN*</i>	128 (R)
14	<i>A. baumannii</i>	835	<i>adeI*</i> , <i>adeJ*</i> , <i>adeK*</i> , <i>floR</i>	>256 (R)
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>bcr-1*</i> ; <i>MexA*</i> ; <i>MexC*</i> ; <i>MexD*</i> ; <i>MexE*</i> ; <i>MexF*</i> ; <i>mexM*</i> ; <i>mexN*</i> ; <i>mexP*</i> ; <i>MexR*</i> ; <i>MexS*</i> ; <i>MexT*</i> ; <i>MexV*</i> ; <i>MexW*</i> ; <i>MexZ*</i> ; <i>nalC*</i> ; <i>nalD*</i> ; <i>oprE*</i> ; <i>OprJ*</i> ; <i>OprM*</i> ; <i>soxR*</i> ; Type A <i>NfxB*</i> , <i>catB3</i> , <i>catB7</i>	128 (R)
16	<i>S. marcescens</i>	-	-	>256 (R)
17	<i>S. marcescens</i>	-	-	16 (I)
18	<i>S. marcescens</i>	-	-	>256 (R)
19	<i>S. marcescens</i>	-	<i>cmx*</i>	>256 (R)
20	<i>S. marcescens</i>	-	-	16 (I)
21	<i>S. marcescens</i>	-	-	16 (I)
22	<i>S. marcescens</i>	-	-	64 (R)
23	<i>S. marcescens</i>	-	<i>cmx*</i>	64 (R)
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	256 (R)
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	16 (I)
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	256 (R)
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catB3</i>	64 (R)
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	4 (S)
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	32 (R)
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	256 (R)
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	128 (R)
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>catA1</i> , <i>catA2</i> , <i>cmlA1</i>	>256 (R)
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>cmlA*</i>	64 (R)
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	64 (R)
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>catB4</i>	8 (S)
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catB4</i>	32 (R)
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catB4</i>	4 (S)
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>cmlA*</i>	64 (R)
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i> , <i>catA1</i>	>256 (R)
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>marA*</i> , <i>marR*</i> , <i>acrA*</i> , <i>cmlA*</i>	32 (R)

42 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S –
 43 susceptible. I- intermediate. * – efflux pump.

44

45 Table S8 – Sequence types, resistance genes and susceptibility to fosfomicin in 50
46 multiresistant Gram-negative isolates.

47

Isolate	Species	ST	Genes	Fosfomicin MIC	CLSI	EUCAST
1	<i>A. baumannii</i>	79	-	128	I	R
2	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
3	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
4	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
5	<i>A. baumannii</i>	836	-	128	I	R
6	<i>A. baumannii</i>	79	-	256	R	R
7	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
8	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
9	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
10	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
11	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
12	<i>A. baumannii</i>	79	-	64	S	R
13	<i>A. baumannii</i>	317	-	256	R	R
14	<i>A. baumannii</i>	835	-	256	R	R
15	<i>P. aeruginosa</i>	245	<i>fosA</i>	64	S	R
16	<i>S. marcescens</i>	-	-	8	S	S
17	<i>S. marcescens</i>	-	-	8	S	S
18	<i>S. marcescens</i>	-	-	16	S	S
19	<i>S. marcescens</i>	-	-	8	S	S
20	<i>S. marcescens</i>	-	-	8	S	S
21	<i>S. marcescens</i>	-	-	8	S	S
22	<i>S. marcescens</i>	-	-	8	S	S
23	<i>S. marcescens</i>	-	-	512	R	R
24	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	1024	R	R
25	<i>K. pneumoniae</i>	442	<i>fosA</i>	1024	R	R
26	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>fosA</i>	256	R	R
27	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>fosA</i>	512	R	R
28	<i>K. pneumoniae</i>	340	-	1024	R	R
29	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>fosA</i>	64	S	R
30	<i>K. pneumoniae</i>	25	<i>fosA</i>	1024	R	R
31	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	1024	R	R
32	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	256	R	R
33	<i>K. pneumoniae</i>	11	-	>1024	R	R
34	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>fosA</i>	256	R	R
35	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	512	R	R
36	<i>K. pneumoniae</i>	234	<i>fosA</i>	1024	R	R
37	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	1024	R	R
38	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	512	R	R
39	<i>K. pneumoniae</i>	23	<i>fosA</i>	256	R	R
40	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	512	R	R
41	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	512	R	R
42	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>fosA</i>	256	R	R
43	<i>K. pneumoniae</i>	437	<i>fosA</i>	256	R	R
44	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>fosA</i>	1024	R	R
45	<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>fosA</i>	1024	R	R
46	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>fosA</i>	1024	R	R
47	<i>K. pneumoniae</i>	16	<i>fosA</i>	256	R	R
48	<i>K. pneumoniae</i>	101	<i>fosA</i>	512	R	R
49	<i>K. pneumoniae</i>	340	<i>fosA</i>	>1024	R	R
50	<i>K. pneumoniae</i>	258	<i>fosA</i>	>1024	R	R

48 ST – Sequence types. MIC – Minimal inhibitory concentration. R – resistant. S – susceptible. I-
49 intermediate.

50

Pontos importantes

O estudo de sensibilidade a opções terapêuticas a carbapenêmicos e polimixinas envolveu microrganismos de linhagens distintas. Os isolados de *A. baumannii* pertencem aos ST79 (n=11), ST317 (n=1), ST835 (n=1) e ST836 (n=1). O isolado de *P. aeruginosa* pertence ao ST245. Os isolados de *K. pneumoniae* pertencem aos ST11 (n=10), ST340 (n=6), ST258 (n=4), ST16 (n=1), ST23 (n=1), ST25 (n=1), ST101 (n=1), ST234 (n=1), ST437 (n=1) e ST442 (n=1).

No total, vinte isolados (40%) se mostraram sensíveis à amicacina; a sensibilidade foi mais frequente no grupo de *K. pneumoniae*: 18 dos 27 isolados (67%). Vinte e um isolados (42%) se mostraram sensíveis à gentamicina; a sensibilidade foi mais frequente em *A. baumannii*: 79% dos isolados desta espécie. Dentre os Gram negativos testados, apenas onze se mostraram sensíveis à tobramicina (22%): nove *A. baumannii* (64% dos isolados desta espécie), uma *S. marcescens* (12%) e uma *K. pneumoniae* (4%). As MIC50 e MIC90 para a estreptomicina foram 32 e >256 µg/mL. Apenas uma cepa não apresentou enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Seis cepas (12%) apresentaram metilases em seus genomas (*rmtB* ou *rmtG*). Apenas duas (4%) e três (6%) isolados foram sensíveis à ciprofloxacina e à levofloxacina, respectivamente (todas *K. pneumoniae*). Os genes associados à resistência às quinolonas mais frequentemente detectados foram bombas de efluxo. A sensibilidade à combinação sulfametoxazol/trimetoprim ocorreu apenas em nove isolados (18%). Os genes *sul1* e *sul2* foram detectados em 25 e 27 isolados, respectivamente. Vinte e nove isolados (58%) foram sensíveis à doxiciclina e 30 (60%) à minociclina. Todos os isolados de *A. baumannii* e 15 *K. pneumoniae* (56%) foram sensíveis a pelo menos uma das tetraciclinas. Com exceção do isolado resistente de *P. aeruginosa* e de um isolado de *S. marcescens* com sensibilidade intermediária, todos os outros isolados se mostraram sensíveis, com MIC50 e MIC90 de 1 e 2 µg/mL. Apenas três isolados (6%) foram sensíveis a cloranfenicol, e genes codificadores de mecanismos de resistência a cloranfenicol foram frequentes. As MIC50 e MIC90 para fosfomicina foram 256 e > 1024 µg/mL, respectivamente.

Utilizando-se critérios do CLSI e do EUCAST, 18 (36%) e sete (14%) isolados foram sensíveis, respectivamente. O gene *fosA* foi detectado em 26 (52%) dos isolados.

A combinação ceftazidima/avibactam se mostrou ativa em 72% e 66% ativa quando testada por microdiluição e por disco difusão, respectivamente. Apesar de não ter sido ativa em nenhuma cepa de *A. baumannii*, foi ativa no isolado de *P. aeruginosa*, em todos os isolados de *S. marcescens* e 96% dos isolados de *K. pneumoniae*.

4.3. Estudo clínico sobre uso da fosfomicina

Maiores detalhes do estudo clínico estão contidos no artigo intitulado “Fosfomicin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms: synergy with meropenem”, publicado no periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Jan 1;74(1):177-181, 2019, doi: 10.1093/jac/dky406], na íntegra abaixo.

JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY – Brief report**Title: Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pandrug resistant Gram-negative microorganisms: synergy with Meropenem**

Authors: Lauro Vieira Perdigão Neto^{1,2#}, Maura S Oliveira^{1,2}, Roberta Cristina Ruedas Martins², Ana Paula Marchi², Juliana Januário Gaudereto², Lucianna Auxi Teixeira Josino da Costa³, Lia Fernandes Alves de Lima³, Christianne Fernandes Valente Takeda³, Silvia F Costa², Anna S Levin^{1,2}.

1- Department of Infection Control of Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Brazil

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225, Sala 629; São Paulo-SP; 05403-010; Brazil.

2- Department of Infectious Diseases and LIM-54, Universidade de Sao Paulo, Brazil

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470; São Paulo-SP; 05403-000; Brazil.

3- Department of Infection Control of Hospital Geral de Fortaleza, Brazil

Rua Ávila Goulart, 900; Fortaleza – CE; 60175-295; Brazil.

#Corresponding author: Lauro Vieira Perdigão Neto

Address: Rua Arruda Alvim, 107, #142, São Paulo-SP, 05410-020, Brazil.

Phone/fax: 55-11-2661-7066; e-mail: lauro_perdigao@hotmail.com

Running title: Efficacy and safety of fosfomycin

24 **Abstract**

25 *Background.* *In vitro* and clinical studies using parenteral fosfomycin have
26 suggested the possibility of using this drug against infections caused by
27 multiresistant microorganisms. The aim of this study was to describe a case
28 series of patients treated with fosfomycin with severe infections caused by pan-
29 resistant Gram-negative bacteria.

30 *Methods.* Prospective series of cases of hospitalized patients with infections
31 caused by Gram-negative bacteria resistant to β -lactams and colistin, treated
32 with fosfomycin 16g daily for 10 to 14 days. Isolates were tested for
33 antimicrobial susceptibility and synergism of fosfomycin with meropenem. The
34 presence of resistance genes and typing were done using PCR and WGS.

35 *Results.* Thirteen patients received fosfomycin (seven immunosuppressed), with
36 bloodstream infections (n=11; 85%), ventilator-associated pneumonia (n=1; 8%)
37 and surgical site infection (n=1; 8%), caused by *K. pneumoniae* (n=9), *S.*
38 *marcescens* (n=3) and *P. aeruginosa* (n=1). Overall, eight (62%) patients were
39 cured. Using time-kill assay, synergism between fosfomycin and meropenem
40 occurred in nine (82%) of eleven isolates. Typing demonstrated that *K.*
41 *pneumoniae* were polyclonal. Eight patients (62%) had possible adverse
42 events, but therapy was not discontinued.

43 *Conclusions.* Fosfomycin may be safe and effective against infections caused
44 by pan-resistant Gram-negative microorganisms with different antimicrobial
45 resistance mechanisms, and there seems to be synergism with meropenem.

46 INTRODUCTION

47 Treatment of multidrug-resistant microorganisms is difficult.¹ Multidrug-resistant
48 Gram-negative microorganisms are treated with either colistin or polymyxin B
49 alone or in combination.² However, resistance to these has increased.¹

50 Fosfomicin is an low molecular weight compound unrelated to other
51 antimicrobials and interferes in cell wall synthesis binding to UDP-GlcNAc-3-O-
52 enolpyruvyltransferase (MurA), responsible for peptidoglycan biosynthesis.³ *In*
53 *vitro* studies showed susceptibility of multidrug-resistant Gram-negatives to
54 fosfomicin, and synergism between fosfomicin and other antimicrobials.⁴ Oral
55 fosfomicin is used to treat uncomplicated urinary infections.⁵ A few
56 heterogeneous or retrospective studies have suggested the possibility of using
57 the parenteral form against multiresistant microorganisms.⁵⁻⁸ Prospective
58 studies are scarce.⁹

59 The aim of this study was to describe a series of cases of severe infections
60 caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria, treated with intravenous
61 (IV) fosfomicin.

62 MATERIAL AND METHODS

63 Setting and patients

64 Prospective series of cases of healthcare-associated infections by β -lactams
65 and colistin-resistant Gram-negative bacteria, at two tertiary-care, teaching
66 hospitals, treated with fosfomicin (2013-2016). Patients with allergy to
67 fosfomicin; <18 years-old; pregnant or lactating; unable to consent; undergoing
68 dialysis; *Acinetobacter* infections; non-bacteremic urinary infections; at high risk
69 of death within 48h (determined by the attending physician); or requiring
70 treatment for >30 days, were excluded.

71 Protocol

72 The study was approved by the Hospitals' Ethics Committee for compassionate
73 use: the microorganism was not susceptible to any other antimicrobials. Thus,
74 candidate patients for this compassionate use were those with severe infections
75 with no antimicrobial therapy option. Informed consent was obtained for all.
76 Patients received IV fosfomicin (4g q.i.d. for 10-14 days).

77 Follow-up

78 Follow-up occurred during hospitalization. Demographic, clinical and laboratory
79 data were registered. Clinical outcomes were: indeterminate (death, cessation
80 of fosfomicin, or association of another antimicrobial active *in vitro* against the
81 microorganism during the first 72h of treatment); therapeutic failure (death after
82 72h of fosfomicin therapy, diagnosis of sepsis at end of treatment, introduction
83 of another antimicrobial for treatment of Gram-negative infection, or re-isolation
84 of the agent ≤ 10 days after the antimicrobial treatment); and cure (absence of
85 sepsis, attenuation or resolution of clinical signs and symptoms, improvement of
86 support parameters defined by the attending team, and improvement or
87 normalization of tests related to therapeutic response). Mortality was evaluated
88 at 14 and 28 days of treatment. We compared the group that received
89 meropenem with the group that did not; the mean and the standard deviation of
90 APACHE II scores were calculated and compared using *t* test (Epiinfo v.7,
91 CDC, Atlanta, USA). Safety assessments included gastrointestinal symptoms;
92 rash; ototoxicity; nephrotoxicity; injection site pain; phlebitis; hypertension; heart
93 failure, potassium, sodium, magnesium, and chloride levels; neutropenia;
94 eosinophilia; and changes in platelet counts and levels of transaminases.

95

96 **Isolates**

97 Identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using
98 automated Vitek MS and Vitek-2 systems (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA).

99 Resistance to carbapenems and colistin was confirmed by broth microdilution
100 using CLSI breakpoints.¹⁰ As there are no established colistin breakpoints for
101 Enterobacteriaceae we used *Acinetobacter* cutoffs.¹⁰ Minimum inhibitory
102 concentration (MIC) for fosfomicin was determined by agar dilution, adding
103 glucose-6-phosphate.¹⁰

104 Isolates from patients who received fosfomicin+meropenem were investigated
105 for synergism by checkerboard and time-kill. For checkerboard, synergism was
106 defined as fractional inhibitory concentration index ≤ 0.5 .¹¹ For time-kill assays,
107 fosfomicin and meropenem were tested alone and combined at 0.5xMIC.
108 Synergism was defined as ≥ 2 -log₁₀ decrease in colony count at 24h with the
109 combination compared to the most active single agent and below the starting
110 inoculum.¹¹

111 Clonality of *Klebsiella pneumoniae* isolates was investigated using pulsed-field
112 gel electrophoresis using SpeI (Life Sciences, Canada), as previously
113 described.¹² *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48} and *mcr-1* genes were investigated using
114 polymerase chain reaction.^{13,14} The isolates were also sequenced using MiSeq
115 Illumina (Illumina, San Diego, USA).

116

117 RESULTS

118 There were 915 patients who met inclusion criteria; after applied the exclusion
119 criteria, thirteen patients were admitted to the protocol. Eight (62%) were males.
120 Mean age was 52 years (SD:24). Underlying diseases were renal
121 transplantation (n=3); multiple trauma (n=2); intestinal obstruction (n=2);
122 mesenteric thrombosis, liver transplantation, bone marrow aplasia, Crohn's
123 disease, papillary tumor, central nervous system arteriovenous malformation (1
124 each). Comorbidities were: hypertension (n=7); diabetes mellitus (n=7);
125 dyslipidemia (n=2); osteoarthritis (n=1); and Chagas' disease (n=1). Seven
126 (54%) patients were immunosuppressed; 8(62%) had undergone surgery within
127 30 days. Mean APACHE II on admission and on 1st day of treatment was
128 16(SD:7) and 16(SD:9), respectively. All patients had used antimicrobials
129 previously: twelve (92%) a carbapenem; 7(54%) colistin/polymyxin B; 6(46%)
130 had received both. Four of 13 (31%) had had a previous infection; 9 (69%) were
131 admitted to intensive care.

132 The mean number hospital-days before isolation of the microorganism was 43
133 (SD:49). Infections were: central line-associated bloodstream infection (n=6);
134 bacteremic abdominal infection (n=3); bacteremic ventilator-associated
135 pneumonia (n=1); ventilator-associated pneumonia (n=1); bacteremic urinary
136 infection (n=1); and surgical site infection (n=1). Microorganisms were isolated
137 from the blood (n=11), tissue (n=1); and tracheal aspirate (n=1) and were: *K.*
138 *pneumoniae* (9); *S. marcescens* (3); and *P. aeruginosa* (1). Resistance to
139 carbapenems and colistin was confirmed by broth microdilution: (MIC>4 mg/L
140 for meropenem and colistin). Fosfomycin MIC50 and MIC90 were, respectively,
141 512 and 1024 mg/L. The most frequent carbapenemase was KPC, isolates had

142 6 to 10 polymorphisms in genes related to polymyxin resistance and most
143 (91%) had *fosA* gene. (Table 1).

144 Three patients (23%) failed treatment, 2(15%) had an indeterminate response,
145 and 8(62%) were cured. Fourteen and 28-day mortality was 39% and 54%,
146 respectively.

147 Meropenem was the most common antimicrobial used in combination with
148 fosfomicin (10), followed by amikacin (3), tigecycline (2), colistin (2); and
149 ertapenem (1). Seven of 10 (70%) patients who received meropenem were
150 cured but only 1 of 3 who did not receive meropenem (33%), although APACHE
151 II scores were similar (15.7 ± 0.6 vs 16.5 ± 7.9 ; $p = 0.85$; and 15.3 ± 3.8 vs
152 15.6 ± 9.6 ; $p = 0.96$, respectively).

153 Sinergism between fosfomicin and meropenem occurred in all 8 isolates tested
154 by checkerboard. Time-kill assay showed synergism for the combination in 9 of
155 11 tested (82%) (Table 1).

156 *K. pneumoniae* were polyclonal, with 3 different pulsed-field types and three
157 different STs (Figure 1). *P. aeruginosa* belonged to ST245, not previously
158 described in Brazil (Table 1).

159 Eight (62%) patients had adverse: hypocalcemia (8), nausea (3), vomiting (2),
160 diarrhea (2), and hypertension (2, both had had prior episodes). Therapy was
161 not discontinued due to adverse events.

162

163 DISCUSSION

164 Polymyxin-resistant infections have increased, and alternative treatments are
165 valuable.^{1,2} *In vitro* studies demonstrated fosfomicin activity,³ which inspired us
166 to study this drug in serious multidrug-resistant infections.

167 Fosfomicin has already been used in critical patients, but more frequently in
168 urinary infections.³ Efficacy and safety studies using IV fosfomicin in critical
169 patients are needed. Thirteen patients were included in a compassionate
170 protocol and 8 (62%) were cured of infection. Despite being a small case-series,
171 we believe that this result was surprising given the severity of the patients'
172 conditions. Many patient characteristics suggested poor prognosis: most were
173 ≥ 60 y-o; had comorbidities; most had bacteremic infections; severity scores
174 were high; and 7 were immunosuppressed. Our high mortality reflects this.

175 Fosfomicin MICs were high, which might have limited the success of
176 monotherapy. There are only fosfomicin CLSI breakpoints for *E. coli* and *E.*
177 *faecalis*, and extrapolating these to other microorganisms, 9(82%) isolates
178 would be classified as resistant. Using EUCAST cutoffs,¹⁵ 10/13 were resistant.
179 High MICs may be explained by the *fosA* gene present in 8 of 9 isolates
180 sequenced.

181 Meropenem MICs were also high. Most isolates carried KPC-2, which was
182 expected due to the high frequency of KPC-2 in Brazil. However,
183 carbapenemase NDM-1 was found together with KPC-2 in one *S. marcescens*.

184 When combined, synergism between fosfomicin and meropenem occurred in
185 most isolates. Some studies show synergism between meropenem and other
186 antimicrobials, mostly colistin.² Reports on the combination of meropenem and
187 fosfomicin are scarce.¹⁶

188 Combination treatment of multi-resistant Gram-negative bacteria is
189 controversial. Some studies show benefit,¹⁷ others not.¹⁸ As fosfomicin and
190 meropenem act at distinct stages of cellular wall synthesis, we believe that the
191 combination may overcome the expression of independent resistance
192 mechanisms and lead to rupture of the cell wall and bacterial death, as
193 previously suggested.¹⁶

194 In general, fosfomicin is considered safe.³ Episodic adverse events have been
195 described with IV fosfomicin in low-dose retrospective studies, mostly
196 gastrointestinal.⁹ Serious events are rare, including leukopenia and
197 neutropenia.¹⁹ The high doses used in our study led to frequent adverse events,
198 none severe.

199 Reports of treatment with intravenous fosfomicin are scarce. A retrospective
200 study evaluated the efficacy of doripenem+fosfomicin *versus*
201 colistin+fosfomicin in *P. aeruginosa* pneumonia: both were effective.²⁰ A study
202 compared colistin with colistin+fosfomicin against carbapenem-resistant *A.*
203 *baumannii*, but did not have power for conclusions.⁷ There is a heterogeneous
204 report of fosfomicin in combination with several antimicrobials treating 116
205 patients with various infections.⁶ Another study described 18 patients with
206 primary bacteremia receiving fosfomicin, with clinical success in 11.⁸

207 The main limitation of our study is the small number of cases. However,
208 fosfomicin was used in bacteria with different resistance mechanisms, species
209 and clones, suggesting that it may be widely useful.

210 In conclusion, fosfomicin may be effective against infections caused by multi-
211 resistant Gram-negative microorganisms with different antimicrobial resistance

212 mechanisms, and there seems to be synergism with meropenem. Fosfomycin
213 seems to be safe even in high doses.

214 **ACKNOWLEDGEMENTS**

215 None.

216 **FUNDING**

217 The 4g-bottles of Fosfocina® (ERN Laboratory, Barcelona, Spain) used in this
218 study were obtained by donation from OPEN Representação Importadora e
219 Exportadora Ltda.

220 **TRANSPARENCY DECLARATIONS.**

221 The authors do not have a commercial or other association that might pose a
222 conflict of interest.

223

224 **REFERENCES**

- 225 1. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant
226 Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a Global menace. *J Infect Dis*
227 2017; **215** Suppl 1: S28-S36.
- 228 2. Zusman O, Altunin S, Koppel F *et al.* Polymyxin monotherapy or in
229 combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and
230 meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2016; **72**: 29-39.
- 231 3. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G *et al.* Fosfomycin. *Clin*
232 *Microbiol Rev* 2016; **29**: 321-47.
- 233 4. Walsh CC, Landersdorfer CB, Mcintosh MP *et al.* Clinically relevant
234 concentrations of fosfomycin combined with polymyxin B, tobramycin or
235 ciprofloxacin enhance bacterial killing of *Pseudomonas aeruginosa*, but do not
236 suppress the emergence of fosfomycin resistance. *J Antimicrob Chemother*
237 2016; **71**: 2218-29.
- 238 5. Michalopoulos A, Vitzili S, Rafailidis P *et al.* Intravenous fosfomycin for
239 the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant
240 *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin*
241 *Microbiol Infect* 2010; **16**: 184-6.
- 242 6. Dinh A, Salomon J, Bru JP *et al.* Fosfomycin: efficacy against infections
243 caused by multidrug-resistant bacteria. *Scand J Infect Dis* 2012; **44**: 182-9.
- 244 7. Sirijatuphat R, Thamlikitkul V. Preliminary study of colistin versus colistin
245 plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*
246 infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5598-601.

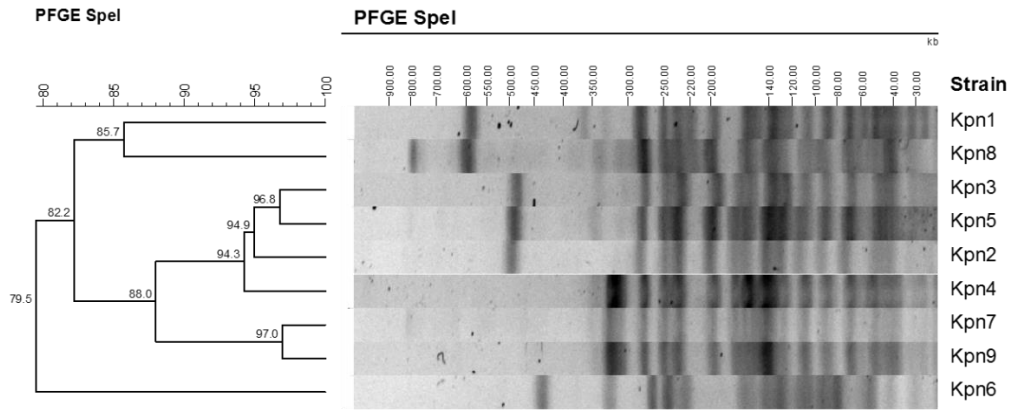
- 247 8. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S *et al.* Outcomes of critically ill intensive
248 care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant
249 and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative
250 bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **43**: 52-9.
- 251 9. Florent A, Chichmanian RM, Cua E *et al.* Adverse events associated with
252 intravenous fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 82-92.
- 253 10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for*
254 *Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S22.* CLSI, Wayne, PA,
255 USA, 2012.
- 256 11. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH *et al.* In vitro antibacterial activities
257 of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by
258 chequerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother* 2006;
259 **57**:573–576.
- 260 12. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E *et al.* Clonal spread of KPC-2
261 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J*
262 *Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 348-52.
- 263 13. Tada T, Tsuchiya M, Shimada K *et al.* Dissemination of Carbapenem-
264 resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of
265 Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA
266 Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC Infect Dis* 2017; **17**: 467.
- 267 14. Liu YY, Wang Y, Walsh TR *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin
268 resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a
269 microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 161-
270 8.

- 271 15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoints*
272 *tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0.* EUCAST,
273 Växjö, Sweden, 2012.
- 274 16. Kunakonvichaya B, Thirapanmethee K, Khuntayaporn P *et al.* Synergistic
275 effects of fosfomicin and carbapenems against carbapenem-resistant
276 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **45**:
277 556-7.
- 278 17. Tumbarello M, Treccarichi EM, De Rosa FG *et al.* Infections caused by
279 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a
280 multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2133-43.
- 281 18. de Oliveira MS, de Assis DB, Freire MP *et al.* Treatment of KPC-
282 producing Enterobacteriaceae: suboptimal efficacy of polymyxins. *Clin Microbiol*
283 *Infect* 2015; **21**: 179.e1-7.
- 284 19. Grabein B, Graninger W, Rodríguez Baño J *et al.* Intravenous
285 fosfomicin-back to the future. Systematic review and meta-analysis of the
286 clinical literature. *Clin Microbiol Infect* 2017; **23**: 363-372.
- 287 20. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas*
288 *aeruginosa* pneumonia with intermediate minimum inhibitory concentrations to
289 doripenem: combination therapy with high-dose, 4-h infusion of doripenem plus
290 fosfomicin versus intravenous colistin plus fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents*
291 2012; **39**: 271-2.

292 Table 1. Microbiological characteristics of 13 isolates from infections treated with intravenous fosfomycin.

Patient	Microorganism (Specimen)	ST (PFGE pattern)	Betalactam resistance genes	Meropenem MIC Alone/In combination (mg/L)	Number of possible colistin resistance polymorphisms	Colistin MIC (mg/L)	Fosfomycin resistance genes	Fosfomycin MIC Alone/In combination (mg/L)	Treatment	Fosfomycin and Meropenem (Checkerboard)	Fosfomycin and Meropenem (Time-kill)
1	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	340 (A)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M15, <i>bla</i> KPC-2	> 128/16	9	32	<i>fosA</i>	1024/64	FOS + MERO	SYN	SYN
2	<i>S. marcescens</i> (Blood)	-	<i>bla</i> SHV-129, <i>bla</i> KPC-2, <i>bla</i> NDM-1	> 8/ND	-	>512	Absent	8/ND	FOS + TIGE + COL	ND	IND
3	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	11 (B)	<i>bla</i> TEM-1A, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M2, <i>bla</i> CTX-M8, <i>bla</i> OXA-2, <i>bla</i> KPC-2	128/16	9	32	<i>fosA</i>	1024/64	FOS + MERO	SYN	SYN
4	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	11 (B)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M2, <i>bla</i> OXA-2, <i>bla</i> KPC-2	64/8	9	>512	<i>fosA</i>	256/16	FOS + MERO	SYN	SYN
5	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	258 (B)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M14, <i>bla</i> KPC-2	> 8/ND	7	32	<i>fosA</i>	256/ND	FOS + AMI	ND	SYN
6	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	340 (B)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M15, <i>bla</i> KPC-2	> 8/ND	8	64	<i>fosA</i>	512/ND	FOS + AMI	ND	IND
7	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	11 (B)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M2, <i>bla</i> OXA-2, <i>bla</i> KPC-2	64/8	8	128	<i>fosA</i>	1024/64	FOS + MERO	SYN	SYN
8	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	340 (C)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> CTX-M15, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> KPC-2	64/8	8	32	<i>fosA</i>	256/16	FOS + MERO	SYN	SYN
9	<i>P. aeruginosa</i> (Blood)	245 (NA)	<i>bla</i> PAO, <i>bla</i> OXA-50, <i>bla</i> OXA-129	8/1	10	128	<i>fosA</i>	64/4	FOS + MERO	SYN	SYN
10	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	258 (B)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M14, <i>bla</i> KPC-2	> 128/16	6	64	<i>fosA</i>	1024/64	FOS + AMI + MERO	SYN	SYN
11	<i>K. pneumoniae</i> (Blood)	258 (B)	<i>bla</i> TEM-1B, <i>bla</i> SHV-11, <i>bla</i> CTX-M14, <i>bla</i> KPC-2	128/16	7	32	<i>fosA</i>	>1024/64	FOS + MERO + ERTA + TIGE + COL	SYN	SYN
12	<i>S. marcescens</i> (Renal tissue)	-	-	ND/ND	-	-	-	ND/ND	FOS + MERO	ND	ND
13	<i>S. marcescens</i> (Tracheal aspirate)	-	-	ND/ND	-	-	-	ND/ND	FOS + MERO	ND	ND

293 PFGE – pulsed field gel electrophoresis; ST – sequence type; MIC – minimal inhibitory concentration; FICI – fractional inhibitory concentration index; ND
 294 – not done; Fos – Fosfomycin, Mero – Meropenem, Ami – Amikacin, Erta – Ertapenem, Tige – Tigecycline, Col – Colistin; SYN – Synergism; IND –
 295 indifference.



296

297

Figure 1: Clonal profiles based on pulsed-field gel electrophoresis of *K. pneumoniae* isolates

298

resistant to carbapenems and colistin from infections treated with fosfomicin.

Pontos importantes

Treze pacientes receberam fosfomicina para o tratamento de infecções por microorganismos panresistentes, e terapia não foi interrompida devido a qualquer evento adverso. Oito (62%) eram do sexo masculino. A idade média foi de 52 anos (DP = 24). Oito (62%) pacientes foram submetidos a cirurgia dentro de 30 dias antes do diagnóstico de infecção; sete (54%) eram imunossuprimidos. Todos os pacientes fizeram uso de antimicrobiano previamente: doze (92%) receberam carbapenêmico e sete (54%) receberam colistina ou polimixina B; seis (46%) receberam as duas classes antes do diagnóstico. Entre os treze pacientes, quatro (31%) tiveram outra infecção prévia (Tabela 1).

Os diagnósticos foram: infecção primária da corrente sanguínea associada a cateter venoso central (IPCS-CVC) (n=6; 46%), infecção de corrente sanguínea secundária a infecção intra-abdominal (n=3; 23%), infecção de corrente sanguínea secundária a pneumonia associada a ventilação mecânica (n=1; 8%), pneumonia associada à ventilação mecânica (n=1; 8%), infecção de corrente sanguínea secundária à infecção do trato urinário (n=1; 8%) e infecção de sítio cirúrgico (n=1; 8%). Os microorganismos foram isolados em sangue (n=11), tecido (n=1) e aspirado traqueal (n=1). Nove pacientes apresentaram infecções causadas por *K. pneumoniae*, três foram causadas por *S. marcescens* e uma por *P. aeruginosa* (Tabela 2).

Tabela 1: Características demográficas de 13 pacientes tratados com fosfomicina endovenosa de 2013 a 2016.

Características gerais	n = 13
Sexo feminino, n (%)	5 (38%)
Idade, média ± DP (anos)	52 ± 24
Doença de base, n (%)	
Transplante renal	3
Politraumatismo	2
Obstrução intestinal	2
Trombose mesentérica	1
Transplante hepático	1
Aplasia de medula	1
Doença de Crohn	1
Tumor papilífero	1
Malformação arteriovenosa de sistema nervoso central	1
Comorbidades	
Hipertensão	7
Diabetes mellitus	7
Dislipidemia	2
Osteoartrite	1
Doença de Chagas	1
APACHE II à admissão na unidade, média ± DP (pontos)	16 ± 7
APACHE II no 1º dia de tratamento, média ± DP (pontos)	16 ± 9
Admissão em UTI, n (%)	9 (69%)
Infecção relacionada à assistência à saúde prévia, n (%)	4 (31%)
Uso prévio de antimicrobianos, n (%)	
Meropenem	12 (92%)
Vancomicina	9 (69%)
Piperacilina/Tazobactam	7 (54%)
Amicacina	7 (54%)
Colistina	6 (46%)
Antifúngicos	6 (46%)
Ceftriaxona	5 (39%)
Tigeciclina	5 (39%)
Imipenem	1
Polimixina B	2
Dias de permanência hospitalar antes do isolamento do microorganismo pan-resistente, média ± DP	43 ± 49

DP: desvio padrão

Tabela 2. Características clínicas de 13 pacientes tratados com fosfomicina endovenosa de 2013 a 2016.

Paciente	Sexo	Idade (Anos)	Doença de base	Comorbidades	Infecção	Microrganismo	Apache II à admissão na unidade (pontos)	Apache II no 1º dia de fosfomicina (pontos)	Tratamento	Desfecho clínico	Óbito - 14 dias
1	F	57	Trombose mesentérica	HAS, DM, DLP	IPCS-CVC	<i>K. pneumoniae</i>	15	17	FOS + MERO	Cura	No
2	F	82	Politraumatismo	HAS, DM, DLP, osteoartrose	IPCS-CVC	<i>S. marcescens</i>	16	11	FOS + TIGE + COL	Falha	Yes
3	M	69	Obstrução intestinal	HAS, DM, Doença de Chagas	IPCS-CVC	<i>K. pneumoniae</i>	11	12	FOS + MERO	Cura	No
4	M	71	Renal transplantation	HAS, DM	ICS-Urossepse	<i>K. pneumoniae</i>	13	17	FOS + MERO	Cura	No
5	M	60	Obstrução intestinal	HAS, DM	ICS-IAbd	<i>K. pneumoniae</i>	16	17	FOS + AMI	Cura	No
6	F	24	Aplasia medular	-	IPCS-CVC	<i>K. pneumoniae</i>	15	18	FOS + AMI	Falha	Yes
7	F	36	Doença de Crohn	-	ICS-IAbd	<i>K. pneumoniae</i>	19	7	FOS + MERO	Cura	No
8	M	76	Tumor papilífero	-	IPCS-CVC	<i>K. pneumoniae</i>	8	14	FOS + MERO	Indeterminado	Yes
9	M	62	Transplante renal	HAS, DM	ICS-PAV	<i>P. aeruginosa</i>	28	37	FOS + MERO	Falha	Yes
10	M	19	Politraumatismo	-	IPCS-CVC	<i>K. pneumoniae</i>	24	5	FOS + MERO + AMI	Cura	No
11	M	20	Transplante hepático	-	ICS-IAbd	<i>K. pneumoniae</i>	15	8	FOS + MERO + ERTA + TIGE + COL	Indeterminado	Yes
12	M	75	Transplante renal	HAS, DM	ISC	<i>S. marcescens</i>	27	26	FOS + MERO	Cura	No
13	F	23	Malformação arteriovenosa de SNC	-	PAV	<i>S. marcescens</i>	5	13	FOS + MERO	Cura	No

F – feminino, M – masculino, SNC – sistema nervoso central, HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica, DM – diabetes mellitus, DLP – dislipidemia, ICS-CVC – infecção primária de corrente sanguínea associada a cateter venoso central, IAbd – infecção intraabdominal, PAV – pneumonia associada à ventilação mecânica, ISC – infecção de sítio cirúrgico, Fos – Fosfomicina, Mero – Meropenem, Ami – Amicacina, Erta – Ertapenem, Tige – Tigeciclina, Col – Colistina.

Apesar da alta CIM para ambos os fármacos, observou-se uma frequente diminuição significativa da CIM de meropenem na presença de fosfomicina e vice-versa (Figura 4). Os isolados de *K. pneumoniae* eram policlonais e de três diferentes ST.

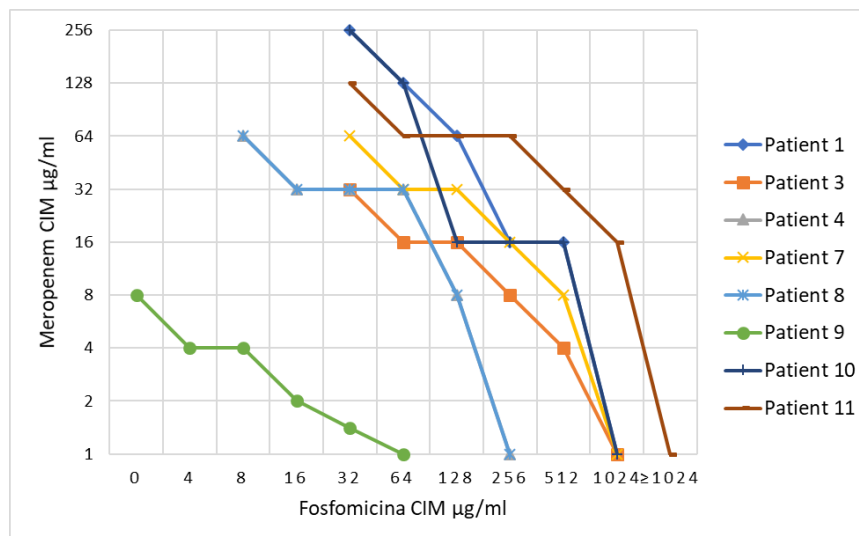
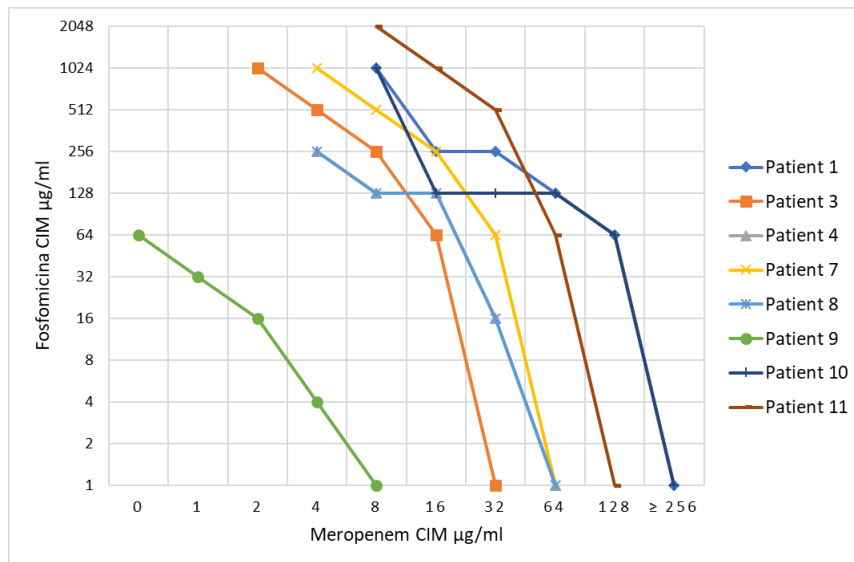


Figura 4. Sinergismo entre fosfomicina e meropenem em oito cepas de gram negativos panresistentes isolados de infecções tratadas com fosfomicina e meropenem combinados. CIM - concentração inibitória mínima.

5 DISCUSSÃO

Esse é um compilado de estudos, em sua essência, sobre multirresistência bacteriana, especialmente sobre microrganismos resistentes às polimixinas em alguns de seus aspectos: fenótipos, genótipos e opções de tratamento. Por meio dele, foi possível:

- questionar a transmissão interespecie e em ambiente hospitalar dos genes *mcr*, responsáveis pela transmissão horizontal de resistência às polimixinas;
- avaliar a sensibilidade de drogas alternativas a carbapenêmicos e polimixinas em microrganismos de genótipos distintos, com destaque para o desempenho da tigeciclina contra quase todos os isolados, mas também especificamente da minociclina e da doxiciclina em *A. baumannii*, da combinação ceftazidima/avibactam em *K. pneumoniae* e da fosfomicina em *S. marcescens*;
- concluir pela eficácia e segurança da fosfomicina em infecções por microrganismos multirresistentes, especialmente se combinada com carbapenêmicos.

A disseminação de bactérias gram-negativas resistentes a carbapenêmicos continua a evoluir rapidamente em todo o globo, apesar dos esforços em programas de prevenção e controle de infecção e programas de uso racional de antimicrobianos (BASSETTI, 2019; BASSETTI, 2017). A importância do tema “multirresistência em gram negativos” pode se confirmar pela Lista de Patógenos Prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os microrganismos pertencentes às espécies *A. baumannii* e *P. aeruginosa* e os pertencentes à ordem Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos são os primeiros na lista, com prioridade crítica (OMS, 2017). Entre Enterobacterales, *K. pneumoniae* é a espécie que mais se destaca por sua frequência de isolados multirresistentes (HAN, 2019). No entanto, isolados de *S. marcescens* têm sido cada vez mais descritos como patógenos nosocomiais oportunistas e com perfil fenotípico multirresistente (GAUDERETO, 2019).

Para essa tese, priorizamos tais microrganismos supracitados, por sua importância no HCFMSUP e em muitos serviços do Brasil. As infecções causadas por esses gram negativos multirresistentes são geralmente mais difíceis de serem tratadas, têm recidivas frequentes e apresentam maior

morbimortalidade do que as infecções causadas por microrganismos multissensíveis (CHRISTAKI, 2019). *K. pneumoniae*, por exemplo, é a Enterobacteriales produtora de carbapenemase mais frequente e uma das principais causas de IRAS, representa a ameaça à resistência aos antibióticos que mais cresce na Europa e é responsável por aumento dramático nas infecções em todo o mundo, com maior mortalidade em pacientes imunossuprimidos (CASSINI, 2019; POUCHA, 2017).

Não foi difícil achar microrganismos resistentes a carbapenêmicos. O fenômeno de aquisição de mecanismo de resistência às polimixinas tem piorado o cenário de resistência a carbapenêmicos. Não muito tempo desde a reintrodução da colistina na prática clínica na década de 2000, já foi relatado o surgimento de cepas resistentes às polimixinas, particularmente em isolados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, mas a incidência de isolados com tal perfil se manteve baixa por muito tempo (ANTONIADOU, 2007; MARCHAIM, 2011; KONTOPIDOU, 2011). No entanto, a pressão seletiva devido ao consumo excessivo ou à dosagem inadequada de polimixinas gerou cada vez mais isolados resistentes, o que foi confirmado pelo aparecimento simultâneo e multiclinal no mundo de isolados resistentes a essa classe de drogas (AH, 2014).

A resistência à colistina em *K. pneumoniae* tem sido relatada globalmente, incluindo regiões da Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia e África do Sul (AH, 2014). Há elevadas incidências de resistência às polimixinas descritas nas cepas de *K. pneumoniae* de vários países, como Itália (27,5% em 2011 e 43% em 2013-2014), Grécia (23% em 2011 e 20% em 2014), Coreia do Sul (6,8%) e Cingapura (6,3%) (AH, 2014; GIANI, 2013; MONACO, 2014; MALTEZOU, 2014; ECDC, 2014). Na Grécia foram estudadas ainda as linhagens desses isolados e foi concluído que geralmente pertencem à linhagem internacional ST258 (MAVROIDI, 2016), também descrito no nosso estudo. Na Itália, por sua vez, há forte predominância do clone ST512, enquanto apenas uma minoria pertencia ao clone ST101 (GIANI, 2013). O Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY de 2006-2009, que incluiu diferentes países da Europa, região Ásia-Pacífico, EUA e América Latina, indicou um baixo nível de resistência à colistina variando de 0,9% a 3,3%, com

a maior taxa de 30,6 % relatados na Coréia (GALES, 2011; KO, 2007).

Apesar de algumas densidades de infecções relacionadas à assistência à saúde estarem em decréscimo no HCFMUSP (como as relacionadas a infecção de corrente sanguínea associada a cateter), as taxas de resistência entre Gram negativos do hospital aumenta a cada ano. Em um trabalho feito na instituição, sete por cento (1159 isolados) de Enterobacteriaceae foram resistentes à colistina, enquanto 1,4% (102 isolados) de *Acinetobacter* spp. e 0,9% (85 isolados) de *Pseudomonas* spp. demonstraram resistência à colistina nos cinco anos avaliados. Entre os membros de Enterobacteriaceae, *K. pneumoniae* foi o mais frequente (84,1%). Pela análise temporal, houve uma tendência para um aumento da resistência à colistina entre Enterobacteriaceae (ROSSI, 2017). Essa incidência também foi percebida nesse estudo: mais frequentemente avaliamos e incluímos casos de infecções por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e polimixinas.

Pelo processo de seleção dos isolados para o estudo microbiológico e dos casos a serem incluídos no estudo clínico com Fosfomicina, deparamos com microrganismos de fenótipos pouco usuais para o HCFMUSP e para os hospitais brasileiros. Dentre eles, em duas situações o perfil de resistência a polimixinas teve destaque e, portanto, receberam maior atenção.

O isolado de *P. aeruginosa* resistente às polimixinas

Foi isolado durante o estudo um isolado de *P. aeruginosa* resistente às polimixinas, um perfil raro no país. Fizemos a hipótese de que este seria um isolado distinto das cepas já identificadas no HCFMUSP e no Brasil, o que se confirmou.

No Brasil, *P. aeruginosa* ST 277 é o ST mais descrito (DE OLIVEIRA SANTOS, 2019; GALETTI, 2019). Entretanto, a cepa *P. aeruginosa* deste caso foi atribuída como ST 245, descrita pela primeira vez no Brasil, filogeneticamente distante do ST 277, ao diferir em 4 alelos; tal ST foi pouco descrito no mundo: o primeiro relato deste ST ocorreu em 2005 na Polônia (EMPEL, 2007). Desde então, foi relatado na Coréia (CHO, 2014; LEE, 2013) e no Reino Unido (CHUNG, 2012). Não há o relato de eles terem perfil de resistência às polimixinas.

Esse achado é algo intrigante, já que o raro fenótipo de resistência às

polimixinas no Brasil coincidiu com um ST ainda não descrito no país. Existe uma associação da resistência a essa classe de drogas com essa linhagem? Por ora não há evidências para essa conclusão, e estudos futuros talvez tragam essa resposta.

Embora a incidência atual de resistência à polimixina em *P. aeruginosa* seja relativamente baixa, o uso subótimo e a frequente prescrição dessa classe de antimicrobianos levaram a um aumento notável nos isolados clínicos resistentes (HAN, 2018). Em nível genético, essa resistência às polimixinas em *P. aeruginosa* geralmente resulta de mutações nos sistemas reguladores de dois componentes PhoPQ, PmrAB e/ou ParRS (JOCHUMSEN, 2016). Mutações específicas nesses TCRs desencadeiam a expressão do operon *arnBCADTEF-pmrE*, que codifica enzimas responsáveis pela ligação covalente de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ao lipídeo A, tornando a carga da superfície bacteriana mais próxima da neutralidade, o que leva à resistência às polimixinas (OLAITAN, 2014). E conforme apresentado nos resultados, nesse isolado do estudo, foram percebidas mutações em alguns desses sistemas (ORSI, 2019).

Os isolados de enterobactérias portadores do gene *mcr-1*

Outra situação envolvendo resistência às polimixinas teve destaque: os isolados de *E. coli* e de *K. pneumoniae* portadoras do gene *mcr-1*. Essa investigação aconteceu por consequência das atenções voltadas para esse perfil à época.

Em 2016, Liu et al. descreveram na China a transmissão horizontal de resistência às polimixinas. Até então, a resistência à polimixina envolvia mutações cromossômicas, mas nunca havia sido relatada por transferência horizontal de genes. Durante um projeto de vigilância de rotina sobre resistência antimicrobiana em *E. coli* comensal de animais na China, foi observado um grande aumento da resistência à colistina, e uma cepa isolada em uma fazenda de porcos teve sua resistência transferida para outra cepa em laboratório. Então, os autores descrevem pela primeira vez um mecanismo de resistência à polimixina mediado por plasmídeo, e o gene foi denominado *mcr-1* (de “*mobile colistin resistance*”). O gene *mcr-1* foi então investigado e descrito como capaz de codificar uma fosfoetanolamina-transferase, resultando na

adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A, o que altera a carga da superfície bacteriana (LIU, 2016).

Quase todos os isolados portadores de *mcr-1* descritos imediatamente após o trabalho supracitado se mostraram sensíveis a carbapenêmicos e resistentes às polimixinas, um perfil exótico para as Enterobacteriales. Ficamos então atentos a esse perfil de sensibilidade em gram negativos isolados no HCFMUSP. Pelo processo de vigilância, aconteceu então a detecção de isolado suspeito.

O gene *mcr-1* já havia sido identificado no Brasil (FERNANDES, 2016), mas a co-colonização ainda não tinha sido relatada no país. Nosso estudo apresenta um relato de caso de uma mulher colonizada simultaneamente por *E. coli* ST744, portadora de *mcr-1*, um ST diferente do descrito anteriormente no Brasil, e um *K. pneumoniae* ST101 pela primeira vez, sugerindo a possível transmissão interespécies do gene *in vivo*. O ST744 de *E. coli* já havia sido isolada de humanos, animais de estimação e animais selvagens, mas raramente como carreadores de genes *mcr* (LONCARIC, 2016). *K. pneumoniae* ST101 às vezes tem sido descrito como multirresistente (AVGOULEA, 2018), mas ainda não portando *mcr-1*. Em geral, *K. pneumoniae* é um raro portador de *mcr-1* e, até onde sabemos, as descrições de co-colonização por *mcr-1* são escassas (GU, 2016), e esta é a primeira na América Latina. A descoberta do gene *mcr-1* em *K. pneumoniae* é particularmente importante porque é frequentemente resistente a múltiplas drogas (BASSETTI, 2018).

O plasmídeo envolvido no caso descrito, denominado pTMS4-1, é um plasmídeo com 33.304 pares de bases e apresenta alta identidade de nucleotídeos (99%) com pICBEC72Hmcr, um plasmídeo portador de *mcr-1* de uma cepa de *E. coli* isolada no Brasil (FERNANDES, 2016).

O estudo do plasmídeo (seu sequenciamento e sua conjugação) foi extremamente difícil tecnicamente. É importante relatar que, no final, foi bem engrandecedor para a equipe ter tido tal êxito em descrevê-lo, mas até lá, chegamos próximo à desistência. Mesmo contando com ajuda de outras instituições (como a *London School of Hygiene and Tropical Medicine*), os experimentos sob protocolos diversos não obtinham sucesso: o primeiro sequenciamento de plasmídeo fora contaminado com DNA cromossômico, o

sequenciamento de genoma completo dos isolados não evidenciava plasmídeos e a conjugação não acontecia. A literatura pouco traz sobre a dificuldade nos estudos com esses elementos genéticos móveis e a necessidade indispensável de resiliência para a busca das respostas envolvendo plasmídeos, o que nos deixava mais certos da nossa incapacidade de conjugar, sequenciar e descrevê-los. Dividimos tais desafios com outros serviços de outras Universidades, e todos relataram passar pelas mesmas dificuldades, o que nos motivou enfim a chegar ao desfecho dessa investigação.

À época em que estudamos o caso, pouco se sabia sobre as consequências a médio e longo prazo da circulação desse gene. A interpretação dos pontos de corte para colistina fornecidos pelo CLSI para *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. são: isolado sensível se CIM ≤ 2 mg/L e resistente se ≥ 4 mg/L (CLSI, 2019). Para o EUCAST, devem ser classificados os isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacteriaceae* como sensíveis se CIM ≤ 2 mg/L e resistente se > 2 mg/L (EUCAST, 2019). O gene *mcr-1* e seus derivados geram resistência com CIM próximos a estes pontos de corte (SUN, 2018). Então, o primeiro ponto de debate sobre esse tema é que, apesar de menores do que CIM geradas por mecanismos de mutação cromossômica, as CIM baixas para as polimixinas geradas pela presença do gene *mcr-1* já seriam teoricamente suficientes para diminuir o sucesso de tratamento.

É recomendado para colistina (e possivelmente para polimixina B) que a área sob a curva de concentração-tempo no plasma durante 24 horas no estado estacionário (AUC) seja de de cerca de 50 mg•hora/L, o que equivale a uma concentração plasmática média alvo de cerca de 2 mg/L, exatamente a concentração utilizada para classificar os isolados em sensíveis ou resistentes, o que não oferece uma ampla margem de segurança terapêutica. Embora essa meta seja abaixo do ideal para infecções do trato respiratório inferior, deve ser considerada como a exposição máxima tolerável. A grande limitação para essa meta terapêutica é que concentrações superiores a esta demonstraram aumentar de forma inaceitável a incidência e a gravidade da insuficiência renal (TSUJI, 2019).

Algumas outras variantes genéticas de *mcr-1* (*mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4* ... *mcr-1.12*) foram detectadas em diferentes países (DI PILATO, 2016; YANG, 2017), o que sugere a possibilidade de evolução contínua do *mcr-1* sob alguma pressão seletiva desconhecida no ambiente, animais e seres humanos. Até o momento, o gene *mcr-1* foi descrito em várias espécies de Enterobacteriales, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Shigella sonnei*, *Kluyvera* spp., *Citrobacter* spp. e *Raoultella ornithinolytica* (SUN, 2018). Xavier et al. identificaram ainda o *mcr-2* e, posteriormente, mais três genes do tipo foram descobertos em *E. coli* e *Salmonella* (*mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*) (XAVIER, 2016; YIN, 2017; , CARATTOLI, 2017; BOROWIAK, 2017). Diante dessa explosão de descobertas envolvendo genes *mcr*, houve muita expectativa e muitas especulações sobre o papel de genes de transferência horizontal de resistência às polimixinas se disseminando.

Tal preocupação se tornou ainda maior diante de outros exemplos catastróficos prévios de genes codificadores de mecanismos de resistência carregados por elementos genéticos móveis que se disseminaram e tornaram a multirresistência perfil tão comum, como, por exemplo, os genes codificadores de betalactamases de espectro estendido, os genes codificadores de carbapenemases (especialmente os genes *bla_{KPC}*, que tiveram sua disseminação com velocidade alarmante e com impacto gigantesco sobre os tratamentos de infecções hospitalares por gram negativos) e o gene *vanA*, que tornou o fenótipo de resistência à vancomicina em *E. faecium* tão comum.

No entanto, na minha opinião, alguns anos se passaram desde a descoberta do gene *mcr-1*, e, aparentemente, sua existência não se tem configurado como o apocalipse das polimixinas. Acredito que o gene pouco mudou a história do cenário no qual mais se necessita de polimixinas: as infecções relacionadas à saúde. A identificação de cepas carreadoras de genes *mcr* em coleções antigas de microrganismos, a rara descrição destes em isolados hospitalares (nas cepas do HCFMUSP resistentes às polimixinas e carbapenêmicos, por exemplo, os genes *mcr* ainda não foram encontrados nos genomas) e as elevadas CIM descritas nos gram negativos resistentes a essa classe de drogas reforça que o problema de resistência às polimixinas é

centrado em mutações cromossômicas em bactérias sob pressão seletiva artificial constante em ambiente hospitalar.

Neste estudo, avaliamos ainda a sensibilidade de microrganismos multirresistentes pertencentes a diferentes genótipos, com diferentes mecanismos de resistência, contra drogas alternativas aos carbapenêmicos e polimixinas. Os focos foram medicamentos antigos, não betalactâmicos, e a combinação ceftazidima/avibactam, todos com experiência limitada em microrganismos multirresistentes, principalmente em panresistentes. Foram destacados nesse trabalho os desempenhos de tigeciclina em todas as espécies (exceto *P. aeruginosa*), minociclina e doxiciclina em *A. baumannii*, ceftazidima/avibactam em *K. pneumoniae* e fosfomicina em *S. marcescens*.

Nossa hipótese inicial foi de que o padrão de resistência a múltiplas drogas presente nesses isolados pudesse ser uma questão de perspectiva, uma vez que o diagnóstico e o tratamento de infecções nosocomiais são usualmente centrados em betalactâmicos, especialmente carbapenêmicos, e nas polimixinas.

Os gram-negativos utilizados são geneticamente distintos e não representam microrganismos policlonais, pois foi utilizado apenas um isolado por paciente, provenientes de diferentes unidades de dois hospitais, pertencentes a diferentes linhagens, com diversos mecanismos de resistência e com perfis de difícil tratamento. Os isolados de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* pertencem a 10 e 4 tipos de ST distintos. Os isolados de *S. marcescens*, para os quais ainda não existem ST definidos, apresentaram variados perfis e mecanismos de resistência. O isolado de *P. aeruginosa* foi escolhido devido ao seu perfil de resistência à polimixina, um fenótipo raro no Brasil, devido à sua linhagem e ao seu perfil de virulência, conforme descrito anteriormente (ORSI, 2019).

Como a seleção inicial por microrganismos resistentes a carbapenêmicos e às polimixinas foi baseada no perfil de sensibilidade determinado por método automatizado (Vitek2, bioMérieux, Hazelwood, MO, EUA), submetemos os isolados à microdiluição em caldo para confirmar esses fenótipos. Isso confirmou o difícil perfil de tratamento dos isolados estudados.

Embora os genes de transmissão horizontal que codificam mecanismos de resistência às polimixinas sejam cada vez mais descritos (MELETIS, 2018), acreditamos que a pressão seletiva exercida pelo uso frequente de polimixinas permitiu o surgimento de mutações cromossômicas, com a conseqüente seleção de gram-negativos com esse fenótipo. Procuramos por genes *mcr* em todos os isolados e não encontramos nenhum deles, o que reafirma a hipótese de mutação cromossômica.

A tigeciclina foi o antimicrobiano mais ativo nos multirresistentes deste estudo. O papel da tigeciclina no tratamento de gram-negativos multirresistentes foi discutido, mas, infelizmente, esta droga apresenta certas desvantagens farmacocinéticas, o que tem limitado seu uso no tratamento de microrganismos resistentes a carbapenêmicos. Por outro lado, se os microrganismos multirresistentes estiverem envolvidos com infecções em sítios onde a tigeciclina tenha boa penetração, o sucesso do tratamento é possível (SHANKAR, 2017).

Em *A. baumannii*, as tetraciclinas minociclina e doxiciclina foram muito ativas em quase todos os isolados, apesar da presença frequente de bombas de efluxo em seus genomas. Foi demonstrado que a minociclina supera muitos mecanismos de resistência que afetam outras tetraciclinas em *A. baumannii*, incluindo a tigeciclina. Além disso, possui propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas mais favoráveis (LASHINSKY, 2017).

A atividade da combinação ceftazidima/avibactam em *K. pneumoniae* com tantos perfis distintos de beta-lactamase (ESBL, AmpC, serinocarbapenemases - KPC-2 e OXA e no isolado produtor da metalobetalactamase NDM-1, com CIM superior a 8 µg/mL para meropenem) foi relevante. Isso é reforçado pelos resultados de um estudo clínico brasileiro anterior, no qual foram descritos os resultados do tratamento com ceftazidima/avibactam para infecções por cepas de Enterobacterales (*K. pneumoniae* – n=28 – e *S. marcescens* – n=2) resistentes aos carbapenêmicos; todos os isolados eram produtores de KPC-2, eram suscetíveis a ceftazidima/avibactam (MIC90, 1 µg/mL), e o sucesso clínico foi alto (83%), mesmo nos casos com bacteremia (75%) (GUIMARÃES, 2019).

Nos isolados de *S. marcescens*, nos quais não foram encontrados

genes que codificam a resistência à fosfomicina, a fosfomicina foi muito ativa. Esse resultado é promissor, pois o potencial de panresistência nessa espécie é real e, a fosfomicina demonstrou ser ativa contra Enterobacteriales em geral (WILLIAMS, 2019).

A sensibilidade dos gram-negativos aos aminoglicosídeos variou de 22 a 42%. Os resultados mais relevantes foram a amicacina ter melhor desempenho em *K. pneumoniae* e gentamicina em *S. marcescens* e *A. baumannii*. A atividade de aminoglicosídeos em Enterobacteriales multirresistentes tem sido estudada, mas é limitada, pela raridade de estudos (SERIO, 2018).

A combinação sulfametoxazol/trimetoprim já foi considerada promissora em *A. baumannii* multirresistentes em um passado remoto. Falagas et al. revisaram a literatura até 2015 e, em estudos sobre *Acinetobacter* spp. multirresistentes, as taxas de resistência variaram de 5,9% a 100% (FALAGAS, 2015). Nosso estudo se identifica mais com o cenário pessimista, uma vez que a sensibilidade desse patógeno foi ocasional. Além disso, a correlação genotípico-fenotípica foi baixa: a maioria dos isolados sensíveis possuía um gene de resistência a essa combinação. Quinolonas e cloranfenicol apresentaram resultados catastróficos de sensibilidade, o que, em nossa opinião, os tira de qualquer cenário empírico com epidemiologia microbiana semelhante.

Antimicrobianos são medicamentos que mudaram a história da humanidade, capazes de diminuir a mortalidade em todo o mundo no último século (TRAVIS, 2018). No entanto, esses medicamentos estão perdendo drasticamente a eficácia, e a principal razão para isso é a crescente incidência de resistência bacteriana (DURAND, 2018), como descrito nessa série de microrganismos estudada. O preocupante é que muitas grandes empresas farmacêuticas abandonaram o mercado de antimicrobianos, porque o desenvolvimento de novos antibióticos é difícil e não é tão lucrativo quanto os medicamentos usados no tratamento de doenças crônicas (LI, 2017).

Esperávamos ver um padrão de resistência a múltiplas drogas (de acordo com os antimicrobianos usualmente testados pelos laboratórios de rotina) substituído por um padrão de sensibilidade frequente. Nossos

resultados não foram os esperados para a maioria das combinações, mas mostraram alguns pontos relevantes: resultados animadores de tigeciclina para todos os gram-negativos (exceto *P. aeruginosa*), minociclina para *A. baumannii*, ceftazidima/avibactam para *K. pneumoniae* e fosfomicina para *S. marcescens*.

Para finalizar essa pesquisa, apresentamos um estudo clínico sobre o uso da fosfomicina em cenário de infecções por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas. Concluímos que a fosfomicina tem valor para tratamento de tais infecções e se mostrou segura na dose utilizada.

Antes de começarmos o estudo clínico, testamos as espécies mais frequentemente multirresistentes no HCFMUSP contra a fosfomicina. Os microrganismos não tinham resistência às polimixinas (ainda eram raros à época dos testes), mas eram todos resistentes a carbapenêmicos. A fosfomicina apresentou excelente atividade contra esses bacilos gram-negativos multirresistentes ao carbapenem e, dessa forma, se mostrou uma alternativa de tratamento, especialmente para as enterobactérias, que apresentaram CIM menores do que em não fermentadores (PERDIGÃO-NETO, 2014). Em outro estudo, a maioria dos isolados de Enterobacteriaceae apresentou CIM ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$, semelhantes aos nossos resultados, mas as CIM de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram menores do que no estudo do HCFMUSP (LU, 2011).

Embora diante de CIM elevadas, não se pode concluir sem ensaios clínicos que a falha terapêutica é o resultado provável, já que as concentrações séricas de fosfomicina administrada por via endovenosa são elevadas. Nos estudos farmacocinéticos, as concentrações máximas variaram de $132,1 \pm 31,8$ mg/L a $350,2 \pm 124,69$ mg/L quando foram infundidos 20 a 100 mg / kg (peso corporal) de fosfomicina (GOTO, 1981; LASTRA, 1984; ROUSSOS, 2009; SCHINTLER, 2009). Além disso, não está bem estabelecido se a atividade da fosfomicina depende da concentração ou do tempo acima da CIM ou da área sob a curva (RUIZ RAMOS, 2019).

Apesar de a diluição em ágar ser considerada o padrão ouro para que seja testada a sensibilidade à fosfomicina, os pontos de corte para a interpretação do resultado não são bem estabelecidos. Como o principal

interesse no cenário da multirresistência é que a fosfomicina seja utilizada contra infecções sistêmicas (e com base nos níveis séricos previstos de fosfomicina), parece que os pontos utilizados pelo EUCAST são muito rigorosos (EUCAST, 2019), e provavelmente os pontos de corte do CLSI, definidos para infecções do trato urinário seriam aplicáveis a infecções sistêmicas (CLSI, 2019).

Quando iniciamos o estudo clínico de fosfomicina, acreditávamos que não haveria tanta diferença entre as CIM dos isolados exclusivamente resistentes a carbapenêmicos estudados previamente (PERDIGÃO-NETO, 2014), quando comparados aos isolados resistentes a carbapenêmicos e polimixinas, já que o gene mais frequentemente relacionado a resistência à fosfomicina (*fosA*) é transferido horizontalmente por plasmídeo ou, se cromossômico, não tem relação com a presença de mecanismos usuais de resistência às polimixinas (KLONTZ, 2017). No entanto, percebeu-se o aumento considerável da CIM para este antimicrobiano com essa mudança de fenótipo, e o principal benefício do seu uso provavelmente dependeu de sinergismo com meropenem.

A fosfomicina já foi usada em pacientes críticos, mas com maior frequência em infecções urinárias (FALAGAS, 2016). Em multirresistentes, a experiência é muito mais robusta em microrganismos produtores de ESBL (FRANSEN, 2017; ROSSO-FERNÁNDEZ, 2015). Nesse estudo, treze pacientes foram incluídos em um protocolo compassionado e oito (62%) ficaram curados da infecção. Apesar de ser uma pequena série de casos, acreditamos que esse resultado foi surpreendente, dada a gravidade das condições dos pacientes. Muitas características dos pacientes sugeriram mau prognóstico: a maioria tinha ≥ 60 anos, com comorbidades, com infecções bacterêmicas, com escores de gravidade e frequente imunossupressão. A alta mortalidade reflete esse cenário.

Esse limitado número de casos incluídos representa uma proporção minúscula dos pacientes candidatos ao estudo clínico. E isso representa a consequência de uma posição que adotamos antes do estudo: sermos criteriosos com a inclusão e com a exclusão, para que não deparássemos com muitos casos de desfecho indeterminado. As infecções por microrganismos

resistentes a carbapenêmicos e polimixinas por si só são marcadores de gravidade, e dois dos nossos critérios de exclusão eram alto risco de óbitos nas 48h seguintes (avaliado pelo médico assistente) e insuficiência renal grave, o que se tornaram os principais motivos para nossa série de caso ser pequena, mas com desfechos consistentes.

Existem apenas pontos de corte para a fosfomicina determinados pelo CLSI para *E. coli* e *E. faecalis* (CLSI, 2019), mas aplicando-os para outros microrganismos, 9 (82%) isolados seriam classificados como resistentes. Usando pontos de corte do EUCAST (EUCAST, 2019), 10/13 foram resistentes. CIM altas podem ser explicadas pelo gene *fosA* presente em 8 dos 9 isolados seqüenciados. Dessa forma, As CIM de fosfomicina foram altas (e mais altas do que as cepas exclusivamente resistentes a carbapenêmicos testadas previamente), o que poderia ter limitado o sucesso da monoterapia, se a fosfomicina tivesse sido assim prescrita. Mas isso não aconteceu, e a terapia combinada foi a regra.

As CIM do meropenem também foram altas. A maioria dos isolados continha KPC-2, o que era esperado devido à alta frequência de KPC-2 no Brasil. No entanto, a carbapenemase NDM-1 foi encontrada junto com KPC-2 em um isolado de *S. marcescens*, o que reforça a multirresistência desse isolado.

Quando combinados, fosfomicina e meropenem se mostraram sinérgicos na maioria dos isolados. Alguns estudos mostram o sinergismo entre o meropenem e vários outros antimicrobianos, mas principalmente com colistina (ZUSMAN, 2016). Relatos sobre a combinação de meropenem e fosfomicina são escassos (KUNAKONVICHAYA, 2015).

Nesse estudo, a elevada gravidade dos pacientes pode ser demonstradas pelos valores de APACHE II nos inícios dos tratamentos, e a consequência desse cenário pode ser demonstrada pela elevada mortalidade. A magnitude da relevância de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos pode ser corroborada também por dados que estimam que as infecções por elas resultam em 26% de mortalidade e custam aos hospitais dos Estados Unidos 275 milhões de dólares anualmente e com pior mortalidade do que os representantes sensíveis a essa classe de antimicrobianos (MCCANN, 2018;

MARTIN, 2018).

Dados epidemiológicos e clínicos confirmam a importância dessas espécies para a saúde pública, especialmente pelos seus desfechos desastrosos. Uma meta-análise demonstrou um risco duas vezes maior de mortalidade com *P. aeruginosa* multirresistente (NATHWANI, 2014). Outras meta-análises subsequentes confirmaram um excesso significativo de mortalidade em infecções de corrente sanguínea com *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, quando comparada a cepas sensíveis (ECDC, 2017; ZHANG, 2016). Em pacientes imunossuprimidos, essa maior mortalidade associada ao fenótipo e seu envolvimento em surtos também foram recentemente descritas (RIGHI, 2017; CHAVES, 2017). As infecções por *A. baumannii* são adquiridas principalmente na UTI, mas são cada vez mais observadas nas enfermarias gerais e em instituições de longa permanência (BRINK, 2019; MUÑOZ-PRICE, 2016). A colonização prévia por *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos e o uso de carbapenêmicos são fatores de risco importantes para infecções por esse microrganismo (BASSETTI, 2017; MUÑOZ-PRICE, 2016). Nos Estados Unidos, *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos responde por 47 e 64% dos isolados de infecções primária de corrente sanguínea e infecção do trato urinário associada a sonda vesical, respectivamente, como mortalidade elevada (EICHENBERGER, 2019; WEINER, 2016).

O tratamento combinado de bactérias gram-negativas multirresistentes é controverso. Alguns estudos mostram benefícios (TUMBARELLO, 2015), outros não (DE OLIVEIRA, 2015). Nesse estudo, nos pareceu benéfica a terapia combinada, principalmente de fosfomicina com meropenem. Como essas drogas atuam em estágios distintos da síntese da parede celular, acreditamos que a combinação possa superar a expressão de mecanismos independentes de resistência e levar à ruptura da parede celular e à morte bacteriana, como anteriormente sugerido (KUNAKONVICHAYA, 2015).

Em geral, a fosfomicina é considerada segura (FALAGAS, 2016). Eventos adversos episódicos, principalmente gastrointestinais, foram atribuídos a essa droga administrada por via intravenosa em estudos retrospectivos em baixas doses (FLORENT, 2011). Eventos graves são raros, incluindo

leucopenia e neutropenia (GRABEIN, 2017). As altas doses usadas em nosso estudo levaram a freqüentes eventos adversos, nenhum grave.

Relatos de tratamento com fosfomicina intravenosa são escassos. Um estudo retrospectivo avaliou a eficácia de doripenem com fosfomicina versus colistina com fosfomicina em pneumonia por *P. aeruginosa*: ambos foram eficazes (APISARNTHANARAK, 2012). Um estudo comparou colistina com colistina associada a fosfomicina contra *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos, mas não teve poder para conclusões (SIRIJATUPHAT, 2014). Há ainda um relato heterogêneo de fosfomicina em combinação com vários antimicrobianos para tratamento de 116 pacientes com várias infecções (DINH, 2012), e outro estudo, que descreveu 18 pacientes com bacteremia primária recebendo fosfomicina, com sucesso clínico em onze (PONTIKIS, 2014).

As principais limitações do nosso estudo são o pequeno número de casos e não termos testado sinergismo para outras combinações de drogas. No entanto, mesmo com essa pequena série de casos, tivemos algumas conclusões importantes. A fosfomicina foi utilizada e se mostrou ativa em bactérias com diferentes mecanismos de resistência, espécies e clones, sugerindo que ela pode ser amplamente útil, e que a combinação com o meropenem pode ser sinérgica.

Dessa forma, a fosfomicina pode ser eficaz contra infecções causadas por microorganismos Gram-negativos multirresistentes com diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, e parece haver sinergismo com o meropenem. A fosfomicina parece ser segura, mesmo em altas doses.

6 CONCLUSÕES

Diante dos pontos expostos acima, algumas conclusões foram importantes:

1. No primeiro estudo, foram encontrados isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* portadores de *mcr-1*, presente em um plasmídeo, com fenótipo compatível (sensibilidade a carbapenêmicos e resistências às polimixinas); tal resultado sugere a transmissão interespecies da resistência às polimixinas.
2. No segundo estudo, por meio da avaliação de sensibilidade de multirresistentes a alternativas terapêuticas a carbapenêmicos e polimixinas, concluiu-se pelas atividades frequentes de tigeciclina (96% de sensibilidade) de forma global; da minociclina e da doxiciclina em *A. baumannii*, da combinação ceftazidima/avibactam em *K. pneumoniae* e fosfomicina em *S. marcescens*.
3. No estudo clínico, pela avaliação de uma série de pacientes infectados por gram negativos, a fosfomicina se mostrou ser útil como opção terapêutica para microrganismos multirresistentes; se mostrou segura e eficaz, especialmente se combinada com o meropenem.

7 ANEXOS

Anexo A – Estudo sobre *mcr-1*: Aprovação CAPPesq



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Colonização simultânea por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* portadoras de *mcr-1* em paciente não exposta à colistina

Pesquisador: Anna Sara Shafferman Levin

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09092019.8.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.212.259

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Relato de Caso sobre bactérias resistentes em caso sem tratamento prévio predisponente.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de Relato de Caso sobre bactérias resistentes em caso sem tratamento prévio predisponente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos pois o caso já foi acompanhado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Relato está corretamente elaborado e pode representar uma contribuição significativa à literatura

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE não foi coletado porém tal é devidamente justificado

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.212.259

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1302570.pdf	07/03/2019 10:53:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Justificativa.docx	07/03/2019 10:53:35	Anna Sara Shafferman Levin	Aceito
Folha de Rosto	FR_ANNA_SARA_LEVIN_8760.pdf	07/03/2019 10:52:02	Anna Sara Shafferman Levin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mcr1.doc	21/02/2019 10:36:48	Anna Sara Shafferman Levin	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Março de 2019

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B – Estudo sobre uso da fosfomicina: Aprovação CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E DA SEGURANÇA DO USO DE FOSFOMICINA EM INFECÇÕES CAUSADAS POR MICRORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS RESISTENTES A B-LACTÂMICOS E COLISTINA

Pesquisador Responsável: Anna Sara S. Levin

Versão: 7

Pesquisador Executante: Lauro Vieira Perdigão Neto

CAAE: 04730912.0.0000.0068

Co-autores: Maura S. Oliveira

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: GRUPO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9536

Número do Parecer: 1.052.673

Data da Relatoria: 06/05/2015

Apresentação do Projeto: Os autores solicitam que outros hospitais sejam incluídos no estudo, devido à necessidade de extensão da pesquisa a outros centros. Hospitais a serem incluídos e respectivos Pesquisadores responsáveis: Hospital Universitário Walter Cantídio - Evelyne Santana Girão, Hospital Geral de Fortaleza - Christianne Fernandes Valente Takeda, Hospital Universitário Cajuru - Maria Esther Graf, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba - Felipe Tuon.

Objetivo da Pesquisa: Comunicar a inclusão de outros Centros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Sem modificações com relação a emenda apresentada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A solicitação deve ser aprovada pois a inclusão de outros Centros poderá contribuir para o melhor andamento da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 06 de Maio de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Anexo C – Estudo sobre uso da fosfomicina: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação da eficácia e da segurança do uso de fosfomicina em infecções causadas por microrganismos Gram-negativos resistentes a β -lactâmicos e colistina**

PESQUISADOR : ANNA SARA SHAFFERMAN LEVIN

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 47966

UNIDADE DO HCFMUSP: GRUPO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Gostaríamos que você participasse do estudo **“Avaliação da eficácia e da segurança do uso de fosfomicina em infecções causadas por microrganismos Gram-negativos resistentes a β -lactâmicos e colistina”**.

Esta pesquisa tem como objetivo principal avaliar a eficácia e a segurança do uso do antibiótico fosfomicina em infecções causadas por bactérias resistentes aos principais antibióticos.

Acreditamos que este trabalho é importante porque se for mostrado que as infecções causadas por estes micróbios podem ser tratadas com fosfomicina, este antibiótico será uma das principais drogas para tratamento de infecções hospitalares. Esta pesquisa acontecerá da seguinte forma:

1º) você tem diagnóstico de infecção e o resultado do laboratório mostra que a bactéria é resistente aos antibióticos normalmente utilizados para aquele quadro;

2º) na ausência de esquema de antibiótico comprovadamente eficaz, você ou seu responsável poderá decidir se você quer ou não receber a fosfomicina como tratamento para a infecção;

3º) em caso de não aceitar a proposta, você não vai sofrer qualquer modificação na sua assistência, e outras medidas de tratamento serão instituídas, escolhidas pela equipe médica assistente (ressaltamos que não há medidas de tratamento sabidamente eficazes para este tipo de infecção, mas outros antibióticos serão prescritos);

4º) em caso da decisão por receber a fosfomicina, você receberá 10 dias de tratamento com este antibiótico e terá acompanhamento diário de seu quadro clínico, de possíveis efeitos adversos relacionados à fosfomicina e de seus exames laboratoriais. Os efeitos colaterais raramente acontecem, e os mais frequentes são vermelhidão na pele, náuseas, vômitos, diarreia, dor ou inflamação na veia onde foi injetado o remédio, hipertensão, insuficiência cardíaca, diminuição da audição, toxicidade ao fígado ou ao rim, queda grave da pressão, alteração na quantidade das células do sangue e diminuição do potássio do sangue. Serão utilizados na pesquisa os exames solicitados periodicamente pela equipe médica assistente: hemograma, uréia, creatinina, proteína C reativa, transaminases, INR, CPK, lactato e gasometria, realizados a partir do sangue, e os exames de imagens (raios X, ultrassonografias,

tomografias, cintilografias e ressonâncias magnéticas). Poderão ser coletados seis tubos com 5mL de sangue cada serão colhidos de cateter central (máximo 30 ml de sangue) e serão enviados para avaliação da quantidade de fosfomicina. Esse sangue ficará estocado por tempo autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) em bio-repositório e só será utilizado em outras pesquisas caso você autorize.

Você autoriza o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu a autorizo o uso do material colhido para outras pesquisas e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

(....) NÃO. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

Você está internado(a) no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e portanto está sendo cuidado por equipes responsáveis, na enfermaria ou em Unidade de Terapia Intensiva. Se decidir aderir ao estudo, continuará recebendo dieta, cuidados de enfermagem, medicações prescritas, procedimentos médicos, invasivos ou não, e medidas de suporte de acordo com seus diagnósticos e evoluções, conforme decisões de seus cuidadores, independentemente das atividades da pesquisa. O único diferencial entre você, caso escolha por ingressar na pesquisa, e outro qualquer paciente será a administração de fosfomicina em vez de outro esquema antimicrobiano. Ficará claro no prontuário sua participação no estudo e a possibilidade de sair da pesquisa se solicitado por você, pelo seu responsável ou pelos médicos cuidadores.

Reforçamos que não haverá qualquer prejuízo para o paciente que não quiser entrar na pesquisa, bem como se quiser sair a qualquer momento do andamento desta. O risco do trabalho é relacionado à possível falta de eficácia da fosfomicina utilizada no contexto apresentado, e o possível benefício é a eficácia deste antibiótico frente a infecções causadas por bactérias resistentes aos outros antibióticos. Só haverá conclusão de que houve benefício com este tratamento após o final da pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Anna Sara Shafferman Levin, que pode ser encontrada na Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 6º andar – tel: 2661-7066. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre ética, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnnet.usp.br. Para notificações de eventos adversos, está disponível 24h/dia o número de celular (11) 98268-9295 (pesquisador Dr Lauro Perdigão).

Você tem garantido o seu direito de não participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação pela sua decisão. As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

Além dos resultados de exames realizados em material biológico coletado, também serão utilizados os exames de imagens (raios X, ultrassonografias, tomografias, cintilografias e ressonâncias magnéticas). Tais resultados, além dos isolados de cultura e dos resultados de exames microbiológicos poderão ser utilizados para pesquisas futuras, e apenas para isto. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

A sua participação na pesquisa não levará a despesas suas e não haverá pagamento para a sua participação. Não haverá indenização ou ressarcimento por conseqüências diretas ou indiretas da administração do fármaco. A decisão da tentativa de tratamento e ingresso na pesquisa é de responsabilidade dos pacientes ou seus responsáveis.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo “**Avaliação da eficácia e da segurança do uso de fosfomicina em infecções causadas por microrganismos Gram-negativos resistentes a β -lactâmicos e colistina**”

Eu discuti com a Dra. Anna Sara Shafferman Levin ou com o Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha* Data ____ / ____ / ____

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

8 REFERÊNCIAS

AH YM, KIM AJ, LEE JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* Int J Antimicrob Agents, 44 (2014), pp. 8-15

AMINOV RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front Microbiol. 2010 Dec 8;1:134.

ANTONIADOU A, KONTOPIDOU F, POULAKOU G, KORATZANIS E, GALANI I, PAPADOMICHELAKIS E, KOPTERIDES P, SOULI M, ARMAGANIDIS A, GIAMARELLOU H. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother, 59 (2007), pp. 786-790.

APISARNTHANARAK, A; MUNDY, LM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia with intermediate minimum inhibitory concentrations to doripenem: combination therapy with high-dose, 4-h infusion of doripenem plus fosfomicin versus intravenous colistin plus fosfomicin. International Journal of Antimicrobial Agents, Mar;39(3):271-2, 2012.

AVGOULEA K, DI PILATO V, ZARKOTOU O, et al. Characterization of extensively- or pandrug-resistant ST147 and ST101 OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bloodstream infections in ICU patients. Antimicrob Agents Chemother 2018.

BARTLETT JG, GILBERT DN, SPELLBERG B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. Clin Infect Dis. 2013;56(10):1445-50.

BASSETTI M, CARNELUTTI A, PEGHIN M. Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in Gram-negative bacterial infections. Expert Rev Anti Infect Ther 2017; 15:55–65.

BASSETTI M, GIACOBBE DR, VENA A, BRINK A. Challenges and research priorities to progress the impact of antimicrobial stewardship. Drugs Context 2019; 8:212600.

BASSETTI M, POULAKOU G, RUPPE E, et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. Intensive Care Med 2017; 43:1464–1475.

BASSETTI M, RIGHI E, CARNELUTTI A, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(10):749-761.

BOROWIAK, M. et al. (2017) Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72 (12), 3317–3324.

CANTÓN, R; LUMB, J. Emerging resistance in Gram-negative pathogens and implications for clinical practice. *Future Microbiology*, 6(1):19-22, 2011.

CARATTOLI, A. et al. (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22, e30589

CASSINI A, HÖGBERG LD, PLACHOURAS D, et al. Attributable deaths and disability adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modeling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; 19:56–66.

CAY, Y; CHAI, D; WANG, R; BAI, N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Therapy*, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2013. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2019. http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/aulas/ih19_dados_ih2018.pdf. (Acessado em 03 de Novembro de 2019).

CHAVES L, TOMICH LM, SALOMÃO M, LEITE GC, RAMOS J, MARTINS RR, RIZEK C, NEVES P, BATISTA MV, AMIGO U, GUIMARAES T, LEVIN AS, COSTA SF. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. *J Med Microbiol.* 2017 Dec;66(12):1722-1729.

CHO HH, KWON KC, KIM S, KOO SH. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Lab Med* 2014;34(4):286-292.

CHUNG JCS, BECQ J, FRASER L, SCHULZ-TRIEGLAFF O, BOND NJ, FOWERAKER J, et al. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. *J Bacteriol* 2012;194(18):4857-4866.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S28. Wayne, PA: CLSI, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S29. Wayne, PA: CLSI, 2019.

DE OLIVEIRA SANTOS IC, PEREIRA DE ANDRADE NF, DA CONCEIÇÃO NETO OC, DA COSTA BS, DE ANDRADE MARQUES E, ROCHA-DE-SOUZA CM, ASENSI MD, D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF AP. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol.* 2019; 73:411-415.

DELEO, FR; CHAMBERS, HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9):2464–2474, 2009.

DI PILATO, V. et al. (2016) MCR-1.2: a new MCR variant encoded by a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 512. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5612–5615.

DURAND GA, RAOULT D, DUBOURG G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Apr;53(4):371-382.

DURANTE-MANGONI, E; ZARRILLI, R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiology*, Apr;6(4):407-22, 2011.

EMPEL J, FILCZAK K, MRÓWKA A, HRYNIEWICZ W, LIVERMORE DM, GNIADKOWSKI M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* 2007;45(9):2829-2834.

EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES. Clinical breakpoints. In European Committee on antimicrobial susceptibility testing. Växjö: EUCAST; 2019. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, Sweden: ECDC; Available from:

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2018. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. ECDC: Surveill Rep. <https://doi.org/10.2900/230516>.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Rapid risk assessment: carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings – 8 December 2016. Stockholm: ECDC; 2016; <http://ecdc.europa.eu/publications-data/rapidrisk-assessment-carbapenem-resistant-acinetobacter-baumanniihealthcare>. (Acessado em 24 de Agosto de 2019).

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet) 2017. 2017. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>.

FALAGAS ME, VARDAKAS KZ, ROUSSOS NS. Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: A review of current microbiological and clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Sep;46(3):231-41.

FALAGAS, ME; GIANNOPOULOU, KP; KOKOLAKIS, GN; RAFAILIDIS, PI. Fosfomicin: Use Beyond Urinary Tract and Gastrointestinal Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 46:1069-77, 2008.

FALAGAS, ME; KANELLOPOULOU, MD; KARAGEORGOPOULOS, DE; DIMOPOULOS, G; RAFAILIDIS, PI; SKARMOUTSOU, ND; PAPAFRANGAS, EA. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant Gram negative bacteria to fosfomicin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(6):439-43, 2008.

FALAGAS, ME; MARAKI, S; KARAGEORGOPOULOS, DE; KASTORIS, AC; KAPASKELIS, A; SAMONIS, G. Antimicrobialsusceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomicin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(5):497-9, 2010.

FALAGAS, ME; RAFAILIDIS, PI; MATHAIOU, DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, 13:132-138, 2010.

FERNANDES MR, MCCULLOCH J, VIANELLO MA, et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying mcr-1 gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(10):6415-7.

FERNANDEZ-VALENCIA, JE; SABAN, T; CANEDO, T; OLAY, T. Fosfomycin in osteomyelitis. *Chemotherapy*, 22:121-34, 1976.

FLEMING-DUTRA KE, HERSH AL, SHAPIRO DJ, BARTOCES M, ENNS EA, FILE TM, et al. Prevalence of Inappropriate Antibiotic Prescriptions Among US Ambulatory Care Visits, 2010-2011. *JAMA*. 2016;315(17):1864-73.

FLORENT, A; CHICHMANIAN, RM; CUA, E; PULCINI, C. Adverse events associated with intravenous fosfomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37:82-92, 2011.

FRITSCHKE, TR; SADER, HS; TOLEMAN, MA; WALSH, TR; JONES RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clinical Infectious Diseases*, 41(4):276-8, 2005.

GALENS K, ORVIS J, DAUGHERTY S, CREASY HH, ANGIUOLI S, WHITE O, WORTMAN J, MAHURKAR A, GWINN GIGLIO M. The IGS standard operating procedure for automated prokaryotic annotation. *Stand. Genomic Sci*;4(2):244–251, 2011.

GALES AC, JONES RN, SADER HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother*, 66 (2011), pp. 2070-2074.

GALES, AC; JONES, RN; SADER, HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clinical Microbiology and Infection*, 12(4):315-321, 2006.

GALETTI R, ANDRADE LN, VARANI AM, DARINI ALC. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries a chromosomal pack of acquired resistance genes: An example of high-risk clone associated with 'intrinsic resistome'. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Mar;16:183-186.

GAMBOA, PM; ANTEPARA, I; JAUREGUI, I; URRUTIA, I; SANZ, ML. Two patients with anaphylactic shock due to fosfomicin. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 106(3):260-1, 2011.

GAUDERETO JJ, PERDIGÃO NETO LV, LEITE GC, RUEDAS MARTINS R, BOAS DO PRADO GV, ROSSI F, GUIMARÃES T, LEVIN AS, COSTA SF. Synergistic Effect of Ceftazidime-Avibactam with Meropenem against Panresistant, Carbapenemase-Harboring *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens* Investigated Using Time-Kill and Disk Approximation Assays. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Apr 25;63(5). pii: e02367-18.

GIANI T, PINI B, ARENA F, CONTE V, BRACCO S, MIGLIAVACCA R; AMCLICRE SURVEY PARTICIPANTS, PANTOSTI A, PAGANI L, LUZZARO F, ROSSOLINI GM. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill*, 18 (2013).

GÓMEZ, J; VÁZQUEZ, EG; GÓMEZ, JR. Significación clínica de las resistências bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). *Revista Española de Quimioterapia*,21(2):115-122, 2008.

GONZÁLEZ, J; ORERO, A. La penicilina llega a España: 10 de marzo de 1944, una fecha histórica. *Revista Española de Quimioterapia*, 20(4):446-450, 2007.

GOOSSENS H, FERRECH M, VANDER STICHELE R, ELSEVIERS M, GROUP EP. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*. 2005;365(9459):579-87.

GOTO M, SUGIYAMA M, NAKAJIMA S, YAMASHINA H. 1981. Fosfomicin kinetics after intravenous and oral administration to human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother*. 20:393–397.

GRACE D. Review of Evidence on Antimicrobial Resistance and Animal Agriculture in Developing Countries, Evidence on Demand. International Livestock Research Institute, 2015. Available from: <https://www.gov.uk/dfid-research-outputs/review-of-evidence-on-antimicrobial-resistance-and-animal-agriculture-in-developing-countries-201309>.

GU DX, HUANG YL, MA JH, et al. Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from an infant with diarrhea in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(8):5099-100.

GUIMARÃES T, NOUÉR SA, MARTINS RCR, PERDIGÃO NETO LV, MARTINS WMBS, NARCISO BARBOSA AC, FERREIRA ALP, COSTA SF, GALES AC. Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by Enterobacteriales Coresistant to Carbapenems and Polymyxins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Sep 23;63(10).

HAN H, ZHOU H, LI H, GAO Y, LU Z, HU K, XU B. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*; 10(7):2720-31, 2013.

HAN JH, LAPP Z, BUSHMAN F, LAUTENBACH E, GOLDSTEIN EJC, MATTEI L, HOFSTAEDTER CE, KIM D, NACHAMKIN I, GARRIGAN C, JAIN T, BILKER W, WOLFORD HM, SLAYTON RB, WISE J, TOLOMEO P, SNITKIN ES. Whole Genome Sequencing to Identify Drivers of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Transmission Within and Between Regional Long-Term Acute Care Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Aug 26. pii: AAC.01622-19.

HAN ML, ZHU Y, CREEK DJ, LIN YW, ANDERSON D, SHEN HH, TSUJI B, GUTU AD, MOSKOWITZ SM, VELKOV T, LI J. Alterations of Metabolic and Lipid Profiles in Polymyxin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 May 25;62(6).

<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf> (2014).

JOCHUMSEN N, MARVIG RL, DAMKIÆR S, JENSEN RL, PAULANDER W, MOLIN S, JELSBÆK L, FOLKESSON A. 2016. The evolution of antimicrobial peptide resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is shaped by strong epistatic interactions. *Nat Commun* 7:13002.

JOHNSON TJ, BIELAK EM, FORTINI D, et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* 2012;68(1):43-50.

KARAGEORGOPOULOS, DE; WANG, R; YU, W; FALAGAS, ME. Fosfomicin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 255-268, 2012.

KAYE KS, GALES AC, DUBOURG G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49 (2017) 542–548.

KLONTZ EH, TOMICH AD, GÜNTHER S, LEMKUL JA, DEREDGE D, SILVERSTEIN Z, SHAW JF, MCELHENY C, DOI Y, WINTRODE PL, MACKERELL AD JR, SLUIS-CREMER N, SUNDBERG EJ. Structure and Dynamics of FosA-Mediated Fosfomicin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Oct 24;61(11). pii: e01572-17. doi: 10.1128/AAC.01572-17. Print 2017 Nov.

KO KS, SUH JY, KWON KT, JUNG SI, PARK KH, KANG CI, ET AL. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother*, 60 (2007), pp. 1163-1167.

KONTOPIDOU F, PLACHOURAS D, PAPADOMICHELAKIS E, KOUKOS G, GALANI I, POULAKOU G, DIMOPOULOS G, ANTONIADOU A, ARMAGANIDIS A, GIAMARELLOU H. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*, 17 (2011), pp. E9-11

LANDERS TF, COHEN B, WITTUM TE, LARSON EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 2012;127(1):4-22.

LARSEN MV, COSENTINO S, RASMUSSEN S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*; 50:1355-61, 2012.

LARSEN MV, COSENTINO S, RASMUSSEN S, et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1355-1361.

LASHINSKY JN, HENIG O, POGUE JM, KAYE KS. Minocycline for the Treatment of Multidrug and Extensively Drug-Resistant *A. baumannii*: A Review. *Infect Dis Ther.* 2017 Jun;6(2):199-211.

LASTRA CF, MARIÑO EL, BARRUECO M, GERVÓS MS, GIL AD. 1984. Disposition of phosphomycin in patients with pleural effusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25:458–462. 10.1128/AAC.25.4.458

LEE JY, PECK KR, KO KS. Selective advantages of two major clones of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates (CC235 and CC641) from Korea: antimicrobial resistance, virulence and biofilm-forming activity. *J Med Microbiol* 2013;62:1015-1024.

LEVIN, AS; BARONE, AA; PENÇO, J; SANTOS, MV; MARINHO, IS; ARRUDA, EA; MANRIQUE, EI; COSTA SF. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*, 28(5):1008-11, 1999.

LI J. Reviving Polymyxins: Achievements, Lessons and the Road Ahead. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:1-8.

LI X, MU X, ZHANG P, ZHAO D, JI J, QUAN J, ZHU Y, YU Y. Detection and characterization of a clinical *Escherichia coli* ST3204 strain coproducing NDM-16 and MCR-1. *Infect Drug Resist.* 2018 Aug 15;11:1189-1195.

LIU H, FEI CN, ZHANG Y, LIU GW, LIU J, DONG J. Presence, distribution and molecular epidemiology of multi-drug-resistant Gram-negative bacilli from medical personnel of intensive care units in Tianjin, China, 2007-2015. *J Hosp Infect*; 96(2):101-110, 2017.

LIU YY, WANG Y, WALSH TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16(2):161-8.

LOBANOVSKA M, PILLA G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. 2017 Mar 29;90(1):135-145.

LONCARIC I, BEIGLBÖCK C, FEßLER AT, et al. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing and Fluoroquinolone-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Mouflons (*Ovis orientalis musimon*) in Austria and Germany. *PLoS One* 2016;11(5):e0155786.

LU CL, LIU CY, HUANG YT, LIAO CH, TENG LJ, TURNIDGE JD, HSUEH PR. 2011. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to Fosfomycin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55:4295–4301.

MALTEZOU HC, KONTOPIDOU F, DEDOUKOU X, KATERELOS P, GOURGOULIS GM, TSONOU P, et al. Action plan to combat infections due to carbapenem-resistant, Gram-negative pathogens in acute-care hospitals in Greece. *J Glob Antimicrob Resist*, 2 (2014), pp. 11-16.

MARCHAIM D, CHOPRA T, POGUE JM, PEREZ F, HUJER AM, RUDIN S, ENDIMIANI A, NAVON-VENEZIA S, HOTHY J, SLIM J, BLUNDEN C, SHANGO M, LEPHART PR, SALIMNIA H, REID D, MOSHOS J, HAFEEZ W, BHEEMREDDY S, CHEN TY, DHAR S, BONOMO RA, KAYE KS. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (2011), pp. 593-599

MARSHALL S, HUJER AM, ROJAS LJ, PAPP- WALLACE KM, HUMPHRIES RM, SPELLBERG B, HUJER KM, MARSHALL EK, RUDIN SD, PEREZ F, WILSON BM, WASSERMAN RB, CHIKOWSKI L, PATERSON DL, VILA AJ, VAN DUIN D, KREISWIRTH BN, CHAMBERS HF, FOWLER VG, JR, JACOBS MR, PULSE ME, WEISS WJ, BONOMO RA. 2017. Can ceftazidime-avibactam and aztreonam overcome β -lactam resistance conferred by metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae? *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02243-16.

MARTIN A, FAHRBACH K, ZHAO Q, LODISE T. Association between carbapenem resistance and mortality among adult, hospitalized patients with serious infections due to Enterobacteriaceae: results of a systematic literature review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5:ofy150.

MATUSCHEK E, ÅHMAN J, WEBSTER C, KAHLMETER G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Aug;24(8):865-870. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.020.

MAVROIDI A, KATSIARI M, LIKOUSI S, PALLA E, ROUSSOU Z, NIKOLAOU C, et al. Characterization of ST258 colistin-resistant, blaKPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital *Microb Drug Resist*, 22 (2016), pp. 392-398.

MCCANN E, SRINIVASAN A, DERYKE A, et al. Carbapenem-nonsusceptible Gramnegative pathogens in ICU and non-ICU settings in US hospitals in 2017: a multicenter study. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5:1–7.

MEISSNER, A; HAAG, R; RAHMANZADEH, R. Adjuvant fosfomicin medication in chronic osteomyelitis. *Infection*, 17:146-51, 1989.

MELETIS G, SKOURA L. Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic Resistance to mcr Genes. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2018;13(3):198-206.

MELETIS, G; TZAMPAZ, E; SIANOU, E; TZAVARAS, I; SOFIANOU, D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 25:946-947, 2011.

MICHALOPOULOS, A; VIRTZILI, S; RAFAILIDIS, P; CHALEVELAKIS, G; DAMALA, M; FALAGAS, ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. Clinical Microbiology and Infection, 16: 184–186, 2010.

MICHAPOULOS, AS; LIVADITIS, IG; GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. International Journal of Infectious Diseases, 11:e732-e739, 2011.

MIRAKHUR, A; GALLAGHER, MJ; LEDSON, MJ; HART, CA; WALSHAW, MJ. Fosfomycin therapy for multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 2:19-24, 2003.

MOHR KI. History of Antibiotics Research. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:237-272.

MONACO M, GIANI T, RAFFONE M, ARENA F, GARCIA-FERNANDEZ A, POLLINI S, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014.

MORENO-GARCÍA E, GARCÍA RODRÍGUEZ J, PAÑO-PARDO JR. Optimizing antimicrobial prescribing: a practical decalogue. Rev Esp Quimioter. 2017 Sep;30 Suppl 1:56-60.

MOURA ML, BOSZCZOWSKI I, MORTARI N, BARROZO LV, CHIARAVALLI NETO F, LOBO RD, PEDROSO DE LIMA AC, LEVIN AS. The Impact of Restricting Over-the-Counter Sales of Antimicrobial Drugs: Preliminary Analysis of National Data. Medicine (Baltimore). 2015 Sep;94(38):e1605.

MUNOZ-PRICE LS, ROSA R, CASTRO JG, et al. Evaluating the impact of antibiotic exposures as time-dependent variables on the acquisition of

carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Crit Care Med* 2016; 44:e949–e956.

NATHWANI D, RAMAN G, SULHAM K, et al. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 2014; 3:32.

O'NEILL J, 2014. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resis* 20:1–16.

ODDS FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 52:1, 2003.

OKAZAKI, M; SUZUKI, K; ASANO, N; ARAKI, K; SHUKUYA, N; EGAMI, T; HIGURASHI, Y; MORITA, K; UCHIMURA, H; WATANABE, T. Effectiveness of fosfomicin combined with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using the efficacy time index assay. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 8:37-42, 2002.

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014;5:643.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017. Em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.

ORSI TD, PERDIGÃO NETO LV, MARTINS RCR, LEVIN AS, COSTA SF. Polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* assigned as ST245: First report in an intensive care unit in São Paulo, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Mar;16:147-149.

PERDIGÃO-NETO LV, OLIVEIRA MS, RIZEK CF, CARRILHO CM, COSTA SF, LEVIN AS. Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomicin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1763-7. doi: 10.1128/AAC.02048-13.

PFAUSLER, B; SPISS, H; DITTRICH, P; ZEITLINGER, M; SCHMUTZHARD, E; JOUKHADAR, C. Concentration of Fosfomicin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53:848-52, 2004.

POUCHA SM, SATLIN MJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in special populations: solid organ transplant recipients, stem cell transplant recipients, and patients with hematologic malignancies. *Virulence* 2017; 8:391–402.

RAZ, R. Fosfomicin: an old-new antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 4-7, 2012.

RICE, LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clinics Proceeding*, 87(2):198-208, 2012.

RIGHI E, PERI AM, HARRIS PN, et al. Global prevalence of carbapenem resistance in neutropenic patients and association with mortality and carbapenem use: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:668–677.

ROSSI F, GIRARDELLO R, CURY AP, DI GIOIA TS, ALMEIDA JN JR, DUARTE AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis*. 2017 Jan - Feb;21(1):98-101.

ROUSSOS N, KARAGEORGOPOULOS DE, SAMONIS G, FALAGAS ME. 2009. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomicin for the treatment of patients with systemic infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34:506–515. 10.1016/j.ijantimicag.2009.08.013

RUIZ RAMOS J, SALAVERT LLETÍ M. Fosfomicin in infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Rev Esp Quimioter*. 2019; 32 Suppl 1:45-54.

SALOMÃO MC, GUIMARÃES T, DUAILIBI DF, PERONDI MBM, LETAIF LSH, MONTAL AC, ROSSI F, CURY AP, DUARTE AJS, LEVIN AS, BOSZCZOWSKI I. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in patients admitted to the emergency department: prevalence, risk factors, and acquisition rate. *J Hosp Infect.* 2017 Nov;97(3):241-246.

SÁNCHEZ-MORILLAS, L; PÉREZ-EZQUERRA, PR; REAÑO-MARTOS, M; MAYORGA, C; LAGUNA-MARTÍNEZ, JJ. Anaphylaxis induced by fosfomicin. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 105(3):241, 2010.

SANDNER-MIRANDA L, VINUESA P, CRAVIOTO A, MORALES-ESPINOSA R. The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus *Serratia*. *Front Microbiol.* 2018 May 11;9:828.

SANTIMALEEWORAGUN, W; WONGPOOWARAK, P; CHAYAKUL, P; PATTHARACHAYAKUL, S; TANSAKUL, P; GAREY, KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomicin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* Jul;42(4):890-900, 2011.

SCHINTLER MV, TRAUNMÜLLER F, METZLER J, KREUZWIRT G, SPENDEL S, MAURIC O, POPOVIC M, SCHARNAGL E, JOUKHADAR C. 2009. High fosfomicin concentrations in bone and peripheral soft tissue in diabetic patients presenting with bacterial foot infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:574–578. 10.1093/jac/dkp230.

SCHWEITZER, VG; DOLAN, DF; ABRAMS, GE; DAVIDSON, T; SNYDER, R. Amelioration of cisplatin-induced ototoxicity by fosfomicin. *Laryngoscope*, 96:948-58, 1986.

SERIO AW, KEEPERS T, ANDREWS L, KRAUSE KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus.* 2018 Nov;8(1).

SHANKAR C, NABARRO LEB, ANANDAN S, VEERARAGHAVAN B. Minocycline and Tigecycline: What Is Their Role in the Treatment of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms? *Microb Drug Resist*. 2017 Jun;23(4):437-446.

SHORTRIDGE D, GALES AC, STREIT JM, et al. Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open Forum Infect Dis* 2019; 6(S1):S63–S68.

SOULI, M; GALANI, I; ANTONIADOU, A; PAPADOMICHELAKIS, E; POULAKOU, G; PANAGEA, T. An outbreak of infections due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 50:364-73, 2010.

SUN, H; FUJITANI, S; QUINTILIANI, R; YU, VL. Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*: Part II: Antimicrobial Resistance, Pharmacodynamic Concepts, and Antibiotic Therapy. *Chest*,139:1172-1185, 2011.

THEURETZBACHER U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. *Curr Opin Microbiol* 2017; 39:106–112.

TRAPNELL, BC; MCCOLLEY, SA; KISSNER, DG; ROLFE, MW; ROSEN, JM; MCKEVITT, M; MOOREHEAD, L; MONTGOMERY, AB; GELLER, DE. Fosfomicin/tobramycin for inhalation in patients with cystic fibrosis with *Pseudomonas* airway infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(2):171-8, 2012.

TRAVIS A, CHERNOVA O, CHERNOV V, AMINOV R. Antimicrobial drug discovery: lessons of history and future strategies. *Expert Opin Drug Discov*. 2018 Nov;13(11):983-985. doi: 10.1080/17460441.2018.1515910.

TSERING, DC; PAL, R; KARL, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence and Current Susceptibility Pattern in Sikkim. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1):9–13, 2011.

TSUJI BT, POGUE JM, ZAVASCKI AP, PAUL M, DAIKOS GL, FORREST A, GIACOBBE DR, VISCOLI C, GIAMARELLOU H, KARAIKOS I, KAYE D, MOUTON JW, TAM VH, THAMLIKITKUL V, WUNDERINK RG, LI J, NATION RL, KAYE KS. INTERNATIONAL CONSENSUS GUIDELINES FOR THE OPTIMAL USE OF THE POLYMYXINS: ENDORSED BY THE AMERICAN COLLEGE OF CLINICAL PHARMACY (ACCP), EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ESCMID), INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA (IDSA), INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANTI-INFECTIVE PHARMACOLOGY (ISAP), SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE (SCCM), AND SOCIETY OF INFECTIOUS DISEASES PHARMACISTS (SIDP). *Pharmacotherapy*. 2019 Jan;39(1):10-39. doi: 10.1002/phar.2209.

VAN BOECKEL TP, BROWER C, GILBERT M, GRENFELL BT, LEVIN SA, ROBINSON TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(18):5649-54.

VENTOLA CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015; 40(4):277-83.

WEINER LM, WEBB AK, LIMBAGO B, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; 37:1288–1301.

WILLIAMS PCM, WAICHUNGO J, GORDON NC, SHARLAND M, MURUNGA S, KAMAU A, BERKLEY JA. The potential of fosfomycin for multi-drug resistant sepsis: an analysis of in vitro activity against invasive paediatric Gram-negative bacteria. *J Med Microbiol*. 2019 May;68(5):711-719.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR). <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/about-amr/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-caesar>.

WRIGHT GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(5):589-94.

XAVIER, B.B. et al. (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 21, e30280

XIA J, GAO J, TANG W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends.* 2016 Feb;10(1):14-21.

YAMAGUCHI, Y; HANAOKI, H; YANAGISAWA, C et al. Characterization of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) in a patient with septicemia during long-term vancomycin administration. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15:274-8, 2009.

YANG, Y.Q. et al. (2017) Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01204.

YIN, W. et al. (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* 8, e00543

YUN, D; DEY, M; HIGGINS, LJ; YAN, F; LIU, H; DRENNAN, CL. Structural Basis of Regiospecificity of a Mononuclear Iron Enzyme in Antibiotic Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 133: 11262-11269, 2011.

ZAYYAD H, ELIAKIM-RAZ N, LEIBOVICI L, PAUL M. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49 (2017) 542–548.

ZERBINO DR AND BIRNEY E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821-829, 2008.

ZERBINO DR. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *CurrProtoc Bioinformatics.* 2010 Sep; Chapter 11:Unit 11.5. doi: 10.1002/0471250953.bi1105s31.

ZHANG Y, CHEN XL, HUANG AW, et al. Mortality attributable to carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerg Microbes Infect* 2016; 5:e27.

ZHANG Z, CHEN M, YU Y, PAN S, LIU Y. Antimicrobial susceptibility among gram-positive and gram-negative blood-borne pathogens collected between 2012-2016 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Dec 13;7:152.

ZHOU H, ZHANG T, YU D, et al. Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrob Agents Chemother*; 55:4506-12, 2011.