

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

ANA CLAUDIA SOUZA RODRIGUES

**MECANISMO DE RESISTÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS
EM HOSPITAIS DE MATO GROSSO DO SUL**

CAMPO GRANDE-MS

2019

ANA CLAUDIA SOUZA RODRIGUES

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS
EM HOSPITAIS DE MATO GROSSO DO SUL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Dra. Marilene Rodrigues Chang

Co-orientadora: Dra. Ana Paula D'Alincourt
Carvalho Assef

CAMPO GRANDE-MS

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CLAUDIA SOUZA RODRIGUES

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS EM HOSPITAIS DE MATO GROSSO DO SUL

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang

Nota/Conceito _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Marilene Rodrigues Chang
(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul)

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Dedico esse trabalho aos meu pais Carlos José Rodrigues e Iracema de Souza Rodrigues que me ensinaram a valorizar os caminhos do conhecimento e também ao meu esposo Claysson Xavier da Silva e minhas filhas Fernanda Rodrigues Xavier e Izabella Rodrigues Xavier pela paciência nos momentos de ausência, compreensão nos períodos de tensão e pelo estímulo diário.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me permitiu chegar até aqui.

Às minhas orientadoras, Dra. Marilene Rodrigues Chang e Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef pela imensa gama de conhecimento a mim oferecida e pela paciência durante esses anos. Obrigada Dra. Marilene por ter me acompanhado nas minhas aflições e nas minhas alegrias dividindo comigo suas experiências. Obrigada Dra. Ana Paula por ter acreditado em mim e por me receber no LAPIH/FIOCRUZ oferecendo a sua expertise e momentos de imersão científica. É uma honra ter sido orientada por vocês!

À equipe do laboratório de Pesquisa de Infecção Hospitalar (LAPIH - IOC/FIOCRUZ), em especial Dra. Marise Asensi Dutra que deu sua permissão para que eu desenvolvesse parte desse trabalho em seu laboratório e ao doutorando Ivson Cassiano de Oliveira Santos, um verdadeiro anjo, que além de amizade e apoio, me ensinou muito e me ajudou em todos os momentos, tornando tudo possível.

As alunas do curso de Farmácia da UFMS, Yanara Miranda, Isadora Rezende e Camila Nogueira pelo apoio técnico e pela amizade que me confiaram.

Aos amigos e colegas do laboratório de Pesquisas Microbiológicas da UFMS, Karine Mattos, Dario Correa Junior e Rosianne Assis de Souza Tsujisaki pela convivência e momentos de descontração e a Caroline Conci por ter iniciado essa pesquisa coletando as amostras e fazendo os primeiros testes de produção de KPC.

A direção e à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e a equipe de microbiologia dos laboratórios dos três hospitais por permitirem esta pesquisa em prol do combate a infecções hospitalares.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta”
Chico Xavier

RESUMO

Infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos consiste em problema de saúde mundial e tem consequências clínicas graves. Os objetivos dessa pesquisa foram identificar mecanismos de resistência e comparar a similaridade genética de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos isoladas em três hospitais públicos de Campo Grande – MS. Nesse estudo foram incluídas 99 isolados de *Klebsiella pneumoniae* não sensíveis a carbapenêmicos, de pacientes internados em unidades de terapia intensiva no período de janeiro/2013 a agosto/2014. A identificação e a susceptibilidade antimicrobiana foram realizadas pelo sistema Vitek 2 compact system seguindo protocolo do *Clinical Laboratory Standard Institute* (2017). Para determinar a concentração inibitória mínima da tigeciclina foram utilizadas fitas E-test e para a polimixina B foi usada a técnica de microdiluição em caldo interpretado segundo BrCast (2017). Os genes de β -lactamases (*bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}) e genes de resistência a polimixina (*mcr*-1 a *mcr*-5) foram investigados pela técnica de reação em cadeia da polimerase. A relação clonal entre as *K. pneumoniae* estudadas foi avaliada por técnica de *pulsed field gel electrophoresis* e *multilocus sequence typing*. A resistência aos carbapenêmicos foi associada principalmente a produção de KPC (88,9%). Os micro-organismos também carregaram genes de β -lactamases de espectro estendido: *bla*_{SHV} (73,5%), *bla*_{TEM} (72,2%) e *bla*_{CTX-M} (43,9%). Amicacina (5,1%), tigeciclina (20,2%), fosfomicina (30,5%) e polimixina B (18,2%) foram as drogas com melhor atividade. A resistência as polimixinas foi devido a mutações no gene *pmrB*, diferente do gene *mgrB*, reportado em outras regiões do nosso país. Na técnica de PFGE foram observados 38 diferentes perfis genéticos que foram agrupados em 19 ST's (*sequence types*) distintos. Os clones mais frequentes em nossos hospitais foram: ST273 (13.1%), ST11 (11.1 %), ST 1298 (10.1%). Oito clones foram identificados em dois dos hospitais estudados e o ST11 foi encontrado nos três hospitais estudados. Os resultados obtidos mostram mutações deletérias no gene *pmrB* como principal mecanismo envolvido na resistência a polimixina em *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e existe disseminação clonal nos hospitais estudados.

Palavras chave – *Klebsiella pneumoniae*. Resistência a medicamentos. Variação genética.

ABSTRACT

Infections caused by resistant *Klebsiella pneumoniae* to carbapenems are a world health problem and these infections have serious clinical consequences. The objectives of this research were to identify mechanisms of resistance and to compare the genetic similarity of *K. pneumoniae* isolates resistant to carbapenems from three public hospitals in Campo Grande – MS. In this study, 99 *Klebsiella pneumoniae* non-susceptible to carbapenems, isolated in intensive care units from January/2013 to August/2014 were included. The identification and antimicrobial susceptibility were conducted by the Vitek 2 compact system following the protocol of the *Clinical Laboratory Standard Institute* (2017). E-test strip was used to determine the minimum inhibition concentration of tigecycline, and for polymyxin B, the broth microdilution technique according to BrCast (2017) was used. The genes of β -lactamases (*bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}) and resistance genes to polymyxin (*mcr*-1 to *mcr*-5) were researched by the polymerase chain reaction technique. The clonal relation between the *K. pneumoniae* studied were assessed by *pulsed field gel electrophoresis* and *multilocus sequence typing* techniques. The resistance to carbapenems was associated mainly to KPC (88.9%) production. The micro-organisms also carried genes of β -lactamases of extended spectrum: *bla*_{SHV} (73.5%), *bla*_{TEM} (72.2%) and *bla*_{CTX-M} (43.9%). Amikacin (5.1%), tigecycline (20.2%), fosfomicin (30.5%) and polymyxin B (18.2%) were the drugs with better activity. The resistance to polymyxins was due to mutations in the *pmrB* gene, different of *mgrb* gene, reported in other regions of our country. In the PFGE technique 38 different genetic profiles were grouped in 19 distinct ST's (*sequence types*). The most frequent clones in our hospitals were: ST273 (13.1%), ST11 (11.1 %), ST 1298 (10.1%). Eight clones were identified in two of the studied hospitals and the ST11 was found in 3 studied hospitals. The obtained results show deleterious mutations in the *pmrB* gene as the main mechanism involved in the resistance to polymyxin in *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and there is clonal dissemination in the studied hospitals.

Keywords – *Klebsiella pneumoniae*. Resistance to drugs. Genetic variation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de β -lactamases segundo Ambler e Bush, Jacoby e Medeiros.	22
Tabela 2 – Acurácia dos métodos fenotípicos para pesquisa de ESBL em Enterobactérias.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase.	24
Figura 2 – Distribuição de casos de infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase de acordo com o estado brasileiro.	26
Figura 3 – Teste de triagem para pesquisa de carbapenemases Hodge modificado.	29
Figura 4 – Teste de triagem para detecção de carbapenemases sugerido pela nota técnica n.1 (ANVISA, 2013).....	29
Figura 5 – Método de inativação de carbapenêmicos (CIM).	30
Figura 6 – Representação esquemática dos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB que regulam a produção do LPS bacteriano.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	do ingles <i>American Type and Culture Collection</i>
BKC	<i>Brazilian Klebsiella carbapenemase</i>
BRCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CA	<i>Categorical agreement</i>
CC	Complexo clonal
CDC	do ingles <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CESP	Grupo bacteriano: <i>Citrobacter, Enterobacter, Serratia</i> e <i>Providencia</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DDST	<i>Double-disk synergy test</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
IS	Sequência de inserção
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metallo- β -lactamase
MLST	do inglês <i>Multilocus sequence typing</i>
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
NDM	<i>New Delhi</i> Metallo-beta-lactamase
OMP	“ <i>Outer membran protein</i> ”
OXA	Oxacilinase
PBP	do inglês <i>Penicilin Binding protein</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	do inglês <i>Pulsed field gel eletrophoresis</i>

pH	Potencial de hidrogênio
PrKp	<i>K. pneumoniae</i> resistente a polimixina
SHV	Sulfidril variável
TE	Tampão Tris-EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Enterobactérias	17
2.1.1	Classificação taxonômica e características gerais	17
2.1.2	Infecções causadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.1.3	Antimicrobianos usados no tratamento de infecções causadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
2.2	Resistência aos antibióticos β-lactâmicos.....	20
2.2.1	β -lactamases.....	21
2.2.2	Deteção laboratorial de β -lactamases	27
2.2.3	Outros mecanismos de resistência	30
2.3	Resistência às polimixinas	31
2.3.1	Deteção laboratorial de resistência de <i>K. pneumoniae</i> às polimixinas	33
2.3.2	Epidemiologia molecular	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	REFERÊNCIAS.....	38
	CAPÍTULO I	52
	Non-clonal occurrence of <i>pmrB</i> mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Brazil (Artigo I publicado na revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”, vol 114 Epub 20 de maio de 2019).	
	CAPÍTULO II	58
	Post-Neurosurgical meningitis caused by KPC-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i>: report of two cases (Artigo II aceito por “Revista do Instituto de Medicina Tropical, em processo de publicação).	
	CAPÍTULO III	69
	Molecular epidemiology and resistance mechanisms in carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from public hospitals in Midwest of Brazil. (Manuscrito I a ser submetido à revista Infection Control & Hospital Epidemiology.	
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
	APÊNDICE A – RELAÇÃO DE BACTÉRIAS E RESULTADOS.....	89
	APÊNDICE B – INICIADORES E CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE PCR	91

1 INTRODUÇÃO

Dentre as enterobactérias, em particular a espécie *Klebsiella pneumoniae*, é frequentemente associada a infecções do trato urinário, de corrente sanguínea, pneumonias hospitalares e comunitárias. Essa bactéria está entre os três principais agentes de infecções nas unidade de terapia intensiva – UTI (LUNA et al., 2014; SADER et al., 2014).

No ambiente hospitalar, os carbapenêmicos são antimicrobianos β -lactâmicos utilizados para o tratamento de infecções graves, principalmente causadas por bacilos Gram-negativos. A emergência de *K. pneumoniae* resistente a esses antibióticos tem dificultado o tratamento e contribuído com a mortalidade das infecções causadas por esses micro-organismos (NORDMAN e CORNAGLIA, 2012; ZARKOTOU et al., 2011).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser intrínsecos (natural da bactéria) ou adquiridos. Os mais comuns são: produção de enzimas que degradam o antibiótico, expressão de bombas de efluxo e redução da permeabilidade da membrana (LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

Dentre as enzimas que degradam os β -lactâmicos, as β -lactamases são as mais frequentes em enterobactérias e podem ser de origem cromossomal ou ser encontradas em elementos móveis. As β -lactamases de espectro estendido – ESBL, têm espectro de ação mais amplo e hidrolisam todas as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos e também podem estar associadas com resistência a outras classes de antibióticos (SHI et al., 2015; THENMOZHI et al., 2014). Outra enzima importante na resistência aos β -lactâmicos é AmpC. Essa enzima cromossomal em algumas bactérias pode hidrolisar penicilinas, cefalosporinas até 3ª. Geração e monobactâmicos. Embora mais comum em bacilos Gram negativos não fermentadores e enterobactérias do grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*), a transmissão plasmidial propiciou a disseminação do gene AmpC para outros micro-organismos, tais como *K. pneumoniae* (BUSH e JACOBY, 2010).

Os antibióticos de escolha para tratamento de infecções causadas por Gram negativos são os carbapenêmicos. Essas drogas são estáveis a maioria das β -lactamases. Porém a presença de ESBL ou AmpC associadas a perda de porinas ou bombas de efluxo diminuem a sensibilidade aos antibióticos desta classe (BUSH e JACOBY, 2010; TSAI et al., 2011).

Nos últimos anos, enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, como *Klebsiella* produtora de carbapenemases – KPC, metalo- β -lactamase – MBL e OXA-48 vem sendo descritas no mundo todo (LEE et al., 2016, NORDMAN, DORTET e POIREL., 2014; SAMPAIO et al., 2014).

No Brasil, a carbapenemase mais frequente em enterobactérias é a KPC. A disseminação de genes de resistência por elementos móveis como plasmídeos e transposons possibilitou a circulação de alguns clones de bactérias produtoras de KPC no cenário mundial (BOWERS et al., 2015). O complexo clonal 11 (CC11), também denominado CC 258 tem sido o mais associado a dispersão do gene *bla*-KPC e é também o mais frequente no Brasil e no mundo (BOWERS et al., 2015; PEREIRA et al., 2013).

Infecções causadas por bactérias produtoras de KPC são de difícil tratamento e muitas vezes se faz necessário o uso de duas ou três drogas combinadas na terapia. Alguns antimicrobianos podem ser usados, tais como: fosfomicina, tigeciclina e polimixinas (BRUST, EVANS e PLEMMONS, 2014; GALES, JONES e SADER, 2011; SOULI et al., 2011). Novos antimicrobianos como ceftazidima/avibactam parecem ser promissores no tratamento dessas infecções (VAN DUIN et al., 2016).

As polimixinas têm sido consideradas última opção para tratamento de infecções graves por Gram negativos, porém bactérias com sensibilidade reduzida a essa droga já foram descritas (CANNATELLI et al., 2013; CARATOLLI et al., 2017; FERNANDES et al., 2016). Mutações em genes que regulam o lipídeo A presente nos lipopolissacarídeos (LPS) ou a presença de gene de resistência mediado por plasmídeos e denominado *mcr-1* e suas variantes estão relacionados à resistência às polimixinas (BOROWIAK et al., 2017; CARATOLI et al., 2017; HU et al., 2016; XAVIER et al., 2016; YIN et al., 2017).

A resistência aos antimicrobianos constitui complexo problema de saúde, sendo necessários esforços em todos os níveis de cuidado ao paciente para melhorar o controle de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes e o laboratório de microbiologia desempenha papel fundamental para esse controle (BRASIL, 2013; SIMÕES et al., 2016).

No estado de Mato Grosso do Sul, existem poucos estudos que descrevem mecanismos de resistência aos antibióticos em *K. pneumoniae* (CHANG et al., 2013; BIBERG et al., 2015). Considerando o elevado poder de disseminação de bactérias

que carregam esses genes de resistência, a detecção precoce dessas é de grande relevância para auxiliar o tratamento e instituir medidas de precaução adequadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enterobactérias

2.1.1 Classificação taxonômica e características gerais

A família Enterobacteriaceae é composta por bacilos Gram negativos fermentadores de glicose, oxidase negativos, frequentemente encontrados em intestino humano e de animais. Na natureza, essa bactéria é encontrada em água, solo e plantas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Bactérias do gênero *Klebsiella* são anaeróbicos facultativos, lactose, ureia e citrato positivos, produtor de gás, indol negativo e imóvel. Esse gênero foi assim denominado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs que descreveu a espécie mais frequente, *K. pneumoniae* em 1887 (MARTINEZ et al., 2004; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Inicialmente as espécies de *Klebsiella* foram agrupadas de acordo com sua patogenicidade. Atualmente esse gênero é composta de 13 espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. singaporensis*, *K. michiganensis*, *K. alba*, *K. quasipneumoniae*, *K. trevisanii*, *K. variicola*, *K. mobilis*, *K. ornytholitica*, *K. granulomatis*, *K. planticola* e *K. terrigena*. Com o avanço de técnicas de biologia molecular, uma proposta de mudança de gênero para as cinco últimas espécies citadas e criação de novas subespécies têm sido propostas (JANDA et al., 2015). Mais recentemente a análise filogenética do chamado *Enterobacter aerogenes* demonstrou que essa bactéria está mais relacionada com o gênero *Klebsiella* e houve a realocação taxonômica da nova espécie (*K. aerogenes*) (TSANG et al., 2019).

2.1.2 Infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é agente oportunista que pode causar diversas infecções relacionadas a assistência à saúde - IRAS (BELL et al., 2007; SOUZA et al., 2016). Essas infecções são aquelas que acometem o indivíduo hospitalizado ou não, que possam estar associadas a algum procedimento assistencial, quer seja terapêutico ou diagnóstico (HORAN et al., 2008).

Programas de monitoramento têm destacado a importância de *K. pneumoniae* em infecções no ambiente hospitalar. Dados do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance*

Program) mostram que essa bactéria foi um dos três micro-organismos mais prevalentes isolados de pacientes internados em unidades de terapia intensiva nos EUA e Europa entre 2009 e 2011 (SADER et al., 2014). O estudo multicêntrico MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) também descreve essa bactéria como o terceiro agente mais frequente em amostras hospitalares na América do Sul (KIFFER et al., 2005).

A colonização de pacientes geralmente precede a infecção causada por *K. pneumoniae*. Esse micro-organismo já foi isolado de mãos (DE MORAES BRUNA et al., 2016), estetoscópios (JEYAKUMARI et al., 2016), nasofaringe (REINATO et al., 2015) e em outros equipamentos e sítios anatômicos. Pneumonia, sepse, infecções do trato urinário (ITU), bacteremia, meningite e infecções de pele são exemplos de infecções causadas por essa enterobactéria (BELL et al, 2007; SADER et al., 2014).

A virulência de *K. pneumoniae* está relacionada principalmente à presença de lipopolissacárides, sideróforos e antígenos capsulares (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Apesar de vários fatores determinarem a virulência dessa bactéria, a composição dos açúcares da cápsula é determinante para a severidade das infecções. Linhagens com os sorotipos K1 e K2 são as mais patogênicas e mais prevalentes (LIAO et al., 2011; PAN et al., 2013). Além disso, a formação de biofilmes contribui para a permanência dessa bactéria em biomateriais como cateteres e sondas (CLEG e MURPHY, 2016).

2.1.3 Antimicrobianos usados no tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae*

As principais classes de antibióticos usadas no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* são β -lactâmicos, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Os β -lactâmicos se ligam e inativam as PBP's (*penicilin-binding proteins*) impedindo a transpeptidação da parede celular bacteriana. Nessa classe de antimicrobianos enquadram-se cefalosporinas de terceira e quarta geração, penicilinas com inibidores de β -lactamases e carbapenêmicos. Dentre esses antibióticos, os carbapenêmicos são amplamente utilizados para o tratamento de infecções graves, principalmente quando há elevados níveis de resistência a outros β -lactâmicos (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Recentemente, novos β -lactâmicos associados com inibidores de β -lactamase como ceftazidima/avibactam e ceftolozane/tazobactam entraram no mercado para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias. Ceftazidima/avibactam tem demonstrado atividade frente a enterobactérias produtoras de β -lactamases, com exceção de metalo- β -lactamase do tipo NDM-1. Ceftolozane/tazobactam tem atividade reduzida para *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e não tem atividade para produtores de carbapenemase (VAN DUIN e BONOMO, 2016).

Outra classe de antimicrobianos utilizados em infecções causadas por *K. pneumoniae* é a das fluoroquinolonas. Essa classe de antimicrobianos inibe a ação das topoisomerasas: DNA girase e topoisomerase IV e são muito utilizados em infecções respiratórias e urinárias, tanto em monoterapia como em combinação com outros antibióticos (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). Apesar de sua eficácia antimicrobiana, o *United States Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medical Agency* (EMA) restringiram recentemente o uso das quinolonas nos Estados Unidos e na Europa devido a efeitos colaterais graves e incapacitantes (FDA, 2016; EMA, 2018; MARCHANT, 2018)

A classe dos aminoglicosídeos atua por inibição de síntese proteica por ligação com a unidade 30S do ribossomo bacteriano (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). Esses antibióticos são usados em associação com outros antimicrobianos para obtenção de efeito sinérgico. O uso combinado de β -lactâmicos com aminoglicosídeos tem sido mais efetivo contra infecções por *K. pneumoniae* ESBL do que a combinação com fluorquinolonas (CHA et al., 2015).

Fármacos desenvolvidos mais recentemente como a tigeciclina, da classe das glicilciclinas, agem também na unidade ribossomal alterando a tradução de proteínas. Esse antimicrobiano foi aprovado pelo FDA para o tratamento de infecções de pele, intra-abdominais complicadas e pneumonia adquirida na comunidade causadas por enterobactérias. A tigeciclina pode ser útil em infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos se usado em regime de altas doses ou associado a outros fármacos (NI et al., 2016).

Nas últimas décadas, a emergência de bactérias multirresistentes e a falta de opções terapêuticas fez com que antibióticos antes abandonados, tais como polimixinas e fosfomicina, voltassem a ser utilizados. As polimixinas (polimixina B e polimixina E- colistina) são peptídeos cíclicos que foram descobertos em 1947 por

meio de fatores metabólicos produzidos por *Paenibacillus polymyxa* (AINSWORTH et al., 1947 *apud* RAZA, YANG E SHEN, 2008). A polimixina B difere da colistina (polimixina E) por um único aminoácido, D-fenilalanina no lugar de D-Leucina que existe nessa última (BERGEN et al., 2006; GIRARDELLO et al., 2012). Existem duas formulações de polimixinas E disponíveis comercialmente: sulfato de colistina (tópico) e colistimetato de sódio (uso parenteral), enquanto a polimixina B só tem apresentação de uso parenteral. Esses polipeptídeos são compostos catiônicos que têm afinidade pelas cargas negativas do lipídio A do lipopolissacáride (LPS) dos Gram negativos. Quando esses fármacos se ligam ao Lipídio A, deslocam cálcio e magnésio causando um efeito detergente que desestabiliza a membrana celular (GUNN, 2008). Na década de 1970, o uso de polimixina foi abandonado devido à sua toxicidade, porém na década de 1990, houve aumento de resistência bacteriana e esse medicamento foi reintroduzido na clínica para uso em infecções causadas por bactérias multi-resistentes (GIRARDELLO et al., 2012).

Polimixinas constituem atualmente uma das últimas opções de tratamento para infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e apesar de sua toxicidade, tem sido amplamente utilizadas (GISKE, 2015; MICHALOPOULOS et al., 2010).

As fosfomicinas são agentes bactericidas que inibem o primeiro passo da síntese do peptidoglicano da parede bacteriana e com isso possui amplo espectro de ação, sendo eficaz contra Gram-positivos e Gram-negativos. Apesar desse antimicrobiano ter sido negligenciado por muitos anos, estudos recentes vêm demonstrando sua eficácia, inclusive para infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (GISKE, 2015; LEE et al., 2016; YU et al., 2017).

2.2 Resistência aos antibióticos β -lactâmicos

K. pneumoniae podem apresentar mais de um mecanismo de resistência aos antibióticos, fato esse, que limita as opções terapêuticas para o tratamento de infecções graves (HASHEMI et al., 2014; TAHERPOUR e HASHEMI, 2013; TSAI et al., 2011). O principal mecanismo de resistência de bacilos Gram-negativos é a produção de β -lactamases, enzimas que se encontram em altas concentrações no

espaço periplasmático dessas bactérias, capazes de romper o anel β -lactâmico (BUSH e JACOBY, 2010).

2.2.1 β -lactamases

A descoberta do primeiro mecanismo capaz de hidrolisar as penicilinas (penicilinase) foi feita antes desses antibióticos terem sido utilizados em larga escala (ABRAHAM e CHAIN, 1940). Em 1960, outra β -lactamase mediada por plasmídeos foi descrita em *Escherichia coli* isolada de hemocultura de um paciente com nome Temoniera na Grécia e por isso essa enzima foi denominada TEM-1 (MEDEIROS, 1984; DALTA et al., 1965 *apud* BRADFORD, 2001). Em seguida foi descoberta outra penicilinase denominada SHV-1 (Sulfidril variável), de origem cromossômica, presente em *K. pneumoniae* e que poderia ser carregada por plasmídeos (MATTHEW et al., 1979).

Com o tempo novas enzimas foram sendo descobertas e surgiram dois sistemas de classificação de β -lactamases (Tabela 1). O primeiro baseado na sequência de aminoácidos (AMBLER *et al.*, 1991) e outro de acordo com características funcionais dessas estruturas (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995). Com o avanço científico, a possibilidade de sequenciamento dos genes de resistência, novos subgrupos e variantes têm sido constantemente adicionados aos esquemas de classificação (BUSH e JACOBY, 2010).

Klebsiella pneumoniae expressa β -lactamases cromossômicas que conferem resistência intrínseca a diversos antimicrobianos como: ampicilina, amoxicilina, ticarcilina e carbenicilina. Além disso, tem a capacidade de adquirir outras β -lactamases por meio de elementos móveis (ROSSI e ANDREAZZI, 2005)

Tabela 1 - Classificação de β -lactamases segundo Ambler e Bush, Jacoby e Medeiros.

Grupo	Classe	Substrato	Inibição por clavulanato	Enzimas representantes
1	C	Cefalosporinas	Não	AmpC (CMY-2, FOX-1, MIR-1, GC1, CMY-37)
2 a	A	Penicilinas	Sim	Penicilinases de GP
2b	A	Penicilinas	Sim	SHV, TEM-1, TEM-2, TEM-90
2be	A	Cefalosporinas Penicilinas Cefalosporinas	Sim	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1, CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10
2br	A	Penicilinas	Sim/Não	TEM-30 a TEM-36, TRC-1, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	A	Penicilinas	Pouco	TEM-58, TEM-68, TEM-89
2c	A	Penicilinas Cabernicilina	Sim	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3
2d	D	Penicilinas Cloxacilina	Sim/Não	OXA-1, OXA-10, PSE-2
2de	D	Penicilinas Cefalosporinas	Sim/Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenens Cloxacilina	Sim	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas	Sim	Cefalosporinases induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i> CepA
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenêmicos	Sim	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i> IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2
3	B	Maioria dos beta-lactâmicos, inclusive carbapenêmicos	Não	IMP, NDM, VIM, SPM, AIM, KHM, GIM, SMB, TMB, FIM, CphA, Sfh-1, L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	Indeterminada	Penicilinas	Não	Penicilinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

Fonte: Adaptado de Bush e Jacoby(2010)

Classe A de Ambler

As β -lactamase de espectro estendido - ESBL pertencentes a classes A e D de Ambler, são variantes das β -lactamases clássicas: TEM-1 e SHV-1 e foram inicialmente descritas em *K. ozaenae* (KLIEBE et al., 1985).

Uma ou mais substituições de aminoácidos em TEM-1 e SHV-1 podem conferir resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, característica das

ESBL (BUSH e JACOBY, 2010). Normalmente, mais de um tipo de enzima está presente em *K. pneumoniae* e é muito comum ocorrer associação dos subtipos de TEM, SHV e CTX-M (CHAGAS et al., 2011).

Enterobactérias produtoras de ESBL do tipo SHV e TEM são descritas como mais frequentes em diversos estudos incluindo relatos brasileiros (FERREIRA et al., 2019; FLORES et al., 2016). Estudo recente no Paquistão (ABRAR et al., 2019) e relato de Nogueira et al. (2015) realizado em hospitais da região sul observaram CTX-M como predominante, o que demonstra que a ocorrência de ESBL pode variar de acordo com a área geográfica.

A ESBL do tipo CTX-M foi reportada pela primeira vez por Bauernfeind et al. (1990) e tem como substrato preferencial a cefotaxima. Bacilos Gram negativos produtores dessa enzima podem ser inibidos por inibidores de β -lactamase, como tazobactam e ácido clavulânico. As variantes mais encontradas no Brasil são CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-8, CTX-M-9 e CTX-M-15 (CHAGAS et al., 2011; SEKI et al., 2013).

Isolados clínicos produtores de ESBL também podem expressar mecanismos de resistência a outras classes de antimicrobianos, tais como fluorquinolonas e aminoglicosídeos e quando combinado com perda de porinas e bomba de efluxo também reduzem a sensibilidade aos carbapenêmicos (CHA et al., 2015; CHARFI et al., 2017).

Uma das mais importantes β -lactamases produzidas por *K. pneumoniae* é a KPC. Consiste em uma serino- β -lactamase capaz de hidrolisar todos os β -lactâmicos incluindo carbapenêmicos (CANATELLI et al., 2014; YIGIT et al., 2001). A enzima KPC-1 foi reportada pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolada de amostra de paciente internado em hospital da Carolina do Norte – EUA (YIGIT et al., 2001). Em seguida KPC-2 e KPC-3 foram reportados nos Estados Unidos, com diferença de apenas um aminoácido entre uma variante e outra (SMITH et al., 2003; WOODFORD et al., 2004). Sequenciamento posterior dessas enzimas, detectaram que a publicação inicial KPC-1 tinha sequência idêntica a KPC-2 e a publicação inicial foi revisada mantendo a segunda denominação (YIGIT et al., 2001).

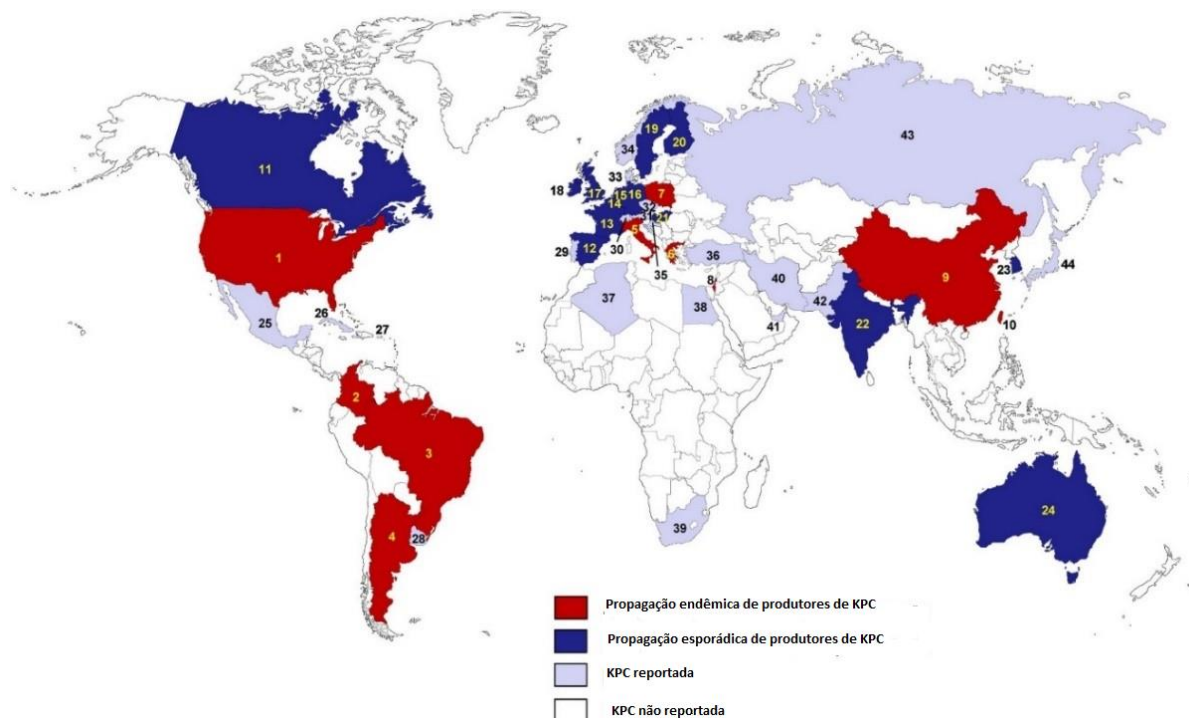
Estudo de Bradford et al. (2004) demonstrou a emergência do gene *bla*-KPC em amostras provenientes de sete diferentes hospitais de Nova York. Daí em diante a disseminação de enterobactérias produtoras de KPC vêm sendo descrita em todo o mundo (CANATELLI et al., 2014; CHUNG et al., 2011; SMITH et al., 2003;

STEINMANN et al., 2011; YU et al., 2017) como podemos observar na figura 1. No Brasil, o gene *bla*-KPC foi reportado pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolados de amostras clínicas provenientes de Recife - PE (MONTEIRO et al., 2009) e a variante KPC-2 é considerada endêmica no Brasil. A figura 2 mostra as publicações de *K. pneumoniae* produtora de KPC em todo país.

O alto poder de disseminação do gene *bla*-KPC se deve a sua inserção em elementos genéticos móveis, como transposons e plasmídeos conjugativos. O principal elemento móvel reportado na literatura é o transposon Tn4401 responsável pela disseminação desse gene no Brasil e no mundo (MATHERS et al., 2011).

No estado de Mato Grosso do Sul, o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi feito pelo nosso grupo de pesquisa. Essa bactéria foi isolada de urina em paciente com leucemia linfocítica admitida no Hospital Universitário (HUMAP) no ano de 2010 (CHANG et al., 2013). Recente estudo mostra que *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase é muito frequente nos grandes hospitais de nosso estado (CAMPOS et al., 2017).

Figura 1 - Distribuição global de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase.



Fonte: Lee et al., 2016.

Confirmando a diversidade e evolução das β -lactamases, outra carbapenemase denominada BKC (Brazilian *Klebsiella carbapenemase*) foi descrita em três isolados na cidade de São Paulo (NICOLETTI et al., 2015). Apesar do gene *bla*-BKC só ter sido relatado no estado de São Paulo até o momento e com baixa prevalência (0,3%), essa carbapenemase foi encontrada em elementos móveis e pode se disseminar para outras bactérias e outras regiões (MARTINS et al., 2016).

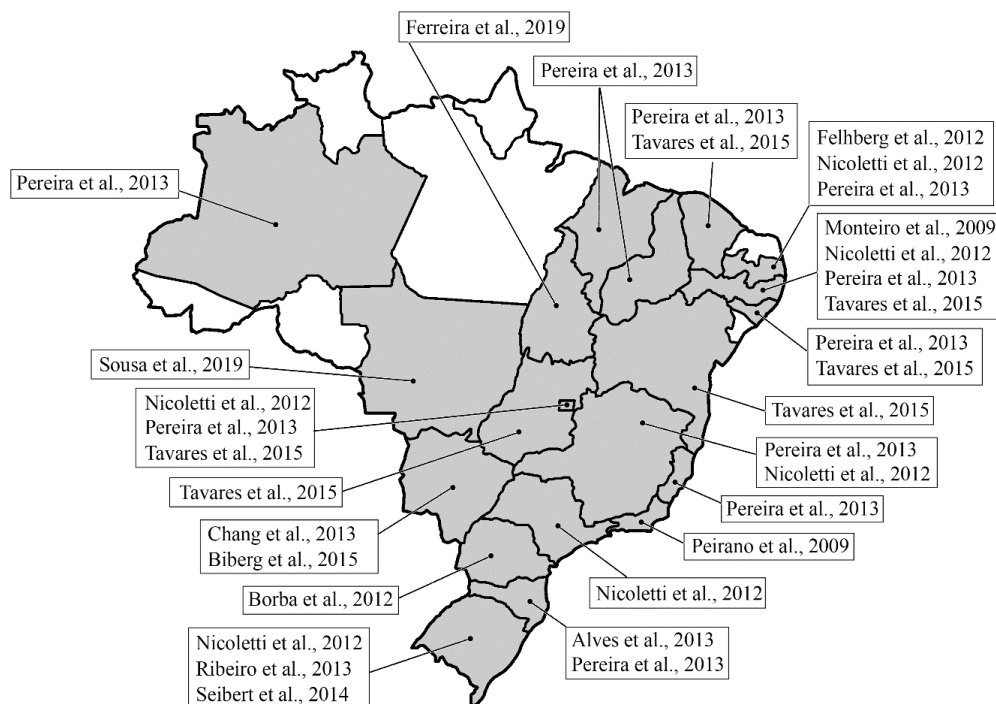
Classe B de Ambler

Metalo β -lactamases (MBL) pertencem ao grupo B de Ambler e são assim denominadas por sua dependência de metais como o Zinco. São capazes de hidrolisar os antibióticos carbapenêmicos e as mais prevalentes no mundo são as variantes do tipo IMP (Imipenemase) e VIM (Verona imipenemase), reportadas principalmente em países Europeus e nos EUA. Têm sido descritas principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*, mas também podem estar presentes em outras bactérias, incluindo *K. pneumoniae* (JU et al., 2018; YONG et al., 2009) o que sugere troca de material genético entre diferentes espécies. No Brasil, SPM (São Paulo metallo- β -lactamase) é a MBL mais comum e está restrita a bacilos Gram negativos não fermentadores (CARVALHO et al., 2006).

A MBL, New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (NDM) foi descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* proveniente de urina de uma paciente Indiana que vivia na Suécia (YONG et al., 2009). No Brasil, essa carbapenemase já foi reportada em *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013), *Enterobacter hormaechei* (CARVALHO-ASSEF et al., 2014), *Enterobacter cloacae complex*, *Morganella morganii* (ROZALES et al., 2014), *K. pneumoniae* (AIRES et al., 2017) e *Acinetobacter baumannii* (PILONETTO et al., 2014).

Diferente das outras MBL, NDM costuma conferir resistência também a outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, sulfonamidas e fluorquinolonas, pois é comum a associação com outros determinantes de resistência (NORDMAN, DORDET e POIREL, 2014; QUILES et al., 2015).

Figura 2 – Distribuição de casos de infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase de acordo com o estado brasileiro.



Classe C de Ambler

Outras β -lactamases importantes na resistência aos antimicrobianos são as cefalosporinases do tipo AmpC, enzimas serino-dependentes comuns em cromossomos de bacilos Gram-negativos não fermentadores e enterobactérias do grupo CESP (gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*). A presença de alguns antibióticos, como de penicilinas, imipenem ou combinações com ácido clavulânico pode induzir a hiperprodução dessa enzima e promover hidrólise de penicilinas, cefalosporinas até 3ª. Geração e monobactams (BUSH e JACOBY, 2010).

A transmissão plasmidial de AmpC favoreceu a disseminação desse gene para outras bactérias, tais como *K. pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, dentre outras (PHILIPPON et al., 2002; SHENG et al., 2013). Os genótipos de AmpC mais descritos na literatura são: CMY, MIR, MOX, LAT, FOX, DHA, ACT e ACC (BUSH e JACOBY, 2010; JACOBY, 2009). Apesar dessas enzimas serem relatadas esporadicamente em nosso país, as do tipo CMY-2 são as mais prevalentes (CAMPANA et al., 2013; JACOBY, 2009).

Classe D de Ambler

As oxacilinases são enzimas que têm capacidade de hidrolisar as penicilinas, não são inibidas por inibidores de β -lactamases e foram inicialmente descritas em bacilos Gram-negativos não fermentadores. Apesar da alta variabilidade quanto a sequência de aminoácidos e em relação ao espectro de ação, de forma geral conferem resistência a ampicilina, cefalotina, cloxacilina e oxacilina (BUSH e JACOBY, 2010).

A maioria das oxacilinases deriva de OXA-2 e OXA-10 e estão geralmente associadas a elementos móveis (Exceção OXA-51). A variante OXA-11, derivada de OXA-10 foi reportada como variante de espectro estendido pela sua capacidade de se ligar as cefalosporinas de amplo espectro e por isso foi alocada no grupo 2de de Bush (BUSH e JACOBY, 2010).

Outros grupos como os da OXA-23 e OXA-48 são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e pertencem ao subgrupo 2df de Bush (EVANS e AMYES, 2014). A carbapenemase OXA-23 foi a primeira oxacilinase reportada no Brasil em *Acinetobacter baumannii* (DALLA-COSTA et al., 2003).

As oxacilinases mais frequentes em Enterobacteriaceae são as do tipo OXA-48 e representam um dos maiores problemas de resistência aos carbapenêmicos na última década (EVANS e AMYES, 2014). No Brasil, uma nova variante também capaz de hidrolisar os carbapenêmicos, OXA-370, foi descrita em *Enterobacter hormaechei* por Sampaio et al. (2014). Estudo posterior encontrou essa β -lactamase em diferentes espécies de enterobactérias no Brasil e destacou a importância do clone ST16 de *K. pneumoniae* para disseminação desse gene (PEREIRA et al., 2015).

2.2.2 Detecção laboratorial de β -lactamases

A partir da década de 1990, a disseminação de bactérias produtoras de β -lactamases, motivou a instituição de técnicas para pesquisa dessas enzimas nos laboratórios de rotina.

A pesquisa fenotípica de ESBL pode ser realizada por técnica de aproximação de discos, “Double Disc Synergy Test” (DDST), discos combinados, por fitas impregnadas com antibióticos (E-test®) ou por métodos automatizados. Dados de sensibilidade e especificidade desses métodos são mostradas na Tabela 2. O uso rotineiro dessas metodologias foi recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standard*

Institute – CLSI até o ano de 2010. A partir de então, a pesquisa de ESBL foi substituída pela mudança de pontos de corte para as cefalosporinas e passou a ser recomendada apenas para fins epidemiológicos (CLSI, 2017).

Tabela 2 – Acurácia dos métodos fenotípicos para pesquisa de ESBL em Enterobactérias.

Método	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Referência
<i>DDST</i>	96,0	96,0	Garrec et al., 2011
<i>Discos combinados</i>	96,0-100,0	84,0-91,0	
<i>E-test</i>	90,0	89,0	
<i>Phoenix</i>	100,0	51,5	Wiegand et al., 2007
<i>Vitek</i>	84,5	93,9	

DDST - double-disk synergy test

Em consequência da emergência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos o CLSI, a partir de 2009, passou a sugerir a pesquisa de carbapenemases para enterobactérias resistentes as cefalosporinas e resistentes a um ou mais carbapenêmicos. Atualmente, técnicas fenotípicas como a de Hodge modificado, Carba-NP e mais recentemente *Carbapenem Inactivation Method* são sugeridas para triagem de carbapenemases, além da recomendação de ensaios moleculares específicos para confirmação (CLSI, 2017).

O método de Hodge modificado consiste em observar o alargamento da área de crescimento bacteriano de uma cepa de *E. coli* ATCC 25922 frente a um carbapenêmico devido à presença de uma bactéria produtora de carbapenemase (Figura 3). Apesar da boa sensibilidade e fácil execução apresenta especificidade baixa e limitações na interpretação dos resultados. Além disso, resultados falsos positivos podem ser encontrados em bactérias produtoras de AmpC e ESBL (CTX-M) (CARVALHÃES et al., 2009; CURY et. al., 2012).

No intuito de melhorar a detecção de AmpC, MBL e KPC, outra técnica com inibidores e potenciadores para detecção de carbapenemases foi sugerida por nota

técnica da Anvisa (BRASIL, 2013). A interpretação do resultado é positiva quando se observa diferença maior de 5mm entre o disco de carbapenêmico e a sua combinação, conforme mostra a figura 3.

Outra metodologia, baseada na detecção direta da hidrólise de carbapenêmicos, denominada Carba-NP, também foi recomendada pelo CLSI por apresentar elevada especificidade (100%) e boa sensibilidade (até 80% com inóculo bacteriano concentrado) e propicia resultados rápidos (figura 4). Entretanto, colônias mucoides e bactérias produtoras de OXA-48 podem resultar em resultados falso negativos (TIJET et al., 2013). Recentemente, novo método de baixo custo e de fácil execução, CIM (Figura 5), demonstrou alta performance (96,6% de concordância) quando comparado ao Carba-NP na detecção de carbapenemases e constitui uma ótima ferramenta para os laboratórios de rotina (VAN DER ZWALUW et al., 2015).

Figura 3 – Teste de triagem para pesquisa de carbapenemases Hodge modificado.

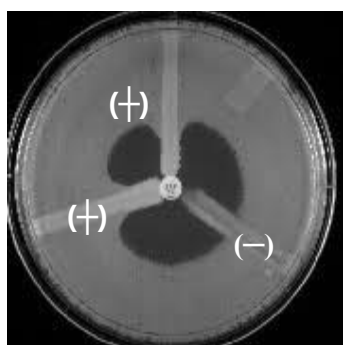
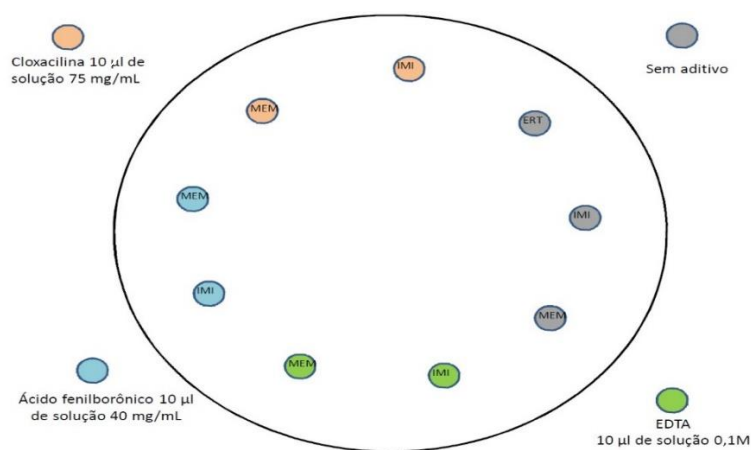
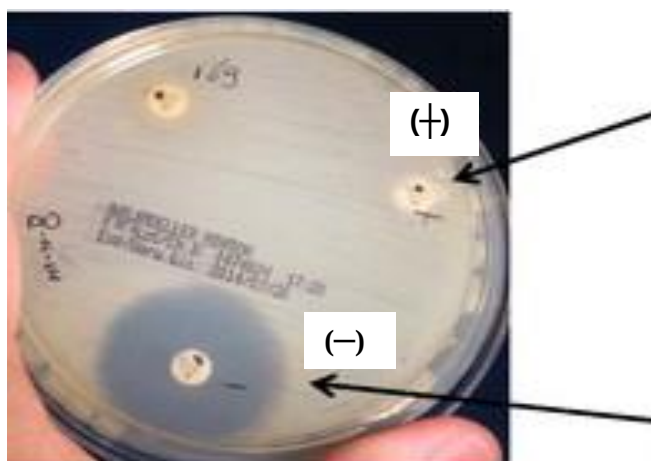


Figura 4 – Teste de triagem para detecção de carbapenemases sugerido pela nota técnica n.1 (ANVISA, 2013).



M – meropenem; I – imipenem

Figura 5 – Método de inativação de carbapenêmicos (CIM).



2.2.3 Outros mecanismos de resistência

A entrada de muitos antibióticos na bactéria depende de canais bacterianos de porina e ocorre de acordo com o tamanho, carga e hidrofobicidade da droga. A diminuição da expressão desses canais é um mecanismo de resistência importante, pois limita a passagem dos antimicrobianos pela membrana, reduzindo sua ação. O termo mais usado para designar porinas é “Omp” que significa: “*Outer membrane protein*”. As principais porinas descritas em *K. pneumoniae* são Ompk35 e Ompk36. Inserções ou deleções nos genes relacionados a produção de porinas podem resultar em aumento da concentração inibitória mínima (CIM) para cefalosporinas e carbapenêmicos (TSAI et al., 2011).

Outro mecanismo de resistência importante são as bombas de efluxo que se caracterizam por estruturas que lançam substâncias do meio intracelular para o meio extracelular de forma ativa e assim protegem a bactéria de substâncias nocivas como antibióticos. Estes sistemas são constituídos por uma proteína de ligação e uma proteína transportadora. As bombas de efluxo podem afetar múltiplos fármacos ou pode ser específico a um antibiótico. Os genes de bomba de efluxo são geralmente cromossomais, mas podem estar alojados em elementos móveis como plasmídeos e transposons (DOMENECH-SANCHES, 2001 *apud* PADILLA et al., 2010).

As bombas de efluxo mais encontradas em *K. pneumoniae* são: AcrAB, AcrEF e OqxAB que estão relacionadas à diminuição de sensibilidade aos β -lactâmicos, fluoroquinolonas e glicilciclinas (PADILLA et al., 2010; VISALLI et al., 2003). A hiperexpressão dessas bombas ou a perda de porinas aliada a outros mecanismos

podem resultar em altos níveis de resistência aos β -lactâmicos (TAHERPOUR e HASHEMI, 2013).

2.3 Resistência às polimixinas

O uso inadequado de antibióticos tem contribuído para seleção de micro-organismos multirresistente, portanto o uso dos carbapenêmicos em larga escala pode ter contribuído para o aumento da resistência a esses antimicrobianos e aumentado o uso das polimixinas nos últimos anos (CANNATELLI et al., 2014; ROSSI et al., 2017).

A diminuição de sensibilidade das bactérias às polimixinas pode ser causada pelo aumento da cápsula de polissacarídeo (CAMPOS et al., 2004) ou por mutações no sistema de dois componentes que modifica o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (CANNATELLI et al., 2013).

Os primeiros estudos de resistência às polimixinas foram realizados em *Salmonella* entérica. Estudos mostram que a adição de 4-amino-arabinose no lipídeo A do LPS da parede bacteriana diminui a afinidade das polimixinas (GUNN et al., 2008). O que causa essa modificação é uma mutação no sistema de dois componentes que é composto pelas proteínas PmrA, PmrB, PhoP e PhoQ. Esse sistema permite a sobrevivência da bactéria e está associado à virulência e à resistência antimicrobiana. Geralmente esse sistema é ativado quando a bactéria é fagocitada por macrófagos, quando ocorre modificações no pH ou alteração na concentração de magnésio (GUNN, 2008).

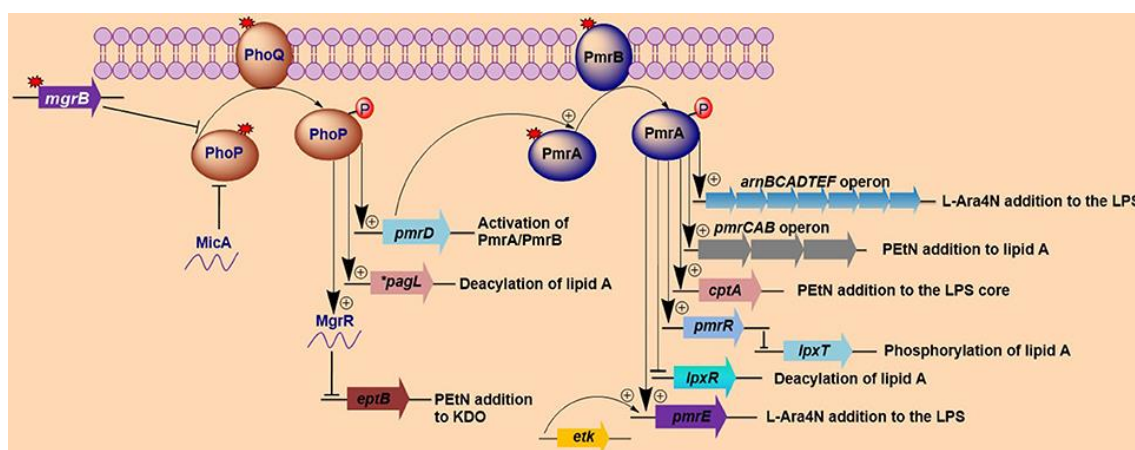
A figura 6 ilustra diferentes genes que codificam as proteínas do sistema de dois componentes (PhoP, PhoQ, PmrA e PmrB). A proteína PmrB possui atividade de tirosina-quinase e ativa PmrA por fosforilação. PmrA ativa genes que estão envolvidos na modificação do lipídeo A no LPS (POIREL et al., 2017; SCHUREK et al., 2009). Dados da literatura demonstram que mutações pontuais no gene PmrB estão associadas a resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* (CANNATELLI et al., 2014; JAYOL et al., 2014).

Por sua vez, PhoQ também é proteína com atividade de tirosina-quinase que ativa PhoP por fosforilação. Esse processo também promove a transcrição do operon envolvido na adição de L-Ara4N no LPS. PhoP pode ativar a proteína PmrA

diretamente ou via proteína PmrD (SCHUREK et al., 2009). Jayol et al. (2014) descreveram que a deleção parcial no gene PhoP leva a uma proteína mais longa e inativa, o que também pode causar a resistência às polimixinas. A regulação dessas proteínas é feita por proteínas transmembrana *mgrB* e *crrA/crrB* (*colistin resistance regulation*) que modulam esse processo.

O regulador negativo de PhoP/PhoQ é a proteína transmembrana com 47 aminoácidos denominada *mgrB* que quando está ativado inibe o processo de modificação do LPS. Portanto, inativação do gene *mgrB* causa a hiperexpressão de PhoPQ, o que modifica o LPS e promove resistência às polimixinas (OLAITAN et al., 2014).

Figura 6 – Representação esquemática dos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB que regulam a produção do LPS bacteriano.



Fonte: Olaitan et al., 2014.

Mutações variadas no gene *mgrB* como inserções e deleções de pequenas sequências de aminoácidos ou substituições de aminoácidos que levam a proteína alterada podem ser responsáveis pela resistência adquirida às polimixinas. No Brasil, estudo de Aires et al. (2016) reporta mutações no gene *mgrB* como principal mecanismo de resistência de *K. pneumoniae* frente às polimixinas.

Outras duas proteínas regulam o sistema PmrA/PmrB: *crrA* e *crrB* que são codificadas pelo operon *crrAB*. A inativação de *crrB* também leva a expressão de PmrAB e a modificação do lipídeo A (CHENG et al., 2016).

Outro regulador intrínseco encontrado em *K. pneumoniae*, RamA, também pode reduzir a sensibilidade aos antimicrobianos e também é capaz de modificar o LPS e induzir a resistência às polimixinas (DE MAJUMDAR et al., 2015).

A resistência as polimixinas pode estar associada também a presença do gene *mcr-1* e suas variantes. Esse gene foi encontrado inicialmente em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* na China (LIU et al., 2016) e pode ser transmitido por plasmídeos. A proteína codificada por esse gene é uma fosfoetanolamina transferase que modifica o LPS bacteriano inativando a ação das polimixinas (HINCHLIFFE et al., 2017).

A disseminação do gene *mcr-1* tem sido descrita na Europa, Ásia, África, América do Norte e América do Sul, incluindo no Brasil. Diversos plasmídeos parecem estar envolvidos, tais como: IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI e IncFIB (FERNANDES et al., 2016; LINDSEY et al., 2017; MATAMOROS et al., 2017). Estudos reportam *mcr-1* em *E. coli* isolada de animais desde a década de 1980 na China, o que sugere que a pressão seletiva do uso de antibióticos na prática veterinária pode ter colaborado para a seleção desse mecanismo (HU et al., 2016; POIREL, JAYOL e NORDMANN, 2017; SHEN et al., 2016).

Atualmente novas variantes têm sido descritas (*mcr-2* a *mcr-9*) na China e Europa em *E. coli* e *Salmonella* spp. (BOROWIAK et al., 2017; CARATOLI et al., 2017; XAVIER et al., 2016; YIN et al., 2017). A variante mais recente, *mcr-9* altera outro Sistema de dois componentes denominado *qseC/qseB* presente em *E. coli* que interage com PmrB e também promove aumento da CIM para polimixinas (BRELAND et al., 2017; KIEFFER et al., 2019)

2.3.1 Detecção laboratorial de resistência de *K. pneumoniae* às polimixinas

Para investigar a susceptibilidade aos antibióticos podem ser utilizadas as técnicas de disco difusão, fitas impregnadas com antimicrobianos - E-test® (bioMérieux, Durham, NC), microdiluição em caldo e métodos automatizados (CLSI, 2017).

A técnica mais antiga para avaliar susceptibilidade antibiótica é a de disco difusão que consiste na difusão do antibiótico contido em disco frente ao crescimento de uma bactéria semeada em ágar Muller Hinton. A zona de inibição do crescimento é mensurada e comparada com *guidelines* internacionais, tais como *Clinical and Laboratory Standards Institute* e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility*

Testing (BRCAST, 2017; CLSI, 2017). Apesar da fácil execução e do baixo custo, alguns antibióticos como as polimixinas não se difundem bem no ágar gerando resultados errôneos. Falsa sensibilidade para polimixinas frente a bacilos Gram negativos não fermentadores tem sido descrita, com resultados um pouco melhores quando utilizada polimixina E (PEREZ et al., 2007). Atualmente o CLSI e o BrCast não recomendam essa metodologia para determinar a sensibilidade a esses antibióticos, devido à grande quantidade de *very major errors* ou falsa sensibilidade (BRCAST, 2017; CLSI, 2017; DAFOPOULOU et al., 2015).

Devido aos problemas de avaliação com o disco difusão, a susceptibilidade às polimixinas deve ser avaliada pelo método de microdiluição em caldo (BRCAST, 2017; CLSI, 2017). Essa metodologia determina a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento da bactéria (CIM).

Apesar de não ser indicada pelos guidelines internacionais, metodologia com fitas impregnadas de concentrações variadas de antibiótico (E-test®) ainda é bastante utilizada. Um inóculo bacteriano é semeado em Ágar Muller Hinton e a fita de E-test® é colocada sobre o inóculo para leitura da inibição do crescimento ser observada após 16 a 24 horas (CIM). Embora alguns estudos (MAALEJ et al., 2011; PEREZ, 2015) expressem boa correlação comparando esse método aos resultados da microdiluição em caldo, pesquisas realizadas com bactérias resistentes demonstram elevados índices de resultados discordantes, inclusive com alta taxa de *very major errors* que pode variar de 12% a 53% (CHEW et al., 2017; HINDLER e HUMPHRIES, 2013).

As técnicas automatizadas, apesar de muito utilizadas, não detectam subpopulações heterorresistentes e demonstram baixa sensibilidade quando comparado à microdiluição (TAN et al., 2007).

A técnica de microdiluição em caldo consiste em testar uma suspensão bacteriana frente a várias concentrações de antibiótico em meio líquido contido numa microplaca que no caso de polimixinas é o caldo Muller Hinton Cátion Ajustado (CLSI, 2017). Embora a técnica seja laboriosa e possa ter resultados não reprodutíveis, CLSI e BrCast continuam recomendando a microdiluição em caldo como método padrão-ouro, pois determina melhor a CIM para polimixinas. Entretanto, faz-se importante lembrar que bactérias com subpopulações heterorresistentes podem causar fenômeno de *skipe well* (pular poço) e confundir a leitura dos resultados (SCHUREK et al., 2009).

Dados da literatura sugerem que a microdiluição em caldo com adição de polissorbato 80 poderia minimizar a adesão do antibiótico aos poços das placas de polipropileno usadas na microdiluição (HINDLER et al., 2013). Contudo o polissorbato 80 também exibe efeito sinérgico com a polimixina e altera os resultados diminuindo a CIM de 2 a 3 diluições (BROWN e WINSLEY, 1968). Placas compostas de poliestireno têm sido utilizadas comercialmente para diminuir esses efeitos.

A técnica pode utilizar o sulfato de polimixina B ou polimixina E, devido à alta similaridade das moléculas e a sua equivalência nos testes “in vitro”. Estudo realizado com *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*, obteve *Categorical agrément* - CA>99% comparando resultados de microdiluição dos dois com diferença de no máximo uma diluição nos resultados (SADER et al., 2015).

Além da metodologia empregada para avaliar a susceptibilidade da bactéria ao antimicrobiano, outros fatores como composição do meio de cultura, tratamento das placas e subjetividade dos critérios interpretativos podem influenciar nos resultados (HINDLER et al., 2013).

2.3.2 Epidemiologia molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi o início de uma verdadeira revolução para as doenças infecciosas. Com o aprimoramento dessa técnica foi possível identificar melhor os micro-organismos e investigar genes envolvidos na resistência bacteriana aos antimicrobianos, investigar epidemias e surtos, além de avaliar a disseminação de clones bacterianos no mundo. Esse método de amplificação criado por Kary Mullis em 1983 trouxe enormes benefícios para a área da saúde possibilitando o sequenciamento genético, a análise da expressão gênica e melhor diagnóstico de doenças (MULLIS et al., 1986).

Com o passar dos anos, metodologias de tipagem molecular envolvendo análise de fragmentos de DNA, puderam esclarecer relações de ancestralidade entre grupos bacterianos com técnicas de ribotipagem, *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e mais recentemente o *Multilocus sequence typing* -MLST. A técnica de ribotipagem utiliza a hibridação com sondas moleculares. Após extração e purificação do DNA, é feito digestão do material com enzima de restrição seguida de corrida eletroforética que separa os fragmentos desnaturados. Esses fragmentos são

hibridizados com uma sonda marcada e o padrão de bandas é revelado (DARINI, MAGALHÃES E CROTT, 1998; GRIMONT e GRIMONT, 1986).

A análise de fragmentação de DNA por meio da técnica de PFGE envolve lise e digestão do material genético em gel de agarose e posterior eletroforese em campo pulsado para separar as bandas (TENOVER et al., 1995). Apesar de reprodutível e ter bom poder discriminatório, necessita de laboratorista experiente, tempo e possui um alto custo para o laboratório. Uma limitação dessa técnica é a dificuldade de comparação dos resultados entre laboratórios ou estudos a longo prazo (CDC <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>).

A técnica de MLST consiste em um sistema altamente discriminatório, que não só permite a comparação de resultados em diferentes laboratórios, mas também possibilita a criação de um banco de dados mundial para analisar a filogenia bacteriana (JOLLEY, CHAN e MAIDEN, 2004). Os isolados de *K. pneumoniae* são definidos pela análise dos alelos de sete loci gênicos. Cada alelo recebe um número e a combinação desses números geram uma sequência, denominada *sequence type* - ST (membros de um mesmo clone). Aqueles que compartilham de mais de cinco alelos idênticos são agrupados em um complexo clonal (FEIL et al., 2004; MAIDEN et al., 1998; PÉREZ-LOSADA et al., 2006).

Dentre as *K. pneumoniae*, o complexo clonal 258 (ou complexo clonal 11) é o mais prevalente no mundo e está relacionado com a disseminação de genes de resistência. Vários ST's pertencem a esse grupo, tais como: ST11, ST44, ST48, ST258, ST327, ST340 e ST437 (BOWERS et al., 2015; NICOLETTI et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

A rápida disseminação do gene *bla*_{KPC} é atribuída a expansão de *K. pneumoniae* do ST258 (BOWERS et al., 2015; MUNOZ-PRICE e QUINN, 2013). No Brasil o ST258 é o mais disseminado com os subtipos: KpA, KpA1, KpA1', KpA2, KpA4, e KpA4'. Os *sequence types* ST11, ST340, ST258 e ST437 são os mais prevalentes (ANDRADE et al., 2011; BRAUN et al., 2017; PEREIRA et al., 2013). Estudo realizado em rios urbanos do estado de São Paulo descreveu a presença de *K. pneumoniae* ST340 e ST437 alertando para a transmissão ambiental de micro-organismos multirresistentes (OLIVEIRA et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e polimixinas e conhecer a diversidade genética de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em amostras clínicas de unidades de terapia intensiva de três grandes hospitais do Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar genes que codificam β -lactamases envolvidas com a resistência aos carbapenêmicos no Estado;
- Determinar a susceptibilidade de *K. pneumoniae* frente a tigeciclina, fosfomicina e polimixinas de modo a sugerir possíveis alternativas de tratamento.
- Identificar mecanismos de resistência em *K. pneumoniae* resistentes a polimixina.
- Identificar se existe relação clonal entre as amostras de *Klebsiella pneumoniae* nos hospitais estudados.

4 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v.146, n.3713, p.837, 1940.
- ABRAR, S.; AIN, N. U.; LIAQAT, H.; HUSSAIN, S. et al. Distribution of bla CTX- M, bla TEM, bla SHV and bla OXA genes in Extended-spectrum- β -lactamase-producing Clinical isolates: A three-year multi-center study from Lahore, Pakistan. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v.8, n.1, p.80, 2019.
- AIRES, C. A.; PEREIRA, P. S.; DE ARAUJO, C. F. et al. Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, n.4, p.e01048-16, 2017.
- AIRES, C.A.M.; PEREIRA, P. S.; ASENSI, M. D. et al. MgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.11, p.6969-6972, 2016.
- ALVES, A.P.; BEHAR, P.R. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v.57, n.3, p.213-8, 2013.
- AMBLER, R.P.; COULSON, A.F.; FRERE, J.M. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, v.276, n.1, p.269, 1991.
- ANDRADE, L.N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J.C. et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7, p.3579-3583, 2011.
- BAUERNFEIND, A.; SCHWEIGHART, S.; GRIMM, H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v.18, n.5, p.294-298, 1990.
- BELL, J.M.; CHITSAZ, M.; TURNIDGE, J. D. et al. Prevalence and significance of a negative extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p.1478-1482, 2007.
- BERGEN, P.J.; LI, J.; RAYNER, C. R.; NATION, R. L. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.6, p.1953-1958, 2006.
- BIBERG, C.A.; RODRIGUES, A.C.S.; CARMO, S.F.D. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.2, p.501-504, 2015.

BORBA, C.M.D.A.; OLIVEIRA, V.M.D.; AREND, L.N. et al. Validation of inhibition test by aminophenyl boronic acid to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) screening. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.48, n.6, p.427-433, 2012.

BOROWIAK, M.; HAMMERL, J. A.; FISCHER, J. et al. Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Paratyphi B Sequence Type 28 Harboring mcr-1. **Genome Announcements**, v.5, n.37, p.e00991-17, 2017.

BOWERS, J.R.; KITCHEL, B.; DRIEBE, E.M. et al. Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic. **PLoS One**, v.10, n.7, p.e0133727, 2015.

BrCAST, Comitê Brasileiro de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em 01 mar. 2017.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRADFORD, P.A.; BRATU, S.; URBAN, C. al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, n.1, p.55-60, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes. (Nota Técnica nº 01 ANVISA, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>. Acesso em: 14/02/2018.

BRAUN, G.; CAYO, R.; MATOS, A.P. et al. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.51, n.3, p.522-7, 2017.

BRELAND, E.J.; ZHANG, E.W.; BERMUDEZ, T. et al. The histidine residue of QseC is required for canonical signaling between QseB and PmrB in uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.199, n.18, p.e00060-17, 2017.

BROWN, M.R.; WINSLEY, B.E. Synergistic action of polysorbate 80 and polymyxin B sulphate on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of General Microbiology**, v.50, n.3, p.Supp: ix, 1968.

BRUST, K.; EVANS, A.; PLEMMONS, R. Tigecycline in treatment of multidrug-resistant Gram-negative bacillus urinary tract infections: a systematic **review**. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, n.10, p.2606-2610, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.

CAMPANA, E.H.; BARBOSA, P.P.; FEHLBERG, L.C. et al. Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian Teaching Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.2, p.477-480, 2013.

CAMPOS, C.C.; RORIZ, N. F.; ESPÍNOLA, C.N. et al. KPC: an important mechanism of resistance in *K. pneumoniae* isolates from intensive care units in the Midwest region of Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n.08, p. 646-651, 2017.

CAMPOS, M.A.; VARGAS, M.A.; REGUEIRO, V. et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, 2004.

CANNATELLI, A.; D'ANDREA, M.M.; GIANI, T. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5521-5526, 2013.

CANNATELLI, A.; GIANI, T.; D'ANDREA, M. M. et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.10, p.5696-5703, 2014.

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**, v.22, n.31, p.18, 2017.

CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; NICOLETTI, A.G. et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.2, p.249-251, 2009.

CARVALHO, A.P. D.A.; ALBANO, R. M.; OLIVEIRA, D.N D. et al. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.12, n.2, p.103-108, 2006.

CARVALHO-ASSEF, A.P.D.A.; PEREIRA, P.S.; ALBANO, R.M. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.12, p.2956-2957, 2013.

CARVALHO-ASSEF, A.P.D.A.; PEREIRA, P.S.; ALBANO, R. M. et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.4, p.2475-2476, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) - *PulseNet Methods & Protocols*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>. Acesso em: 29/07/2018.

CHA, M.K.; KANG, C. I.; KIM, S. H. et al. In vitro activities of 21 antimicrobial agents alone and in combination with aminoglycosides or fluoroquinolones against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.9, p.5834-5837, 2015.

CHAGAS, T.P.G.; SEKI, L.M.; CURY, J.C. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, n.3, p.572-581, 2011.

CHANG, M.R.; BIBERG, C.A.; LOPES, F.A.; TETILA, A.F. et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla kpc gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.1, p.114-115, 2013.

CHARFI, K.; GRAMI, R.; JEDDOU, A.B. et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates from neonates in Tunisia. **Microbial Pathogenesis**, v.110, p.184-188, 2017.

CHENG, Y.H.; LIN, T.L.; LIN, Y.T. et al. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3709-3716, 2016.

CHEW, K.L.; LA, M.V.; LIN, R.T. et al. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v.55, n.9, p.2609-2616, 2017.

CHUNG, K.P.; TSENG, S.P.; HUANG, Y.T. et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-2 in Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.5, p.1182-1184, 2011.

CLEGG, S.; MURPHY, C.N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.1, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 23th information supplement. M100-S27. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

CURY, A.P.; ANDREAZZI, D.; MAFFUCCI, M. et al. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Clinics**, v.67, n.12, p.1427-1431, 2012.

DAFOPOULOU, K.; ZARKOTOU, O.; DIMITROULIA, E. et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.8, p.4625-4630, 2015.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3403-3406, 2003.

DARINI, A.L.C.; MAGALHÃES, V.D.; CROTT, L.S.P. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina**, v.31, n.1, p.73-80, 1998.

DE MAJUMDAR, S.; YU, J.; FOOKES, M. et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. **PLoS Pathogens**, v.11, n.1, p.e1004627, 2015.

DE MORAES BRUNA, C.Q.; DE SOUZA, R.Q.; MASSAIA, I. F. S. et al. O impacto do uso de diferentes tipos de luvas e das mãos nuas no preparo do instrumental cirúrgico limpo. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.24, p.1-7, 2016.

EUROPEAN MEDICAL AGENCY (EMA). Disabling and potentially permanent side effects lead to suspension or restrictions of quinolone and fluoroquinolone antibiotics. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/news/disabling-potentially-permanent-side-effects-lead-suspension-restrictions-quinolone-fluoroquinolone>. Acesso em: 28/11/2018.

EVANS, B.A.; AMYES, S.G.B. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, n.2, p.241-263, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). FDA updates warnings for fluoroquinolone antibiotics. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-updates-warnings-fluoroquinolone-antibiotics-risks-mental-health-and-low-blood-sugar-adverse>. Acesso em: 08/07/2016.

FEIL, E.J.; LI, B.C.; AANENSEN, D.M. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.5, p.1518-1530, 2004.

FEHLBERG, L.C.; CARVALHO, A.M.; CAMPANA, E.H. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.16, n.6, p.577-580, 2012.

FERNANDES, M.R.; MOURA, Q.; SARTORI, L. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. **Eurosurveillance**, v.21, n.17, p.30214, 2016.

FERREIRA, R.L.; DA SILVA, B.C.M.; REZENDE, G.S. et al. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -

Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.3198, 2019.

FLORES, C.; ROMÃO, C.M.C.; BIANCO, K. et al. Detection of antimicrobial resistance genes in beta-lactamase-and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.52, n.5, p.284-292, 2016.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.9, p.2070-2074, 2011.

GARREC, H.; DRIEUX-ROUZET, L.; GOLMARD, J.L. et al. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.3, p.1048-1057, 2011.

GIRARDELLO, R.; GALES, AC. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.2, n.2, p.66-69, 2012.

GISKE, C.G. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. **Clinical Microbiology and Infection**, v.21, n.10, p 899-905, 2015.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie**, v.137B, p. 165-175, 1986.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.D.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

GUNN, J.S. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. **Trends in Microbiology**, v.16, n.6, p.284-290, 2008.

HASHEMI, ALI A.; FALLAH, F.; ERFANIMANESH, S. et al. Detection of β -lactamases and outer membrane porins among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Iran. **Scientifica**, v.2014, Article ID 726179, 6 pages, 2014.

HINCHLIFFE, P.; YANG, Q. E.; PORTAL, E. et al. Insights into the mechanistic basis of plasmid-mediated colistin resistance from crystal structures of the catalytic domain of MCR-1. **Scientific Reports**, v.7, p.39392, 2017.

HINDLER, J.A.; HUMPHRIES, R.M. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.6, p.1678-1684, 2013.

HORAN T.C.; ANDRUS M.; DUDECK M.A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **American Journal Infectious Control**, v. 6, n.5, p.309-32, 2008

HU, Y.; LIU, F.; LIN, I. Y. et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.146-147, 2016.

JACOBY, G.A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.1, p.161-182, 2009.

JANDA, J.C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C. et al. The Genus *Klebsiella*: An Ever-Expanding Panorama of Infections, Disease-Associated Syndromes, and Problems for Clinical Microbiologist. **Clinical Microbiology & Case Report**, v.1, n.1, p.2-7, 2015.

JAYOL, A.; POIREL, L.; BRINK, A. et al. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.8, p.4762-4766, 2014.

JEYAKUMARI, D.; NAGAJOTHI, S.; KUMAR, P. et al. Bacterial colonization of stethoscope used in the tertiary care teaching hospital: a potential source of nosocomial infection. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v.5, n.1, p.142-145, 2016.

JOLLEY, K.A.; CHAN, M.; MAIDEN, M.C.J. MlstdbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. **BMC Bioinformatics**, v.5, n.1, p.86, 2004.

JU, L.C.; CHENG, Z.; FAST, W. et al. The continuing challenge of metallo- β -lactamase inhibition: Mechanism matters. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.39, n.7, p.635-647, 2018.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, n.3, p.216-224, 2005.

KIEFFER, N.; ROYER, G.; DECOUSSER, J.W. et al. Mcr-9, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.1, p.AAC-00965-19, 2019.

KLIEBE, C.C.; NIES, B.A.; MEYER, J.F. et al. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.28, n.2, p.302-307, 1985.

LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, K.S. et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.895, 2016.

LIAO, C.H.; HUANG, Y.T.; LAI, C.C. et al. Klebsiella pneumoniae bacteremia and capsular serotypes, Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.6, p.1113, 2011.

LINDSEY, R. L.; BATRA, D.; ROWE, L. et al. High-Quality Genome Sequence of an *Escherichia coli* O157 Strain Carrying an mcr-1 Resistance Gene Isolated from a Patient in the United States. **Genome Announcements**, v.5, n.11, p.e01725-16, 2017.

LIU, Y.Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.161-168, 2016.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v.14, n.9, p.413-420, 2006.

MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.6, p.3140-3145, 1998.

MAALEJ, S.M.; MEZIOU, M.R.; RHIMI, F.M. et al. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, n.5, p.546-551, 2011.

MARTINS, W.M.; NICOLETTI, A.G.; SANTOS, S.R. et al. Frequency of BKC-1-producing Klebsiella species isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.8, p.5044-5046, 2016.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M. et al. How are gene sequences analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.261-268, 2004.

MARCHANT, J. When antibiotics turn toxic. News Feature. **Nature**, v. 555, n. 7697, p.431-433, 2018.

MATAMOROS, S.; HATTEM, J. M.; ARCILLA, M.S. et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.15364, 2017.

MATHERS, A.J.; COX, H. L.; KITCHEL, B. et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **MBio**, v.2, n.6, p.e00204-11, 2011.

MATTHEW, M.; HEDGES, R.W.; SMITH, J.T. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.138, n.3, p.657-662, 1979.

- MEDEIROS, A.A. β -Lactamases. **British Medical Bulletin**, v.40, n.1, p.18-27, 1984.
- MICHALOPOULOS, A.S.; KARATZA, D.C. Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.8, n.9, p.1009-1017, 2010.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1, p.333-334, 2009.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 263-273, 1986.
- MUNOZ-PRICE, L.S.; POIREL, L.; BONOMO, R. A. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v.13, n.9, p.785-796, 2013.
- NICOLETTI, A. G.; FEHLBERG, L. C.; PICÃO, R. C. et al. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.8, p.4563-4564, 2012.
- NICOLETTI, A.G.; MARCONDES, M.F.; MARTINS, W.M. et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.9, p.5159-5164, 2015.
- NI, W.; HAN, Y.; LIU, J. et al. Tigecycline treatment for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: a systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v.95, n.11, 2016.
- NOGUEIRA, K.D.S.; CONTE, D.; MAIA, F.V. et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.2, p.162-169, 2015.
- NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.5, p.411-412, 2012.
- NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Infections Due to NDM-1 Producers. **Emerging Infectious Diseases**, p. 273-293, 2014.
- OLAITAN, A.O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.643, 2014.
- OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C. et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, n.3, p.849-852, 2014.

- PADILLA, E.; LLOBET, E.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A. et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.1, p.177-183, 2010.
- PAN, Y.J.; LIN, T.L.; CHEN, Y.H. et al. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by wzc sequencing. **PloS One**, v.8, n.12, p.e80670, 2013.
- PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; VAL PASSOS, V.L. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.2, p.265-268, 2009.
- PEREIRA, P.S.; DE ARAUJO, C.F.M.; SEKI, L. M. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.2, p.312-316, 2013.
- PEREIRA, M.R.; SCULLY, B.F.; POUCH, S. M. et al. Risk factors and outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in liver transplant recipients. **Liver Transplantation**, v.21, n.12, p.1511-1519, 2015.
- PEREZ, F.; HUJER, A.M.; HUJER, K.M. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.10, p.3471-3484, 2007.
- PEREZ, L.R.R. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system. **Journal of Pathology Microbiology and Immunology**, v.123, n.11, p.951-954, 2015.
- PÉREZ-LOSADA, M.; BROWNE, E.B.; MADSEN, A. et al. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. **Infection, Genetics and Evolution**, v.6, n.2, p.97-112, 2006.
- PILONETTO, M.; AREND, L.; VESPERO, E.C. et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.12, p.7592-7594, 2014.
- PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.1, p.1-11, 2002.
- POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.30, n.2, p.557-596, 2017.
- QUILES, M. G.; ROCCHETTI, T.T.; FEHLBERG, L.C. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.48, n.2, p.174-177, 2015.
- RAZA, W.; YANG, W.; SHEN, Q. R. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. **Journal of Plant Pathology**, p.419-430, 2008.

REINATO, L.A.F.; PEREIRA, F.M.V.; LOPES, L.P. et al. Nasal colonization in nursing professionals from units specialized in HIV/AIDS. **Revista Brasileira de enfermagem**, v.68, n.2, p.320-324, 2015.

RIBEIRO, V. B.; ANDRADE, L. N.; LINHARES, A. R. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 1721-1727, 2013.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; CURY, A. P. et al. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 98-101, 2017.

ROZALES, F. P.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C.M. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79-81, 2014.

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; FLAMM, R.K. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.78, n.4, p.443-448, 2014.

SADER, H.S.; RHOMBERG, P.R.; FARRELL, D.J. et al. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n.4, p.379-381, 2015.

SAMPAIO, J.L.; RIBEIRO, V.B.; CAMPOS, J.C. et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3566-3567, 2014.

SEIBERT, G.; HÖRNER, R.; MENEGHETTI, B.H. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SEKI, L.M.; PEREIRA, P.S.; CONCEIÇÃO, M.D.S. et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 640-646, 2013.

SHEN, Z.; WANG, Y.; SHEN, Y. et al. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 293, 2016.

SHENG, W.H.; BADAL, R.E.; HSEUH, P.R. Distribution of Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), AmpC β -lactamases, and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal infections in Asia-Pacific: the

Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 00971-12, 2013.

SHI, H.H.; SUN, F.; CHEN, J. et al. Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial-*Escherichia coli* infection in China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p.4, 2015.

SCHUREK, K.N.; SAMPAIO, J.L.; KIFFER, C.R. et al. Involvement of pmrAB and phoPQ in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p.4345-4351, 2009.

SIMÕES, A.S.; COUTO, I.; TOSCANO, C. et al. Prevention and control of antimicrobial resistant healthcare-associated infections: the microbiology laboratory rocks!. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.855, 2016.

SMITH MOLAND, E.; HANSON, N.D.; HERRERA, V.L. et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.3, p.711-714, 2003.

STEINMANN, J.; KAASE, M.; GATERMANN, S. et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. **Eurosurveillance**, v.16, n.33, p.19944, 2011.

SONG, K. H.; JEON, J. H.; PARK, W.B. et al. Clinical outcomes of spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: a retrospective matched case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v.9, n.1, p.41, 2009.

SOULI, M.; GALANI, I.; BOUKOVALAS, S. et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.5, p.2395-2397, 2011.

SOUZA, S.C.; DA SILVA, D.F.; BELEI, R.A. et al. Fatores associados à mortalidade de pacientes com enterobactéria resistente aos carbapenêmicos. **Medicina**, v. 49, n. 2, p. 109-115, 2016.

TAHERPOUR, A.; HASHEMI, A. Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. **Hippokratia**, v.17, n.4, p.355, 2013.

TAN, T.Y.; NG, S.Y. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, n.5, p. 541-544, 2007.

THENMOZHI, S.; MOORTHY, K.; SURESHKUMAR, B. T. et al. Antibiotic resistance mechanism of ESBL producing Enterobacteriaceae in clinical field: a review. **International Journal of Pure Applied Bioscience**, v.2, n.3, p.207-26, 2014.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R.V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.9, p.2233, 1995.

TIJET, N.; BOYD, D.; PATEL, S.N. et al. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.9, p.4578-4580, 2013.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5^a. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

TSAI, Y.K.; FUNG, C.P.; LIN, J.C.; CHEN, J.H.; CHANG, F.Y.; CHEN, T.L. et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.4, p.1485-1493, 2011.

TSANG, K.; SPEICHER, D.; MCARTHUR, A. Pathogen Taxonomy Updates at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database: Implications for Molecular Epidemiology. **Preprints**, 2019, 2019070222.

VAN DER ZWALUW, K.; DE HAAN, A.; PLUISTER, G.N. et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. **PLoS One**, v.10, n.3, p.e0123690, 2015.

VAN DUIN, D.; BONOMO, R.A. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: second-generation β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. **Clinical Infectious Diseases**, v.63, n.2, p.234-241, 2016.

VISALLI, M.A.; MURPHY, E.; PROJAN, S.J. et al. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.2, p.665-669, 2003.

XAVIER, B.B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Eurosurveillance**, v.21, n.27, 2016.

WIEGAND, I.; GEISS, H.K.; MACK, D. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1167-1174, 2007.

WOODFORD, N.; TIerno, P. M.; YOUNG, K. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4793-4799, 2004.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.1151-1161, 2001.

YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. **MBio**, v.8, n.3, p. e00543-17, 2017.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.12, p.5046-5054, 2009.

YU, W.; ZHOU, K.; GUO, L. et al. In vitro pharmacokinetics /pharmacodynamics evaluation of fosfomycin combined with amikacin or colistin against KPC2-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.246, 2017.

ZARKOTOU, O.; POURNARAS, S.; TSELIOTI, P.; DRAGOUMANOS, V.; PITIRIGA, V.; RANELLOU, K., et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 12, p. 1798-1803, 2011.

CAPÍTULO I

(Artigo I publicado na revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”, vol 114 Epub 20 de maio de 2019) <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180555>

ORIGINAL ARTICLE

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 114: e180555, 2019 1 | 6

Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil

Ana Claudia Souza Rodrigues^{1,2}, Ivson Cassiano de Oliveira Santos³,
Caroline Conci Campos⁴, Isadora Nascimento Rezende⁴, Yanara Miranda Ferreira⁴,
Claudia Elisabeth Volpe Chaves⁵, Cláudio Marcos Rocha-de-Souza³,
Ana Paula D’Alincourt Carvalho-Assef³, Marilene Rodrigues Chang^{1,4/+}

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil

²Universidade Anhanguera Uniderp, Faculdade de Medicina, Campo Grande, MS, Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Campo Grande, MS, Brasil

⁵Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

BACKGROUND Polymyxins are currently used as a “last-line” treatment for multidrug-resistant Gram-negative infections.

OBJECTIVES To identify the major mechanisms of resistance to polymyxin and compare the genetic similarity between multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains recovered from inpatients of public hospitals in the Mid-West of Brazil.

METHODS 97 carbapenems non-susceptible *K. pneumoniae* were studied. β -lactamases (*bla*_{OXA-48}⁺, *bla*_{KPC}⁺, *bla*_{NDM}⁺, *bla*_{CTX-M}⁺, *bla*_{SHV}⁺, *bla*_{TEM}⁺, *bla*_{IMP}⁺, *bla*_{VIM}⁺) and *mcr*-1 to *mcr*-5 genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR). Mutations in chromosomal genes (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, and *mgrB*) were screened by PCR and DNA sequencing. Clonal relatedness was established by using pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing.

FINDINGS *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*_{KPC} (93.3%), *bla*_{SHV} (86.6%), *bla*_{TEM} (80.0%), *bla*_{CTX-M} (60%) genes. Of 15 *K. pneumoniae* resistant to polymyxin B the authors identified deleterious mutations in *pmrB* gene, mainly in T157P. None *K. pneumoniae* presented *mcr* gene variants. Genetic polymorphism analyses revealed 12 different pulsotypes.

MAIN CONCLUSIONS Deleterious mutations in *pmrB* gene is the main chromosomal target for induction of polymyxin resistance in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in public hospitals in the Mid-West of Brazil.

Key words: colistin - polymyxins - multidrug resistance

The emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) and the increased use of polymyxin B to treat infections caused by these microorganisms may have contributed to the spread of polymyxin-resistant *K. pneumoniae* isolates (PRKP).^(1,2,3) The polymyxin resistance is most commonly associated with the modification of the lipopolysaccharide (LPS) following the addition of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A. Modifications of Ara4N are regulated by two component systems: PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB and MgrB regulator. Mutations in genes involved in the production of these systems may result in lower antibiotic fixation.⁽⁴⁾ Previous studies reported that disruption of *mcrB* gene is one of the major mechanisms of polymyxin resistance in *K. pneumoniae*.^(2,5,6)

Recently, *mcr-1* gene and its variants (*mcr-1* to *mcr-8* genes) was described conferring resistance to polymyx-

in in *Enterobacteriaceae* isolated from humans, animals and environmental samples worldwide, including Brazil.^(7,8,9) The global dissemination of these genes may be a signal of a new era of pandrug resistant bacteria.⁽¹⁰⁾

To date, there is no information about the mechanisms of polymyxin resistance in Gram negative bacilli in Mato Grosso do Sul state. The aims of this study were to investigate the mechanisms of resistance to polymyxin and to evaluate the genetic diversity in carbapenem and polymyxin-resistant *K. pneumoniae* strains recovered from patients admitted in intensive care units of public hospitals in the Mid-West of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and susceptibility tests - A total of 97 carbapenem non-susceptible *K. pneumoniae* isolated from patients admitted in intensive care units of three tertiary hospitals in Mato Grosso do Sul, Brazil (Hospital A, 592 beds; Hospital B, 271 beds and Hospital C, 352 beds) between 2013 and 2014 were included in this study. The identification and antimicrobial susceptibility testing were performed by Vitek 2 compact System (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). The minimum inhibitory concentration (MIC) of tigecycline was determined by using E-test® strips (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) applied in Mueller-Hinton agar (Oxoid, England) according to the manufacturer's instructions.

doi: 10.1590/0074-02760180555

Financial support: CAPES, CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ-RJ, UFMS.

+ Corresponding author: marirchang@yahoo.com.br

https://orcid.org/0000-0003-3402-4740

Received 27 November 2018

Accepted 29 April 2019



online | memorias.ioc.fiocruz.br

The polymyxin B MICs were performed by broth microdilution test according the CLSI.⁽¹¹⁾ *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control. BrCast⁽¹²⁾ breakpoints were used for interpretation of tigecycline (Susceptible $\leq$ 1 mg/L, Resistant $>$ 2 mg/L) and polymyxin MIC results (Susceptible $\leq$ 2 mg/L, Resistant $>$ 2 mg/L).⁽¹²⁾ Multidrug-resistance (MDR) was defined as non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories. Extensively drug-resistant (XDR) was defined as susceptible to only one or two categories in all.⁽¹³⁾

Screening for genes of resistance - Resistant genes $bla_{OXA-48\text{-like}}$, bla_{KPC} , bla_{NDM} were investigate by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and bla_{CTX-M} , bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{IMP} , bla_{VIM} by simple PCR using primers as previously described.^(14,15,16,17) The plasmid-mediated polymyxin resistance gene, *mcr-1* to *mcr-5*, was determined by multiplex PCR using primers as previously described.⁽⁷⁾

Mutations in chromosomal genes (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, and *mgrB*) were screened by PCR and DNA sequencing.^(18,19) DNA was extracted from fresh bacterial colonies using an AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep kit (Axygen Scientific, Union city, CA, USA). The amplification products were purified using DNA Illustra GFX 96 kit (GE Healthcare Life Sciences, UK Ltd., Buckinghamshire, UK) and sequenced using the 3730 DNA analyser (Applied Biosystems, CA, USA). Data were analysed using Geneious (6.1.8) software (Auckland, New Zealand) and BLASTN (NCBI) tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). The PROVEAN platform was used to predict alterations in biological functions of proteins using *K. pneumoniae* MGH 78578 (CP00647.1) as reference.

Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) - Clonal relatedness among PRKp isolates was established using *XbaI* - PFGE (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). DNA fragments were separated with a CHEF DR III apparatus (Bio-Rad; Richmond, CA - USA) and analysed by BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).⁽²⁰⁾

MLST was performed to subtype PRKp by amplification and sequenced of seven housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*).⁽²¹⁾ The allelic profiles and sequence types (ST) were screened as determined by the Institute Pasteur *Klebsiella* MLST database (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Ethics - This study was approved by the Plataforma Brasil Research Ethics Committee.

RESULTS

Of the 97 carbapenem non-susceptible *K. pneumoniae* isolates studied, 15 (15.5%) were resistant to polymyxin B (MIC $>$ 2 mg/L) and nine of them had MIC $\geq$ 8 mg/L. The PRKp isolates were recovered from culture of ten urines (66.7%), two blood (13.3%), two scar tissue (13.3%) and one tracheal aspirate (6.7%).

Antimicrobial susceptibility test showed that seven PRKp were XDR. The lower resistance antibiotics were amikacin (6.7%), tigecycline (26.7%) and fosfomycin

(33.3%). All PRKp were resistant to carbapenems (including 13.3% with MIC $\leq$ 8 μ g/mL) and cephalosporins. Screening resistance gene showed that PRKp isolates harbored bla_{SHV} (86.6%), bla_{TEM} (80.0%), and bla_{CTX-M} (60%). Thirteen *K. pneumoniae* isolates contained three or more resistance genes and fourteen (93.3%) PRKp isolates carried the bla_{KPC} gene. The bla_{OXA48} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} and *mcr* genes variants were not detected.

Ten PRKp isolates presented the same amino acid substitution from threonine to proline at position 157 (T157P) in *PmrB* protein and four of these contained another mutation (R256G) that is considered deleterious by PROVEAN software. Two PRKp isolates (A38 and S378) presented others non-neutral mutation (H58N, A66E, V67D, A66E, P272H, G318A) in *PmrB*. No mutations in the *pmrA* gene nor in the *PhoP/PhoQ* System were observed. *K. pneumoniae* isolates exhibited non-neutral mutation in *mgrB* gene: A38B isolate with L19K mutation and S7 isolate with eight non-neutral mutation (V1G, K3V, L4P, W6S, V7D, L9K, I10N, V11K), including two insertions sequences. No mutation was associated with stop codon.

Genetic polymorphism analyses of PRKp revealed 12 different pulsotypes (A to L) by PFGE method with similarity below 85%. MLST analysis showed 11 ST among these isolates. ST 11 (belonging to CC258) was present in four PRKp isolates of all hospitals studied and ST13 in three PRKp, from two hospitals (A and C). The antimicrobial susceptibility profiles, resistance genes determinants and clonal patterns are shown in Table.

DISCUSSION

Infections caused by multidrug-resistant *K. pneumoniae* are currently a concern in public health. Polymyxins are often the last line of therapeutic options for the treatment. Consequently, a high mortality rate has been observed, especially in intensive therapy units.⁽²²⁾

It is well documented in the literature that the levels of resistance to antibiotics may vary according to the hospital characteristics and distinct geographic areas. In our study, PRKp isolates showed low resistance to tigecycline, fosfomycin, and amikacin suggesting these antibiotics would be successful as treatments in infections caused by carbapenem and polymyxin-resistant *K. pneumoniae*.

The results of this study show different mechanisms of antimicrobial resistance, including non-neutral mutations in *pmrB* gene (A66E, P272H, G318A, H58N, V67D) not previously associated to polymyxin resistance in *K. pneumoniae*.

Similar to previous Brazilian studies,^(1,2,23) we also observed a high rate KPC-producing *K. pneumoniae* and described high genetic diversity among the isolates.

Almost 50% of *K. pneumoniae* studied was considered *K. pneumoniae* XDR. The high resistance to β -lactams observed (Table) may be related to the presence of genes as bla_{SHV} , bla_{TEM} and bla_{CTX-M} , mainly bla_{KPC} .

Recent Brazilian studies carried out in the Southeast region of Brazil demonstrate a temporal increase of resistance to polymyxin since 2009, ranging from 0 to 30.6%.^(2,3,24) In our study, we documented that 15.5% of *K. pneumoniae* isolated between 2013 and 2014 were resistant to polymyxin, in the Brazilian Mid-West hos-

TABLE
Polymyxin B minimum inhibitory concentrations (MICs) and molecular profile of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKp) isolates in Mid-West region of Brazil

Isolate	Clinical specimen	Hospital	Resistance	Polymyxin B MIC (µg/mL)	Modification in protein					β-lactamases	PFGE	ST
					MgrB	PmrA	PmrB	PhoP	PhoQ			
S7	Urine	A	MDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, ERT, IMP, MPM, PPT, TIG, SUT	32	VIG* insertion G in 4 and 5, K2R/D, K3V(*), L4P(*), R5K(-), W6S(*), V7D(*), L9K(*), insertion C in 29 and 30, I10N(*), V11K(*), I12P(-)	WT	WT	WT	WT	KPC, CTX-M, SHV, TEM	G	11
S87	Scar tissue	A	MDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, ERT, IMP, MPM, PPT, TIG	32	I12V(-), T40A(-)	WT	T157P (*), R256G (*)	WT	WT	KPC, CTX-M, SHV, TEM	C	1298
S275	Blood	A	XDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, FOSF, ERT, IMP, MPM, PPT, SUT	64	WT	WT	T157P (*)	R34K	WT	KPC, CTX-M, SHV, TEM	H	2687
S336	Scar tissue	A	MDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, ERT, IMP, MPM, PPT, SUT	4	WT	WT	T157P (*) M175V (-), T246 A	WT	WT	KPC, CTX-M, TEM	J	13
S371	Urine	A	MDR: AMP, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, PPT, ERT, IMP, MPM	16	WT	WT	T157P (*), A228T (-), Q232E (-), I242V (-), N244S (-), E272Q (-), Q356R (-), T8N (-), N105S (-)	R34K	R69K, O92K, A106T E112D I139V, L163F, V196I, T372S H410Y O424L O482L O487E	KPC, SHV, TEM	B	1075
S378	Urine	A	MDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, ERT, IMP, MPM, SUT	8	WT	WT	H58N (*), A66E (*), V67D(*), A2G(-), T8N(-), M86V (-), N105S (-)	WT	WT	KPC, CTX-M, SHV, TEM	A	449
S400	Urine	A	XDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, ERT, FOSF, IMP, MPM, PPT, SUT	16	WT	WT	T157P (*)	WT	WT	KPC, CTX-M, SHV, TEM	M	70
S419	Urine	A#	XDR: AMI, AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, GEN, ERT, IMP, MPM, PPT, TIG, SUT	16	WT	WT	T157P (*), M175V (-), T246A (-)	WT	WT	CTX-M, SHV, TEM	J	13
R86	Urine	C	MDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, ERT, IMP, MPM, PPT, SUT	4	WT	WT	T157P (*)	WT	WT	KPC	L	13
R98	Urine	C	XDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, FOSF, GEN, ERT, IMP, MPM, PPT, SUT	4	WT	WT	T157P (*)	WT	WT	KPC, SHV	G	11
A38	Blood	B	XDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, FOSF, GEN, ERT, IMP, MPM, PPT, SUT	8	V1L/M, L19K*	WT	A66E (*), P272H (*), G318A(*), A21P(-), L28V (-), Q41E (-), A47V(-), H61L (-), T247A (-), A290S (-), E605D (-), V327I (-)	WT	WT	KPC, TEM, SHV	E	273



Isolate	Clinical specimen	Hospital	Resistance	Polymyxin B MIC (µg/mL)	Modification in protein						
					MgrB	PmrA	PmrB	PhoP	PhoQ	β-lactamases	ST
A40	Tracheal aspirate	B	MDR: AMP, ATM, CMP, CAZ, CRO, CFZ, CIP, IMP, MPM, PPT, SUT	16	WT	WT	T157P (*)	WT	WT	KPC, SHV, TEM	D 2084
A58	Urine	B	XDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, ERT, FOSE, IPM, MPM, PPT, SUT	4	WT	WT	T246A (-), R256G (*)	L12M	WT	KPC, CTX-M, SHV	I 11
A61	Urine	B	XDR: AMP, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, GEN, ERT, IMP, PPT, TIG, SUT	4	WT	WT	T157P (*), R256G (*)	WT	M34R	KPC, TEM, SHV	F 323
A70	Urine	B	MDR: AMP, ATM, CMP, CFO, CAZ, CRO, CFZ, CIP, ERT, IMP, MPM, PPT, SUT	4	WT	WT	T157P (*), R256G (*)	WT	WT	KPC, CTX-M, SHV, TEM	I 11

MDR: multidrug-resistant; XDR: extensively drug-resistant; WT: wild type; AMI: amikacin; AMP: ampicillin; ATM: aztreonam; CMP: cefepime; CFO: cefotaxime; CAZ: ceftazidime; CRO: ceftazidime; CFZ: cefazolin; CIP: ciprofloxacin; ERT: ertapenem; FOSE: fosfomicin; GEN: gentamicin; IMP: imipenem; MPM: meropenem; PPT: piperacillin/tazobactam; TIG: tigecycline; SUT: trimethoprim/sulfamethoxazole; PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; MLST: multilocus sequence type; ST: sequence type; (*): mutation predicted as deleterious by PROVEAN; (-): mutation predicted as neutral by PROVEAN.

pitals. This is the first description of resistance to polymyxin in this region.

The genetic analysis demonstrates that in these hospitals the resistance to polymyxin are from chromosomal origin because none *K. pneumoniae* presented *mcr* gene variants.

Although previous studies report that alterations in the *mcrB* gene is the main mechanisms of polymyxin resistance in Brazil and worldwide,^(2,5,6,25,26) in our study, only two PRKp presented deleterious mutations in this gene. Aires et al.⁽⁶⁾ reported disruption in *mcrB* gene by IS903B, IS5, IS102, ISKpn26 (IS5 family), and IS10L (IS4 family) in different regions of Brazil, including two *K. pneumoniae* from the Mid-West region (Distrito Federal).

Different from what was expected the majority of PRKp isolates studied carried alterations in *pmrB* gene, mainly in T157P. To be best of our knowledge, this kind of alteration has not been described in Brazil prior to this study. Jayol et al.⁽¹⁹⁾ showed this point mutation in the *pmrB* gene (T157P) leads to an upregulation to *pmrCAB* and *pmrHFIJKLM* operons conferring resistance to polymyxins in *K. pneumoniae* isolates from South-Africa, Colombia and Turkey.⁽¹⁹⁾

In our study, we identified four PRKp with non-neutral mutation (R256G) on PmrB protein as also described by Aires et al.⁽⁶⁾ in the Southeast region of Brazil.⁽⁶⁾ Pitt et al.⁽²⁶⁾ detected R256G in polymyxin-susceptible and in polymyxin-resistant *K. pneumoniae*, suggesting that this mutation is not determinant for polymyxin resistance. The same authors related simultaneous alterations in *pmrB* (P158R, T140P) and in *mcrB* genes with increases the MIC values.

In the hospitals studied, no relationship was observed between MIC values and mutations in *pmrB* genes. However, in *K. pneumoniae* with mutations in *mcrB* gene we observed high level polymyxin-resistant (MIC = 32 µg/mL), as also described by Aires et al.⁽⁶⁾

The most prevalent mechanism of resistance to polymyxin observed in the Mid-West region is due to mutation in the *pmrB* gene, different from that observed (mutation in the *mcrB* gene) in other Brazilian states.^(1,2,6) Antimicrobial pressures may be responsible for the evolution of different mutation profiles observed between different geographic regions.

Our study reveals high clonal diversity among PRKp isolates including nine different ST's (ST13, ST70, ST273, ST449, ST323, ST2084, ST1075, ST1298, ST2687) that were not associated to polymyxin resistance previously. ST11 (CC258) was the most prevalent sequence type, followed by ST13. ST11 clone has been detected worldwide as the main international high-risk clones of *K. pneumoniae* associated with outbreaks and dissemination of carbapenemases and polymyxin resistance.^(1,2,4,6,27) Braun et al.⁽²⁾ described ST258 and ST437 (both belonging to 258 clonal complex) as the main sequence types in PRKp isolated from São Paulo, Brazil.

The emergence and evolution of complex 258 in KPC-*K. pneumoniae* is carried by mobile transposable elements. Pereira et al.⁽¹⁾ described the clonal diversity in Brazil with prevalence of ST11 and ST340 in Northeast region, ST437 in South and Southeast regions and ST11 in Mid-West.

Our results suggest that PRKp isolates belonging to ST11 and ST13 clones are adapted in Mid-West region and highlights the emergence of new ST in PRKp (ST70, ST273, ST449, ST323, ST2084, ST1075, ST1298, ST2687). Complementation assays should be done later to elucidate the role of these STs and polymyxin resistance.

In conclusion - Our results show that many *K. pneumoniae* not susceptible to carbapenem isolated in Brazilian Mid-West Hospitals are considered MDR and XDR, but still show low resistance to tigecycline, fosfomycin and amikacin. The high resistance to β -lactams observed may be related to the presence of genes as bla_{SHV} , bla_{TEM} and bla_{CTX-M} , mainly bla_{KPC} .

The resistance to polymyxin are from chromosomal origin because none *K. pneumoniae* presented *mcr* gene variants. The main mechanism of resistance to polymyxin in *K. pneumoniae* in the hospitals studied is due to a mutation in the *pmrB* gene.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the team of the Microbiology laboratories of the Hospitals for providing the *Klebsiella pneumoniae* studied.

AUTHORS' CONTRIBUTION

APDC-A and MRC conceived and designed the study and review the results and the manuscript; CCC, INR and YMF were responsible for samples collection, strain isolation and identification, ACSR and ICOS conducted the experiments of PFGE, antimicrobial assays and PCR; ICOS sequenced the genome; MRC, CEVC and CMR-de-S contributed for the manuscript writing.

REFERENCES

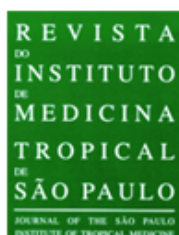
- Pereira PS, De Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(2): 312-16.
- Braun G, Cayo R, Matos AP, Fonseca JM, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 51(3): 522-27.
- Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida Jr JN, Duarte AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis.* 2017; 21(1): 98-101.
- Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microb Rev.* 2017; 30(2): 557-96.
- Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mcrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 70(1): 75-80.
- Aires CA, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. *McrB* Mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal Surveillance Swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(11): 6969-72.
- Rebello AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 2018; 23(6). doi: doi.org/10.2807/1560-7917.
- Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 122.
- Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *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): 6415-17.
- Srijan A, Margulieux KR, Ruekit S, Snedrud E, Maybank R, Serichantalergs O, et al. Genomic characterization of nonclonal *mcr-1* positive multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from clinical samples in Thailand. *Microb Drug Resist.* 2018; 24(4): 403-10.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 22th informational supplement (M100-S27) 2017. Wayne: CLSI; 2017.
- BrCast. Comitê brasileiro de avaliação de suscetibilidade antimicrobiana 2017. Available from: brcast.org.br/documentos/.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(3): 268-81.
- Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Ahmed R. Characterization of the first extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 460-2.
- Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamases (ES-BL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 115-21.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(4): 906-9.
- Senda K, Arakawa Y, Ichihama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo- β -lactamases gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(12): 2909-13.
- Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mcrB* regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(11): 5521-6.
- Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4762-6.
- Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3(1): 59-67.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multi-locus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 4178-82.
- Richter SE, Miller L, Usulan DZ, Bell D, Watson K, Humphries R, et al. Risk factors for colistin resistance among gram-negative rods and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(9): 149-218.
- Biberg CA, Rodrigues AC, do Carmo SF, Chaves CE, Gales AC, Chang MR. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Mid-West region of Brazil. *Braz J Microbiol.* 2015; 46(2): 501-4.

24. Bartolleti F, Seco BM, Dos Santos CC, Felipe CB, Lemo MEB, Alves TS, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(10): 1849-51.
25. Huichuan Z, Dongdong Z, Qiucheng S, Jingjing Q, Xi L, Yunsong Y. The *mcr-1* gene has no effect on colistin resistance when it coexists with inactivated *mgrb* gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Res*. 2018; 24(8): 1117-20.
26. Pitt ME, Elliott AG, Cao MD, Ganesamoorthy D, Karaiskos I, Giamarellou H, et al. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Genom*. 2018; 4(3): 158. doi.org/10.1099/mgen.0.000158.
27. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(7): 2530-5.

CAPÍTULO II

(Artigo II aceito por “Revista do Instituto de Medicina Tropical em processo de publicação)

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo



Post-Neurosurgical meningitis caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: report of two cases

Journal:	<i>Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo</i>
Manuscript ID	RIMTSP-2019-0097.R1
Manuscript Type:	Case Report
Keyword:	Klebsiella pneumoniae, Carbapenem-resistant, Beta-lactamases, Cerebrospinal fluid, Meningitis

SCHOLARONE™
Manuscripts

ABSTRACT

Nosocomial bacterial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) is associated with high mortality in neurosurgical patients. There are few reports in the literature on meningitis caused by CRKP. We report two cases of CRKP meningitis after neurosurgery. The *K. pneumoniae* identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using the Vitek Compact System. Minimum inhibitory concentrations of polymyxin B were determined using the broth microdilution method. Molecular type of *K. pneumoniae* isolates was investigated using multilocus sequence typing. Antimicrobial susceptibility testing showed that the *K. pneumoniae* isolates were multidrug resistant and co-produced extended-spectrum β -lactamases and KPC enzymes. The patients were treated with intrathecal polymyxin. Genetic polymorphism analyses revealed two different *K. pneumoniae* clones (ST1298 and ST2687), which were observed for the first time in CRKP infections. We recommend intravenous antibiotics with intrathecal polymyxin for treating meningitis caused by multidrug-resistant *K. pneumoniae*.

Keywords: Meningitis, *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenem-resistant, Beta-lactamases, Cerebrospinal fluid

INTRODUCTION

Meningitis includes several infections defined as inflammation of the meninges; it may be caused by various infectious agents, including bacteria, viruses, parasites, fungi, and non-infectious processes. Although viral meningitis is the commonest, bacterial meningitis may be more serious and is potentially life-threatening¹.

In recent years, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) has become endemic and is one of the biggest public health concerns globally^{2,3}. However, there are few reports in the literature on meningitis caused by CRKP^{4,5}. We report two cases of post-neurosurgical nosocomial meningitis due to CRKP that were successfully treated with polymyxin.

METHODS

Clinical data were obtained from medical records. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using the Vitek 2 Compact System® (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). The polymyxin B minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the reference Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution method⁶. Genes encoding for extended-spectrum β -lactamases (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}), carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}), and metallo- β -lactamases (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}) were determined using polymerase chain reaction as described previously⁷⁻⁹. The molecular types by multilocus sequence typing (MLST)¹⁰.

CASE REPORTS

Case 1: A 17-year-old man from Campo Grande–MS, Brazil was admitted to the emergency room after a car accident. On admission, the patient was sedated and intubated and had a heart rate of 90 beats/min, respiratory rate of 17 breaths/min, arterial blood pressure of 160/90 mmHg, Glasgow Coma Scale (GCS) score of 3/15, and APACHE index of 17. At admission, skull computed tomography (CT) revealed cerebral edema with post-traumatic hydrocephalus, frontal lobe contusion, and subarachnoid hemorrhage (grade IV on the Fisher scale).

An external ventricular shunt was inserted. The patient developed anisocoria and miotic pupils. Besides diffuse edema noted on new CT, decompressive craniotomy was necessary. He also underwent various invasive procedures during hospitalization, including tracheostomy, central venous catheterization, urinary catheterization, enteral nutrition, and mechanical ventilation.

On postoperative day 3, the patient developed septic shock, probably from skin and fascial breast foci. Cerebrospinal fluid (CSF) examination revealed no abnormalities (Table 1). However, head CT revealed opacification of the left maxillary and ethmoidal sinuses. Intravenous (IV) meropenem, 1 g/8 hours was administered. Clinical improvement with the level of consciousness was noted (GCS 8).

On hospitalization day 11, his level of consciousness deteriorated (GCS score decreased to 3/15); he presented with hyperthermia (38.8°C), arterial hypertension (153/90 mmHg), and leukocytosis (leukocytes 39600/mm³, with 84% segmented and 4% rods). New CSF analysis showed lymphocytic pleocytosis that was culture positive. *K. pneumonia* and was resistant to most antibiotics tested, including all β -lactams and gentamicin. However, it was susceptible to amikacin, ciprofloxacin, and polymyxin (MIC=0.25).

Analysis of β -lactamase genes revealed the presence of *bla*-TEM, *bla*-SHV, and *bla*-KPC genes. The isolate was sequence type 1298.

Because of his clinical condition and decreasing consciousness level, IV polymyxin E 150 mg/12 hours was added to his treatment for 19 days. Meropenem was maintained following CSF culture results, with the dose increased to 2 g/8 hours. Despite improved CSF parameters, intrathecal polymyxin E (5 mg/day for 3 days and then alternate days to complete 7 days of treatment) was introduced. The patient was discharged 37 days after admission with a GCS score of 15 and no CSF abnormalities (Table 1).

Case 2: A 50-year-old woman from São Gabriel do Oeste-MS presented with severe traumatic brain injury and loss of consciousness after a fall from her own height. The Emergency Mobile Care Service classified the patient as having a severe condition with cephalic contusion of 3 cm, GCS score of 7/15, anisocoric pupils, normotensive blood pressure (110/70 mmHg), and normal cardiopulmonary auscultation. She had a history of mental disorders due to cerebral palsy, arterial hypertension, and diabetes mellitus.

The patient was transferred to a tertiary hospital in Campo Grande-MS. On admission, she was sedated and intubated after first aid. She had a GCS score of 4/15, isochoric pupils, lack of motor response, hypotension, heart rate of 130 beats/min, and normal respiration. Cranial CT showed subarachnoid hemorrhage with left frontal hematoma, cerebral edema, and intracranial hypertension. She was classified as grade 4 on the Fisher scale for subarachnoid hemorrhage and underwent external ventricular derivation surgery.

On hospitalization day 4, patient developed a pneumonia. Chest radiograph showed opacity in the lower right lung lobe. Intravenous piperacillin/tazobactam 0.5 g+4 g/6 hours and IV linezolid 600 mg/12 hours were administered for 7 and 10 days respectively, to treat nosocomial pneumonia.

After hospitalization day 16, fever developed (38.8°C). Because her clinical condition worsened, IV polymyxin E 150 mg/12 hours for 7 days and IV meropenem 1 g/8 hours for 9 days were initiated.

Intrathecal polymyxin E (5 mg/day for 3 days, followed by its use on alternate days to complete 14 days of treatment) was administered because fever and GCS score of 3/15 persisted. This medication was introduced based on CSF results on the 18th day (Table 2). CSF analysis showed pleocytosis with neutrophil predominance, and *K. pneumoniae* grew on culturing. Antimicrobial susceptibility testing showed sensitivity to amikacin, gentamicin, and polymyxin B (MIC=0.5 µg/mL) and resistance to all β-lactam antibiotics. *K. pneumoniae* harbored *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{KPC} genes. The strain belonged to clone ST 2687 in MLST. Due to good clinical and laboratory results, after hospitalization day 46, the patient was transferred to a hospital in São Gabriel do Oeste-MS; we do not have further information about her.

DISCUSSION

Nosocomial bacterial meningitis, especially carbapenem-resistant intracranial bacterial infections, are life-threatening complications in neurosurgical patients^{11,12}.

The most frequent causative agents of health-care-associated meningitis are *Staphylococcus* spp. and multidrug-resistant and extensively drug-resistant gram-negative bacteria, including *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *K. pneumoniae*¹³.

K. pneumoniae causes several nosocomial infections. The commonest sites of CRKP infection are the respiratory system, urinary tract, and bloodstream. CRKP is infrequently isolated from CSF samples^{4,5,14}.

Meningitis caused by CRKP post-neurosurgery has been reported in many countries, including Turkey¹⁵, USA⁵, and China¹⁶. In Brazil, Tuon *et al.*¹⁷ described for the first time nosocomial KPC-producing *K. pneumoniae* meningitis in the South region. To our knowledge, these are the first CRKP meningitis cases described in the Mid-West of Brazil.

Invasive procedures, including mechanical ventilation and central venous catheterization, are associated with acquiring multi-resistant bacteria. Surgery is a risk factor for CRKP infections¹⁶. Infections after head trauma, similar to our cases, followed by neurosurgical procedure and gram-negative meningitis/ventriculitis, have been reported¹¹.

Diagnosis of meningitis can be difficult. CSF cultures are the most important test to diagnose healthcare-associated ventriculitis and meningitis¹³. Although bacteriological CSF cultures from Case 1 on day 11 indicated CRKP and CSF parameters were consistent with those of meningitis, lymphocytosis was initially present. Lymphocytosis may be occurred as a component of acute bacterial meningitis mainly in neonatal and pediatric patients^{18,19}.

The emergence of CRKP infections is a rising public health threat associated with extremely high morbidity and mortality rates that demand caution with antibiotic use^{12,16}.

In our two cases, we observed *K. pneumoniae* isolates co-producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and KPC enzymes. ESBLs of TEM, SHV, and CTX-M types are very common in *Klebsiella* spp⁹. ESBL-producing *K. pneumoniae* may be more

invasive and resistant and the distribution of these bacteria varies according to geographical areas²⁰.

ESBL-producing *K. pneumoniae* may vary according to geographical areas. CRKP is already endemic in many countries, including Brazil. This mechanism confers a high resistance to β -lactams, including carbapenems^{3,20}. A study conducted in Mato Grosso do Sul State reported a high rate (93.3%) of CRKP in that region²¹.

Genetic polymorphism analyses of the two *K. pneumoniae* isolates we examined revealed two different clones: ST1298 and ST2687. In Brazil, sequence types ST11, ST437, and ST340 are more frequently reported among *K. pneumoniae* isolates, while ST258 are the most frequently associated with KPC enzyme production in Europe and the USA²². Here, we report for the first time ST1298 and ST2687 involvement in meningitis caused by CRKP.

Treatments for central nervous system infections are more limited than those for bloodstream and pulmonary infections. There are limited data on optimal dosing and brain barrier penetration of most agents administered for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections^{6,23}.

CRKP infections are treated with combination therapies, including polymyxin or tigecycline with carbapenems, aminoglycosides, fluoroquinolones, or fosfomycin²². A high carbapenem MIC (MIC $\geq 8\mu\text{g/mL}$) predicts a lower response to the antibiotic²³.

The relatively new antimicrobial ceftazidime-avibactam (approved in 2014 by the U.S. Food and Drug Administration) has been successfully used for treating CRKP meningitis. The drug is less toxic and can inhibit KPC-2 carbapenemase and group C β -lactamases⁵. Ceftazidime-avibactam has great potential as treatment because of its direct action on the carbapenem resistance mechanism. However, this option was not available for the report cases.

Although intravenous polymyxins poorly penetrate the CSF and their high pharmacokinetic variability, the combination of intravenous polymyxin E and intrathecal polymyxin showed satisfactory responses with resolution of meningitis²³.

We report two rare cases of meningitis caused by CRKP that were satisfactorily treated with intravenous polymyxin and intrathecal polymyxin, despite the associated high mortality reported in literature.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

Funding information

This work received no specific grant from any funding agency.

Ethical approval

This study was approved by the ethics committee (CAAE - 50087815.2.0000.0021)

For Review Only

REFERENCES:

1. Hasbun R, Rosenthal N, Balada-Llasat JM, Chung J, Duff S, Bozzette S, et al. Epidemiology of meningitis and encephalitis in the United States, 2011–2014. *Clin Infect Dis*. 2017; 65: 359-363.
2. Pereira PS, de Araujo, CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*. 2012; 68: 312-316.
3. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*. 2015; 277 : 501-512.
4. Almeida SM, Nogueira KS, Palmeiro JK, Scheffer MC, Stier CJ, França JC, et al. Nosocomial meningitis caused by *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase, with initial cerebrospinal fluid minimal inflammatory response. *Arq Neuropsiquiat*. 2014; 72: 398-399.
5. Holyk A, Belden V, Lee JJ, Musick W, Keul R, Britz GW, et al. Ceftazidime/avibactam use for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* meningitis: a case report. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 73: 254-256.
6. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 22th informational supplement (M100-S27). Clinical and Laboratory Standards. Institute. 2017; 33: 29-55.
7. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 906-9.
8. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 2909-13.
9. De oliveira CF, Dal forno NL, Alves IA, Horta JA, Rieger A, Alves SH. Prevalence of the TEM, SHV and CTX-M families of extended-spectrum [beta]-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp at the University Hospital of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42:5.

10. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43: 4178-82.
11. Khan SA, Wagas M, Siddiqui UT, Shamim MS, Nathani KR, Jooma R, et al. Intrathecal and intraventricular antibiotics for postoperative Gram-negative meningitis and ventriculitis. Surg Neurol Int. 2017; 8:226.
12. Selin BO, Oguz RS. An updated approach to healthcare-associated meningitis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014; 12: 333-342.
13. Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, Byers K, Kaplan SL, Scheld W. M. et al 2017 Infectious Diseases Society of America's clinical practice guidelines for healthcare-associated ventriculitis and meningitis. Clin infect dis. 2017; 64: e34-e65.
14. Yang KC, Shrestha T, Kolakshyapati M, Shi LF, Wang Z, Li M, et al. Occult community acquired *Klebsiella pneumoniae* purulent meningitis in an adult: A case report. Med. 2018; 97: e11017.
15. Mermer S, Aydemir S, Ozgiray E, Sipahi OR. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* meningitis: a case report. J Chemother. 2016; 28: 454-455.
16. Chen Y, Liu L. The treatment of nosocomial meningitis and brain abscess by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Br J Neurosurg. 2019; 1: 1-3.
17. Tuon FF, Rocha JL, Arend LN, Wallbach K, Zanin HA, Pilonetto M. Treatment and outcome of nine cases of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* meningitis. J Infect. 2013; 67: 161-164.
18. Akturk H, Sutcu M, Somer A, Aydın D, Cihan R, Ozdemir A, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. Braz J Infect Dis. 2016; 20: 134-140.
19. Powers WJ. Cerebrospinal fluid lymphocytosis in acute bacterial meningitis. Am J Med. 1985; 79: 216-220.
20. Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, Forestier C, Fussing V, Hansen DS, et al. Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 3477-3482.
21. Campos CC, Roriz NF, Espínola CN, Lopes FA, Tieppo C, Tetila AF, et al. KPC: an important mechanism of resistance in *K. pneumoniae* isolates from

- intensive care units in the Midwest region of Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2017; 11: 646-651.
22. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016; 7: 895.
23. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daiko GL, Forrest A, et al. 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; 39: 10-39.

CAPÍTULO III

(Manuscrito I a ser submetido à revista *Infection Control & Hospital Epidemiology*).

Molecular epidemiology and resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from public hospitals in Midwest of Brazil

Running title - Resistance mechanisms in *K. pneumoniae*

Ana Claudia Souza Rodrigues PhD^{1,2}; Ivson Cassiano de Oliveira Santos MS³; Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef PhD³, Marilene Rodrigues Chang PhD^{1,4*}

1. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste.

Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

2. Faculdade de Medicina, Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande, MS, Brazil

3. Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

4. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

***Corresponding author:**

Marilene Rodrigues Chang. Campo Grande – MS.

Orcid number: 0000-0003-3402-4740

Tel.: +55-67 3345-7641. E-mail address: marirchang@yahoo.com.br

Word count: 1580

Abstract

Objective: This study was conducted to determine the molecular epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from three public hospitals in midwestern Brazil.

Design: Quantitative descriptive study.

Methods: Molecular investigation of *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} resistance genes was performed in 99 *K. pneumonia* isolates from patients in the intensive care unit. Antimicrobial susceptibility was determined with a Vitek 2 System, except for polymyxin B, which was evaluated by the microbroth dilution test. Clonal relatedness was established by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing.

Results: A lower percentage of resistance was observed against amikacin (5.1%), polymyxin (18.2%), tigecycline (20.2%), and fosfomycin (30.5%). Screening resistance genes showed that *Klebsiella* isolates carried the *bla*_{KPC} (88.9%) and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes *bla*_{SHV} (73.5%), *bla*_{TEM} (72.2%), and *bla*_{CTX-M} (43.9%). The most frequent sequence types were: ST273, ST11, ST 1298, ST13, ST2687, and ST37. The sequence types ST304, ST309, ST401, ST406, ST779, and ST2751 in multidrug-resistant *K. pneumoniae* have not been detected previously in Brazil.

Conclusions: *Klebsiella pneumoniae* belonging to the same clone is present in different hospitals in the same region. Transfer of *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{CTX-M} has contributed to the high rate of carbapenem resistance observed in multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates.

Introduction

The emergence of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-KP), mainly in patients in intensive care units, is a global concern. The transmissibility and limited therapeutic options for treating these infections make difficult to control this multiresistant pathogen.¹ In Brazil, *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) is the most predominant carbapenemase in Enterobacteriaceae.¹ The rapid spread of *K. pneumoniae* KPC-producing (KP-KPC) worldwide is attributed to expansion of dominant clone CC258 or CC11, particularly ST258 and ST11.² Previous studies showed that specific plasmids are successfully spreading and harbor resistance among *K. pneumoniae* strains in Brazilian hospitals.¹ Determining the resistance genotypes can reduce delays in administering adequate therapy and may decrease the high mortality of infectious KP-KPC.²

The aim of this study was to determine the molecular epidemiology and resistance mechanisms of KPC-producing *K. pneumoniae* recovered from three public hospitals in the midwestern region of Brazil, which have not been widely examined.

Methods

Human subject protection

This study was approved by the ethics committee of Federal University of Mato Grosso do Sul (CAAE - 50087815.2.0000.0021).

Bacterial identification and susceptibility test

In this study, 99 non-duplicate isolates of CR-KP were obtained between March 2013 and March 2014 from patients in intensive care units (ICU) at three Brazilian public hospitals: Hospital A; Hospital B, and Hospital C of Mato Grosso do Sul state which have 592, 352, and 271 beds, respectively.

The *Klebsiella pneumoniae* identification and antimicrobial susceptibility test were performed with a Vitek 2 System (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). Additional antimicrobial susceptibility tests to determine the minimal inhibitory concentrations (MICs) of polymyxin B were performed by the broth microdilution technique using polymyxin B sulfate (Eurofarma, São Paulo, Brazil) and interpreted according BrCast guidelines.³ *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control strains. Although BrCast has approved the disk diffusion method for fosfomycin only for *Escherichia coli* recovered from the urinary tract, we used the same interpretation for all strains (resistance to fosfomycin when the inhibition zone diameter ≤ 24 mm).

Multidrug-resistant (MDR) was defined as non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories, whereas extensively drug-resistant (XDR) was defined as non-susceptibility to at least one agent in all but two or fewer antimicrobial categories.⁴ The agents used to define these categories were aminoglycosides (amikacin, gentamicin), piperacillin-tazobactam, carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem), cephalosporins (cefazolin, ceftriaxone, cefepime), cephamycin (cefoxitin), fluoroquinolones (ciprofloxacin), glycyclines (tigecycline), phosphonic acids (fosfomycin), and polymyxin B.

Molecular investigation

Klebsiella pneumoniae isolates were screened by polymerase chain reaction (PCR) for the following β -lactamase genes: *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{TEM} using previously described primers.⁵⁻⁷

The clonal relationship between *K. pneumoniae* isolates was investigated by pulsed-field gel electrophoresis using the *Xba*I restriction endonuclease (Promega, Madison, WI, USA) in the CHEF-DR III apparatus from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) and analyzed with BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).⁸ Multilocus sequence typing was performed to subtype CR-KP by amplification and sequencing of seven housekeeping genes including *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*.⁹ The allelic profiles and sequence types (STs) were determined using the Institute Pasteur *Klebsiella* MLST database (<http://bigsdh.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Results

The 99 CR-KP samples were obtained from the urine (42.4%), tracheal aspirates (22.2%), blood (16.2%), catheter tips (7.1%), surgical wound exudates (8.1%), and other (4.0%) clinical specimens. Antimicrobial susceptibility tests showed high rates (>85%) of resistance to β -lactams, quinolones, and gentamicin antibiotics. Twelve (12.1%) *K. pneumoniae* were considered as XDR and 87 (87.9%) were MDR. Seventy-six (76.8%) isolates were resistant to all carbapenems. A lower percentage of resistance was observed against amikacin (5.1%), polymyxin (18.2%), tigecycline (20.2%), and fosfomycin (30.5%).

Screening for antimicrobial resistance genes showed that 88.9% of CR-KP isolates carried *bla*_{KPC} but *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} were not detected. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes were detected in most isolates: *bla*_{SHV} (73.5%),

*bla*_{TEM} (72.2%), and *bla*_{CTX-M} (43.9%). Fifty-four (54.5%) CR-KP isolates contained these three ESBL genes.

Discussion

In ICUs, CR-KP is a major infectious agent in the urinary tract, lower respiratory tract, bloodstream, and surgical wound infection.^{1,10} In addition to the high resistance to carbapenemic antibiotics, *K. pneumoniae* recovered from patients in ICUs were resistant to most antibiotics recommended for treatment. Similar to the results of a previous study¹¹ tigecycline, fosfomycin and polymyxin were among the drugs showing lower resistance and may be considered therapeutic options for treating infections caused by MDR *K. pneumoniae*.

Although *K. pneumoniae* shows good sensitivity to tigecycline, the emergence of tigecycline resistance in *bla*_{KPC-2} has been reported.¹² The profile of antibiotic resistance varies by region and even between hospitals in the same city. Thus, determining the resistance profile of different hospitals is essential for guiding therapeutic choices. A study conducted to evaluate *K. pneumoniae* in different regions of Brazil¹³ reported resistance rates of 38.1% to tigecycline and 5.3% to fosfomycin. This is the first description of resistance to these antibiotics in Mato Grosso do Sul state. Therefore, these results should improve the understanding of antimicrobial resistance of *K. pneumoniae* in Brazil.

According Perez et al. (2016), tigecycline and fosfomycin combined with other antimicrobial agents are effective for treating infections caused by KPC- and OXA-48-producing *K. pneumoniae*.¹¹ Polymyxin is a “last-line” treatment for MDR Gram-negative infections. Increased polymyxin resistance rates have been observed in recent years in Brazil.¹⁴ We found that 18.2% of CR-KP cases were polymyxin B-resistant. We previously reported the mechanisms of resistance to polymyxin in these samples.¹⁵

KPC-producing *K. pneumoniae* is prevalent in North America, Greece, Italy, Taiwan, Colombia, China, Argentina, and Brazil.² Our data show that KPC production is the main mechanism of resistance in *K. pneumoniae* isolated in ICUs in public hospitals in Mato Grosso do Sul state.

The high rates of resistance to β -lactams and others antimicrobial classes is likely related to the concomitant presence of different resistance mechanisms.

Studies with the multilocus sequence typing show that ST258 and ST11 sequences types are the globally prevalent clones in *K. pneumoniae*.^{2,16} These sequences types belong to clonal complex CC258, which has spread rapidly worldwide. In Brazil, ST11, ST258, ST340, and ST437 are the most frequent patterns reported in KPC-2-producing *K. pneumoniae*.^{13, 16} Interestingly, in our study, most CR-KP isolates were characterized as ST273, ST11, and ST1298, whereas ST340 and ST437 were not detected.

Unlike that observed in Asia^{17,18}, in our study ST273 was not related in *K. pneumoniae* carrying *bla*_{-NDM}. However, we detected one colistin-resistant *K. pneumoniae* ST273 as previously described in Italy.¹⁹

In our study, CR-KP of ST273 harbored *bla*_{-SHV} and *bla*_{-TEM} (100%), *bla*_{-KPC} (91.7%), and *bla*_{-CTX-M} (36.4%). Most CR-KP isolates belonging to ST273 showed sensitivity to tigecycline, fosfomycin, and polymyxin B. One strain was polymyxin-resistant (MIC = 8 μ g/mL), whereas no resistance to tigecycline or amikacin was recorded.

ST11, the most prevalent sequence type in this study, is among the most frequently described sequence types in Brazil.¹³ It has been reported in several countries of Latin America, Asia, beyond India, the UK, Turkey, Spain, and Sweden.² According to a previous study, ST11 may be related to colistin resistance in *K. pneumoniae*.²⁰ Our results identified four CR-KP (36.4%) resistant to polymyxin including ST11, which had a high MIC (32

µg/mL). The ability of *K. pneumoniae* ST11 to acquire resistance and its virulence power determines its prevalence in this profile and success of infection.²¹

Recently, we reported ST1298 in polymyxin-resistant *K. pneumoniae*.¹⁵ In this study, ten *K. pneumoniae* of ST1298 were found in Hospital A. The persistence of this clone for five months in the ICUs may be linked to the spread of plasmids carrying the clone in this institution. In our study, ST1298 CR-KP presented a higher rate of tigecycline resistance compared to the other sequence types.

ST13 was described in previous studies with *K. pneumoniae* carrying *bla*_{TEM}²² and *bla*_{OXA-48}²³ in Europe and was reported in KPC-producing *K. pneumoniae* from northeastern and southeastern Brazil.¹³ Corroborating these results, our study showed a high prevalence of KPC-producing *K. pneumoniae* of ST13 in the studied hospitals. We found that ST11 and ST13 were related to high rates of polymyxin resistance. The selective pressure caused by polymyxins likely contributed to selection of this resistance and limited its treatment.

ST37 has been described in *K. pneumoniae* carrying resistance mechanisms: KPC, NDM, and IMP-4 in China,²⁴⁻²⁶ the OXA-48 gene in Saudi Arabia,²⁷ ESBL genes in Africa²⁸ and KPC in Brazil.²⁰ In our study, this clone harboring *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and *bla*_{KPC} demonstrated that clones can carry resistance genes worldwide.

This study describes for the first time in Brazil the sequence types ST304, ST309, ST401, ST406, ST779, and ST251 in MDR *K. pneumoniae*. Further studies are needed to determine the relationship of these STs with antimicrobial resistance.

The results obtained reveal dissemination of *K. pneumoniae* belonging to the same clone in different hospitals in the same region. The transfer of *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{CTXM} likely contributed to the high rate of carbapenem resistance observed in MDR *K. pneumoniae* isolates.

Acknowledgements

We thank the staff of the hospital microbiology laboratories, particularly Caroline Conci Campos, Nádia Cristina Pereira Carvalho, Fernando Aguilar Lopes, Carolina Tieppo, and Sidiane Ferreira do Carmo, for providing the *K. pneumoniae* strains. We would like to thank Isadora Rezende and Yanara Miranda Ferreira for help with the laboratorial tests.

Financial support

This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior – Brazil (CAPES) – Finance code 001 and by Universidade Federal de Mato Grosso do Sul and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Oswaldo Cruz (IOC)-Fiocruz.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Palmeiro JK, De Souza RF, Schörner MA et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Brazilian tertiary hospital. *Frontiers in microbiology* 2019;10:1669.
2. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in microbiology* 2016; 7:895.

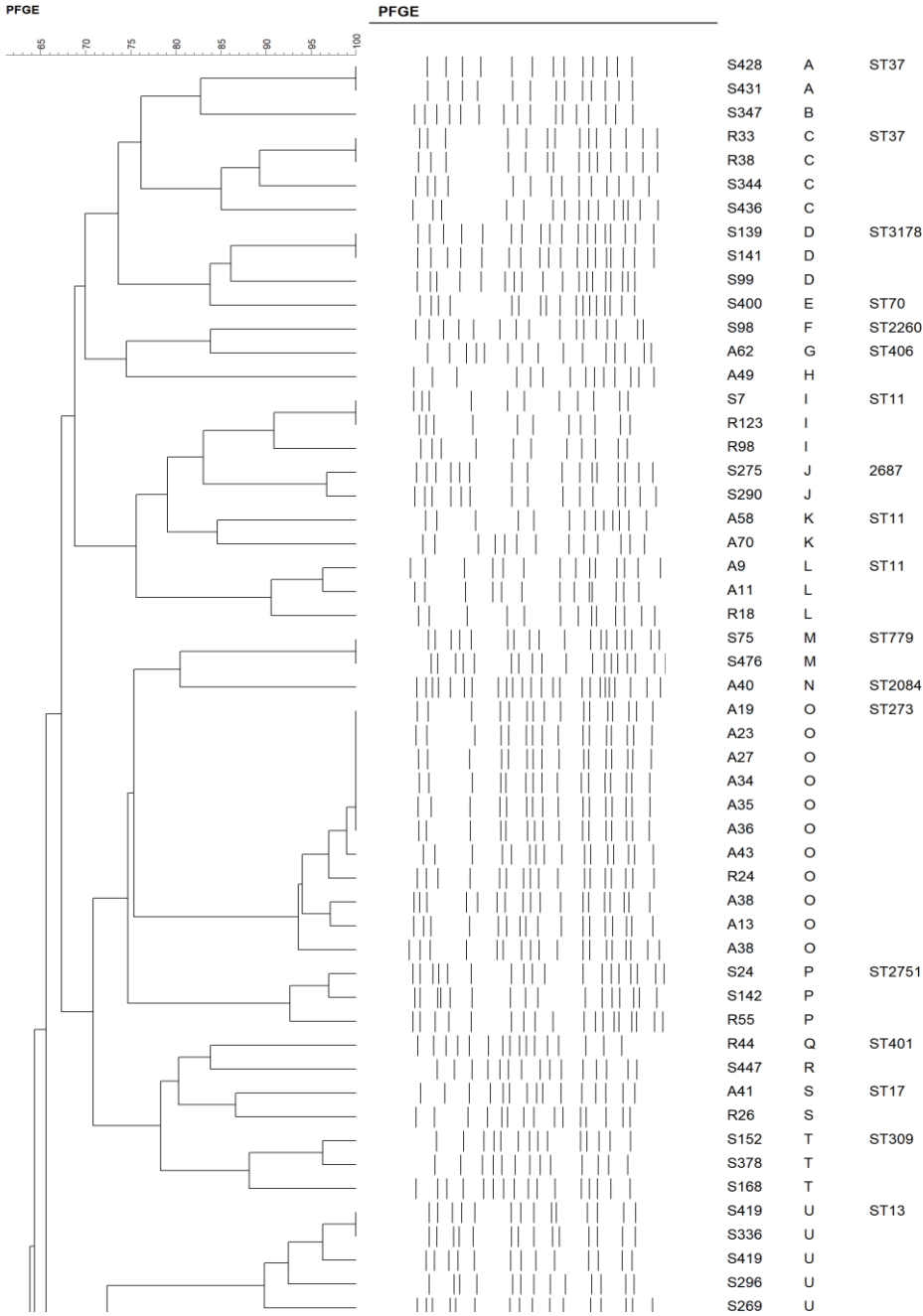
3. BrCast. Comitê Brasileiro de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana. Available em: brcast.org.br 2017; Acess 01 march 2017.
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18(3): 268-81.
5. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. B-lactamases among extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1): 115-21.
6. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(4): 906-9.
7. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo- β -lactamases gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12): 2909-13.
8. Ribot EM, Fair MA, Gautam R et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 2006; 3(1): 59-67.
9. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 4178-82.

10. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 2017; 16(1): 18.
11. Perez F, El Chakhtoura N G, Papp-Wallace K M, Wilson B M, Bonomo R A. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2016; 17(6), 761-781.
12. Du X, He F, Shi Q et al. The Rapid Emergence of Tigecycline Resistance in blaKPC–2 Harboring *Klebsiella pneumoniae*, as Mediated in Vivo by Mutation in tetA During Tigecycline Treatment. *Frontiers in microbiology* 2018; 9, 648.
13. Pereira PS, De Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*; 2013; 68(2): 312-16.
14. Braun G, Cayo R, Matos AP, De Mello Fonseca J, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018; 51(3): 522-7.
15. Rodrigues A C S, Santos I C O, Campos C C et al. Non-clonal occurrence of pmrB mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2019; 114.
16. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3579-3583.

17. Chou A, Roa M, Evangelista MA et al.. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST273 carrying bla NDM-7 and ST656 carrying bla NDM-1 in Manila, Philippines. Microb Drug Resist 2016; 22(7): 585-588.
18. Liu L, Feng Y, Long H, McNally A, Zong Z. Sequence type 273 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaNDM-1 and blaIMP-4. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62(6): e00160-18.
19. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Eurosurveillance 2012;17(33) : 20248.
20. Aires CA, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. MgrB Mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal Surveillance Swabs in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60(11): 6969-72.
21. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. J Clin Microbiol 2014; 52(7): 2530-5.
22. Marcade G, Brisse S, Bialek S et al. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. Epidemiol Infect 2013; 141(8): 1705-1712.
23. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008–11). J Antimicrob Chemother 2012; 67(12): 2860-2864.
24. Yang J, Ye L, Guo L et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. Clinical Microbiology and Infection 2013; 19(11): E509-E515.

25. Deng J, Li YT, Shen X et al.. Risk factors and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Xiamen, China. J glob antimicrobl res 2017; 11: 23-27.
26. Zhang X, Chen D, Xu G, Huang W, Wang X. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China. PloS one 2018; 13(3): e0194000.
27. uz Zaman T, Aldrees M, Al Johani SM, Alrodayyan M, Aldughashem FA, Balkhy HH. Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. International Journal of Infectious Disease 2014; 28: 186-192.
28. Obasi A, Nwachukwu S, Ugoji E et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from pharmaceutical wastewaters in south-western Nigeria. Microb Drug Resist 2017; 23(8): 1013-1018.

Figure 1 – Molecular typing of 99 pulsotypes from carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolated in Mato Grosso do Sul – Brazil.



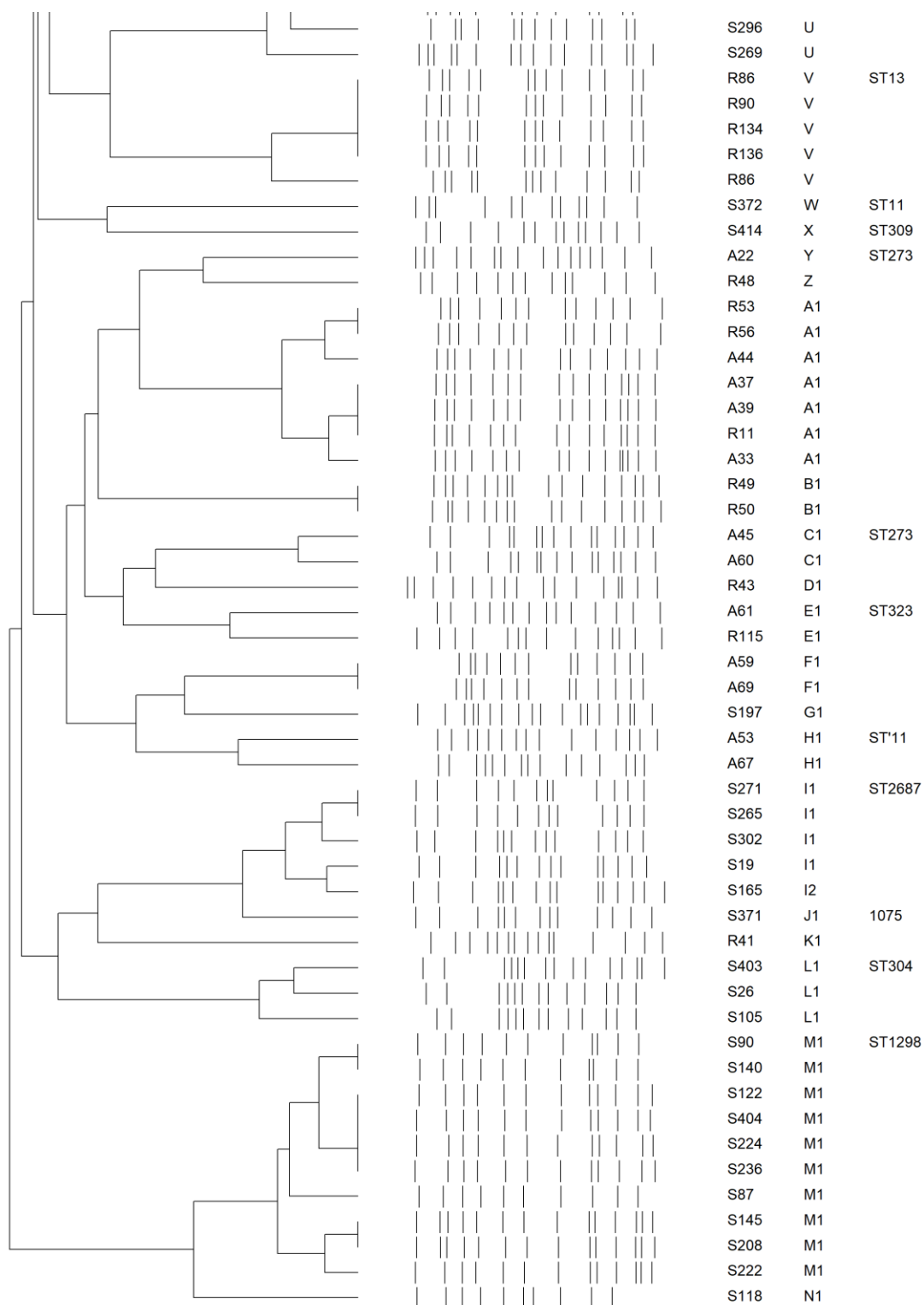


Figure 2 – Distribution of the most common *K. pneumoniae* sequence types (STs) in three hospitals of Mato Grosso do Sul state – Brazil.

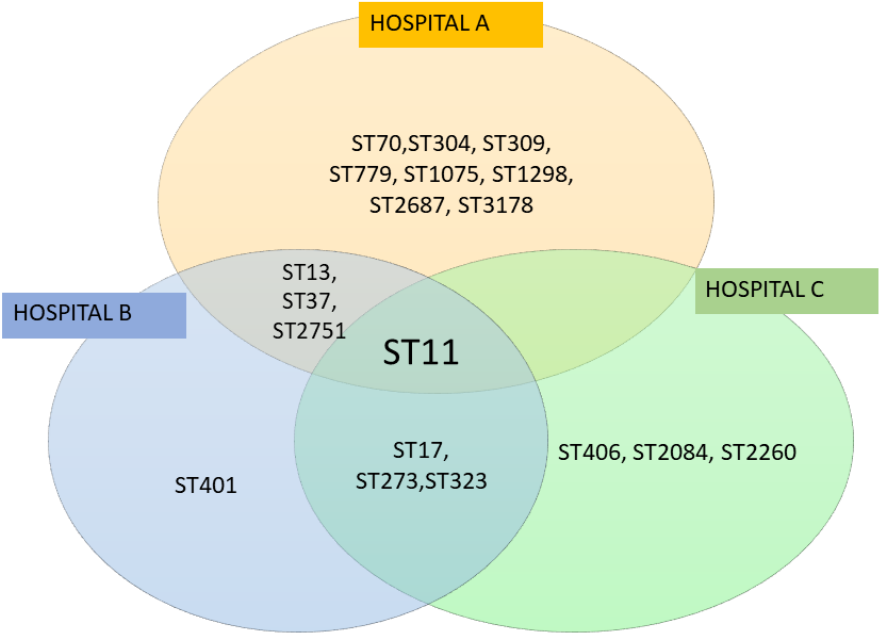


Table 1 – Sequence types, antimicrobial resistance and resistance genes of *K. pneumoniae* according to hospital of origin.

Sequence type	Isolates (n)	CIP (n)	%	ERT (n)	%	IPM (n)	%	MER (n)	%	AMI (n)	%	FOS (n)	%	TIG (n)	%	POL B (n)	%	Resistance genes (%)	Hospital (n)
ST273	13	13	100	13	100	9	69.2	13	100	0	0	4	30.8	3	23.1	1	7.7	<i>bla</i> _{-SHV} (100) <i>bla</i> _{-TEM} (100) <i>bla</i> _{CTX-M} (36.4) <i>bla</i> _{KPC} (91.7)	C (12) B (1)
ST11	11	10	90.1	9	81.8	9	81.8	10	90.1	0	0	4	36.4	3	27.3	4	36.4	<i>bla</i> _{-SHV} (100) <i>bla</i> _{-TEM} (54.5) <i>bla</i> _{CTX-M}	C (6) B (2)

																		(54.5) <i>bla</i> _{KPC}	A (3)
																		(100)	
ST1298	10	8	80.0	8	80.0	9	90.0	10	100	0	0	3	30.0	5	50.0	1	10.0	<i>bla</i> _{SHV} (30.0)	A (10)
																		<i>bla</i> _{TEM} (70.0)	
																		<i>bla</i> _{CTXM} (20.0)	
																		<i>bla</i> _{KPC} (80.0)	
ST13	8	6	75	7	87.5	8	100	8	100	2	28.6	3	37.5	1	12.5	3	37.5	<i>bla</i> _{SHV} (37.5)	A (4)
																		<i>bla</i> _{TEM} (50.0)	B (4)
																		<i>bla</i> _{CTXM} (50.0)	
																		<i>bla</i> _{KPC} (87.5)	
STNI	7	6	85.7	6	85.7	6	85.7	6	85.7	0	0	3	25.0	1	8.3	0	0	<i>bla</i> _{SHV} (50.0)	A (4)
																		<i>bla</i> _{TEM} (66.7)	B (5)
																			C (3)

																		<i>bla</i> _{CTX-M}	
																		(58.3)	
																		<i>bla</i> _{KPC} (83.3)	
ST37	6	5	83.3	6	100	6	100	6	100	2	40.0	3	50.0	0	0	1	16.7	<i>bla</i> _{SHV}	A (4)
																		(100.0)	B (2)
																		<i>bla</i> _{TEM} (83.3)	
																		<i>bla</i> _{CTX-M}	
																		(83.3) <i>bla</i> _{KPC}	
																		(83.3)	

AMI – Amikacin; CIP – Ciprofloxacin; ERT – Ertapenem; FOS – Fosfomycin; IPM – Imipenem; TIG – Tigecycline; MER – Meropenem; POL – Polymyxin B; R – Resistant; STNR – STNI – ST not identified.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em nossa região, a resistência de *K. pneumoniae* aos carbapenêmicos é causada principalmente devido a produção de KPC. Outras carbapenemases (NDM, OXA-48) não foram encontradas. As principais β -lactamases de espectro estendido encontradas foram SHV, TEM e CTX-M;
- Amicacina, tigeciclina, fosfomicina e polimixina B são os antimicrobianos com melhor atividade “in vitro”;
- A resistência as polimixinas em nosso estado é devido a mutações deletérias no gene de PmrB diferente de outros estudos em nosso país que sugerem que mutações no gene *mgrB* como principal mecanismo de resistência a essa droga;
- Os principais *sequence types* de *K. pneumoniae* em nossa região são ST 273, ST11 e ST1298, perfil diferente de outras regiões do país.
- Existe disseminação de clones de *K. pneumoniae* entre os hospitais de nosso estado, o que alerta para a importância de reforçar as medidas de controle para minimizar a dispersão de genes de resistência.

APÊNDICE A – RELAÇÃO DE BACTÉRIAS E RESULTADOS

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Id	micr	Data coleta	Rg HU	ciencia de Amos	Intende (ante)	PGI	ST	AMP	ATM	AMI	GEN	CFO	CRO	CAZ	CPM	CIP	PPT	IMP	MER	ERT	Fosfc	Tigec	m	te res	POLI	MOR/MDI	CTX-M	KPC	NDM	XA-4	SHV	TEM	MGrB	mc	
R24	IRM	22/04/2013	441058	de D.	SANGUE	UCO	66	N	Q	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.0	S	0,25	MDR	P	P	N	N	P	P	NEG	NEG		
R26	IRM	25/04/2013	442146	N. Ma	URINA	CTIAD	62	N	S	17	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.0	S	1	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R33	IRM	17/05/2013	443106	do Ar	URINA	CTIAD	47	N	C	37	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	1.5	S	1	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R38	IRM	03/06/2013	447466	ar de A	RADO TRAC	CTIAD	62	N	C	37	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	0,5	S	0,5	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R41	IRM	11/06/2013	448321	on Alc	URINA	CTIAD	78	N	K1		R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	0,5	S	0,5	MDR	P	N	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R43	IRM	13/06/2013	447164	ndra T	URINA	CTIAD	41	N	D1		R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	1	S	0,5	MDR	P	P	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
R44	IRM	13/06/2013	444719	o F. de	URINA	CTIAD	48	N	Q	401	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	1	S	0,5	MDR	P	P	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
R48	IRM	30/06/2013	448855	ino da	URINA	CTIAD	38	N	Z		R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	0,75	S	0,5	MDR	P	P	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
R49	IRM	02/07/2013	449596	Gong	URINA	UCO	75	N	B1		R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1	S	1	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R50	IRM	03/07/2013	448790	ndes	TA DE CATE	CTIAD	69	N	B1		R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	0,75	S	2	MDR	N	P	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
R53	IRM	15/07/2013	451605	Lima d	RADO TRAC	CTIAD	66	N	A1	?	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1	S	0,5	MDR	N	N	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
R55	IRM	18/07/2013	449056	i Mach	TA DE CATE	CTIAD	62	N	P	2751	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	1	S	0,5	MDR	N	P	N	N	N		NEG	NEG		
R56	IRM	18/07/2013	451981	o Felip	RADO TRAC	CTIAD	69	N	A1	?	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	0,75	S	0,5	MDR	N	P	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
R86	IRM	15/10/2013	411521	amiro d	URINA	UCO	54	N	V	13	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	4	MDR	N	P	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
R90	IRM	25/10/2013	421812	Jose F	URINA	CTIAD	65	N	V	13	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	0,75	S	1	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R98	IRM	08/11/2013	454683	a Duo	URINA	CTIAD	64	N	I	11	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	1.0	S	4	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R115	IRM	06/12/2013	462519	dth M	SANGUE	CTIAD	71	N	E1	323	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	0,75	S	0,5	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R123	IRM	25/12/2013	464277	hibes	RADO TRAC	CTIAD	66	N	I	11	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	2	R	2	XDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
R134	IRM	02/02/2014	458689	r. O. d	URINA	CTIAD	77	N	V	13	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	0,75	S	2	MDR	P	P	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
R136	IRM	06/02/2014	468184	ro Ern	SANGUE	UCO	57	N	V	13	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1	S	2	MDR	N	P	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
A9	IUF	05/04/2013	544361	SAR	RADO TRAC	CTIAD	32	N	L	11	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	2	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A11	IUF	06/04/2013	357446	EGINA	URINA	CTIAD	32	N	L	11	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	R	1	MDR	P	P	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A13	IUF	12/04/2013	679354	RO CO	SANGUE	UCO	73	N	O	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	2	R	2	XDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A19	IUF	07/05/2013	679663	FO DL	SANGUE	UCO	87	N	O	273	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	2	R	0,5	XDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A22	IUF	22/05/2013	680088	MARIA	SANGUE	CTIAD	19	N	Y	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	1	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A23	IUF	23/05/2013	678499	CARLO	URINA	CTIAD	69	N	O	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	0,094	S	0,5	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A27	IUF	05/06/2013	681825	VAR	RADO TRAC	CTIAD	23	N	O	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	3	R	0,5	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A33	IUF	02/07/2013	528091	IO RA	URINA	CTIAD	40	N	A1	?	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	1,5	S	4	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A34	IUF	03/07/2013	599562	DES R	RADO TRAC	CTIAD	74	N	O	273	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	0,5	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A35	IUF	05/07/2013	490231	CORRIDA	ESTERN	UCO	58	N	O	273	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	1,5	S	1	MDR	N	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A36	IUF	09/07/2013	303118	MIRA	URINA	CTIAD	88	N	O	273	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	0,25	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A37	IUF	10/07/2013	477182	LINO	SANGUE	CTIAD	87	N	A1	?	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1	S	2	MDR	N	P	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
A38	IUF	17/07/2013	547536	RICUE	SANGUE	CTIAD	94	N	O	273	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	0,5	S	8	MDR	NT	P	NT	NT	P	P	NEG	NEG		
A39	IUF	27/07/2013	683402	SEMR	RADO TRAC	CTIAD	94	N	A1	?	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	0,75	S	2	MDR	N	P	N	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A40	IUF	27/07/2013	168759	SUSTO	RADO TRAC	CTIAD	58	N	N	2084	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	0,5	S	16	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A41	IUF	27/07/2013	683570	INIA	RADO TRAC	CTIAD	56	N	S	17	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	0,75	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A43	IUF	21/08/2013	338993	DOCHA	URINA	CTIAD	66	N	O	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A44	IUF	22/08/2013	6784046	ARCIA	ÚLCERA	CTIAD	65	N	A1	?	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	0,094	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
A45	IUF	27/08/2013	659074	DE OI	RADO TRAC	CTIAD	50	N	C1	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	0,125	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NFG	NFG	

Id	micr	Data coleta	Rg HU	ciencia de Amos	Intende (ante)	PGI	ST	AMP	ATM	AMI	GEN	CFO	CRO	CAZ	CPM	CIP	PPT	IMP	MER	ERT	Fosfc	Tigec	m	te res	POLI	MOR/MDI	CTX-M	KPC	NDM	XA-4	SHV	TEM	MGrB	mc	
A45	IUF	27/08/2013	659074	DE OLRADO TRAC	CTIAD	50	N	C1	273	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0,125	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A49	IUF	05/09/2013	683843	AZ DO OLRADO TRAC	CTIAD	87	N	H		R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	1	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	P	N	NEG	NEG	
A53	IUF	16/09/2013	684595	REIRADO TRAC	UCO	36	N	H1	11	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	0,75	S	0,25	MDR	N	P	N	N	N	P	N	NEG	NEG	
A58	IUF	03/10/2013	683938	DE OI URINA	CTIAD	42	N	K	11	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	1,5	S	4	XDR	P	P	N	N	N	P	N	NEG	NEG	
A59	IUF	09/10/2013	682922	CO CA OLRADO TRAC	CTIAD	82	N	F1		R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	0,064	S	0,5	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG	
A61	IUF	09/01/2014	611584	DRIG URINA	CTIAD	34	N	E1	323	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	2	R	4	XDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A62	IUF	12/01/2014	225479	OGON URINA	UCO	88	N	G	406	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0,38	S	0,5	MDR	N	N	N	N	N	P	N	NEG	NEG
A67	IUF	06/03/2014	688415-6	MONADO TRAC	CTIAD	85	N	H1	11	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0,38	S	0,25	MDR	P	P	N	N	N	P	N	NEG	NEG
A69	IUF	13/02/2014	688966	ORTO SANGUE	CTIAD	36	N	F1		R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0,125	S	1	MDR	N	N	N	N	N	N	NEG	NEG	
A70	IUF	18/03/2014	689308	ES SOL URINA	CTIAD	67	N	K	11	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0,125	S	4	MDR	P	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG
A60	IUF	23/12/2013	133224	SE DO URINA	CTIAD	82	N	C1	273	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1,5	S	0,5	MDR	N	P	N	N	N	P	P	NEG	NEG

APÊNDICE B – INICIADORES E CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE PCR

Gene	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Temp. anelamento da PCR
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F: ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC CTX-M-R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	593	50°C
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC SHV-R: GATTGCTGATTTCGCTCGG	797	60°C
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F: GCGGAACCCCTATTTG TEM-R: ACCAATGCTTAATCAGTGAG	859	60°C
<i>bla</i> _{kpc}	KPC-F TCGCTAACTCGAACAGG KPC-RTTACTGCCCGTTGACGCCAATCC	785	60°C
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F TGTTTTTTGGTGGCATCGAT OXA-48-RGTAAMRATGCTTGGTTCGC	177	60°C
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F TTGGCCTTGCTGTCCTTG NDM-RACACCAGTGACAATATCACCG	82	60°C
<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i> -F – AGTCCGTTTGTCTTGTGGC <i>mcr-1</i> -R - AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	58°C
<i>mcr-2</i>	<i>mcr-2</i> -F – CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT <i>mcr-2</i> -R - TCTAGCCCGACAAGCATACC	715	58°C
<i>mcr-3</i>	<i>mcr-3</i> - F – AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG <i>mcr-3</i> -R - AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	58°C
<i>mcr-4</i>	<i>mcr-4</i> -F – TCACTTTCATCACTGCGTTG <i>mcr-4</i> -R- TTGGTCCATGACTACCAATG	1116	58°C
<i>mcr-5</i>	<i>mcr-5</i> -F- ATGCGGTTGTCTGCATTTATC <i>mcr-5</i> -R - TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	1644	58°C
<i>bla</i> _{SPM}	SPM- F – CCTACAATCTAACGGCGACC SPM – R- TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	649	52°C
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-1-F- CTACCGCAGCAGAGTCTTTG IMP-1 – R- AACCAGTTTTGCCTTACCAT	586	50°C
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-1-F AGTGGTGAGTATCCGACA VIM-1-R ATGAAAGTGC GTGGAGAC	260	50°C

Yigit et al., 2001; Mulvey et al., 2003; Monteiro et al., 2012; Rebelo et al., 2018