

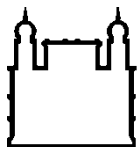
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Doutorado em Medicina Tropical**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE  
*Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTES ORIUNDOS DE  
SWAB RETAL DE VIGILÂNCIA DE HOSPITAIS DE DIFERENTES  
ESTADOS BRASILEIROS**

**CAIO AUGUSTO MARTINS AIRES**

**Rio de Janeiro  
Dezembro de 2017**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Doutorado em Medicina Tropical**

*CAIO AUGUSTO MARTINS AIRES*

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE**  
***Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTES ORIUNDOS DE**  
**SWAB RETAL DE VIGILÂNCIA DE HOSPITAIS DE DIFERENTES**  
**ESTADOS BRASILEIROS.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical

**Orientadora:** Dra. Marise Dutra Asensi

**Rio de Janeiro**  
**Dezembro de 2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Aires, Caio Augusto Martins .

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes oriundos de swab retal de vigilância de hospitais de diferentes estados brasileiros / Caio Augusto Martins Aires. - Rio de janeiro, 2017.

138 f.; il.

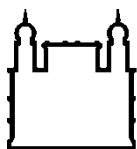
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Marise Dutra Asensi.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Carbapenemase. 3. KPC. 4. Complexo clonal 258. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Doutorado em Medicina Tropical**

**AUTOR: CAIO AUGUSTO MARTINS AIRES**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTES ORIUNDOS DE SWAB RETAL DE VIGILÂNCIA DE HOSPITAIS DE DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS.**

**ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marise Dutra Asensi**

Aprovada em: 01/12/2017

#### **EXAMINADORES:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alda Maria da Cruz (IOC/Fiocruz) - Presidente**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Hamond Regua Mangia (ENSP/Fiocruz)**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Deyse Christina Vallim da Silva - Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leila Carvalho Campos - Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz/BAHIA)**

**Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (INCQS/Fiocruz)**

Rio de Janeiro, 01 de dezembro de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por me guiar neste caminho e agradeço muito à minha família, que foi meu porto seguro. Meus pais, Augusto e Sheila que foram e sempre serão um orgulho e espelho para mim. Gostaria de agradecer também aos meus irmãos César e Carla, pelo amor e companheirismo, que apesar da distância, nunca cessa. E meus avós, Maria Auxiliadora, Ubiraci e Marina, que sempre me apoiam.

Agradeço também à minha namorada, Bianca que sempre me amou, acompanhou, me ajudou e foi paciente nos momentos em que mais precisei.

Agradeço também a todos os meus amigos e familiares, que de maneira geral, contribuíram para minha formação pessoal.

Agradeço à minha orientadora Dra. Marise Dutra Asensi, pela oportunidade. Sem toda sua orientação, apoio, dicas, conversas e puxões de orelha, teria sido muito mais difícil percorrer este caminho.

Agradeço também à Dra. Ana Paula e Dr. Cláudio do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), por dedicarem de seus momentos e sua expertise a mim, e ao Dr. Rodolpho Albano pelo sequenciamento genômico e pelo auxílio nas análises.

Agradeço aos integrantes e ex-integrante do LAPIH, Thiago, Polyana, Carlos, Carolina, Melise, que partilharam muito do que aprendi como profissional. Também a Ivson, Vanessa, Gabriela, Jonathan, Thamirys, Raphaela, Elid, Synara, Natacha, Mariana, Leonardo, Camila, Stephanie, Ingrid, Orlando, Isadora e Bianca pelos momentos de alegria e apoio.

Agradeço também à Secretaria do Setor de Bacteriologia, ao Setor de Meio de Cultura da Bacteriologia, à Coordenação da PGM, e a equipe da SEAC.

Agradeço aos professores e pesquisadores do IOC/FIOCRUZ que transmitiram todos seus conhecimentos, e aos meus amigos e colegas das pós-graduações do IOC, pelos quais tenho muito apreço.

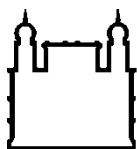
Agradeço também às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Muito obrigado!**

## EPÍGRAFE

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda”.

**Joseph Addison**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

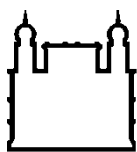
### Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes oriundos de swab retal de vigilância de hospitais de diferentes estados brasileiros

#### RESUMO - TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Caio Augusto Martins Aires

**Introdução:** A disseminação de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes (MDR) tornou-se um desafio de saúde pública no Brasil. **Objetivos:** Realizar caracterização fenotípica e molecular de isolados de *K. pneumoniae* multirresistente recuperados de swabs retais de vigilância no Brasil e desenvolver uma cartilha para divulgação da resistência bacteriana para população. **Métodos:** A identificação bacteriana foi realizada por técnicas convencionais e a susceptibilidade a antibióticos foi determinada por disco-difusão e E-test. A produção de carbapenemase foi testada com auxílio de bloqueadores enzimáticos. A PCR foi utilizada para investigar genes de resistência e virulência. A tipagem molecular foi realizada por PFGE e MLST e a localização dos genes foi realizada por S1-PFGE e Southern Blot. **Resultados:** Foram selecionados 126 isolados de *K. pneumoniae* recuperados de entre 2007-2013 de 10 estados brasileiros e Distrito Federal. A maioria dos isolados foi resistente aos  $\beta$ -lactâmicos (97%) e a vários outros antimicrobianos, porém, suscetível à fosfomicina/trometamol, polimixina B (PMB) e tigeciclina. Cerca de 89% dos isolados foram considerados MDR, 3% eram extensivamente resistentes (XDR); 1% era pan-resistente (PDR) e 7% eram suscetíveis a três ou mais classes antimicrobianas. A produção de carbapenemase foi positiva em 82% dos isolados. Detectamos 82%, 1,6%, 78%, 100% e 93% dos isolados carregando os genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{OXA-370}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ , respectivamente. Entre os isolados produtores de KPC, foram selecionadas 40 estirpes representativas, geradas a partir de cada pulsotipo do PFGE de cada estado para a realização do MLST. Foram encontrados 23 STs, sendo 45% pertencente ao complexo clonal 258 (CC258). Isolados do CC258 foram encontrados em todos os estados e compreenderam 70% dos 102 isolados KPC-positivos. O  $bla_{KPC-2}$  foi associado ao Tn4401b em 76% dos representantes. Detectamos ainda a presença concomitante de determinantes de resistência para quinolonas e aminoglicosídeos e genes de virulência comuns à espécie. Dos dez isolados resistentes à PMB, todos exibiram interrupção do gene de *mgrB*, oito isolados carregavam  $bla_{KPC-2}$  e sete pertenciam ao CC258. O genoma completo de um isolado com perfil XDR pertencente ao CC258 revelou diversos genes adquiridos e mutações associadas à resistência antimicrobiana. Descrevemos a detecção prévia de *K. pneumoniae* ST17 produtor de OXA-370 no Brasil. Este isolado apresentava o gene  $bla_{OXA-370}$  localizado em um plasmídeo de  $\cong 57$  kb. Uma cartilha com a temática da resistência antimicrobiana foi confeccionada no estilo "perguntas e respostas" e contém linguagem, personagens e ilustrações simplificadas para o entendimento da população em geral. **Conclusão:** Descrevemos a prevalência de isolados do CC258 carregando o gene  $bla_{KPC-2}$  associado ao Tn4401b oriundos de amostras de swab retal, com a maioria dos isolados apresentando perfil de MDR e determinantes de resistência para quinolonas e aminoglicosídeos, porém, sem associação de fenótipos de resistência aos perfis de virulência. Destacamos também que a interrupção do regulador *mgrB* é o principal mecanismo de resistência à PMB. Estimulamos a vigilância para amostras XDR e PDR bem como para outros genes de  $\beta$ -lactamases como  $bla_{OXA-370}$ , na perspectiva de um melhor entendimento do panorama nacional da resistência. Incentivamos a divulgação da temática da resistência bacteriana para a população uma vez que poucos materiais especializados alcançam este público. De maneira geral, este trabalho alerta para a presença de bactérias multirresistentes em nosso país carregando uma variedade de mecanismos associados à resistência de forma silenciosa.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemase, KPC, Complexo clonal 258



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Phenotypic and molecular characterization of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from surveillance rectal swabs of hospitals from different Brazilian states

#### ABSTRACT - DOCTORAL THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Caio Augusto Martins Aires

**Introduction:** The dissemination of multi-drug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* has become a public health challenge in Brazil. **Objectives:** To perform phenotypic and molecular characterization of MDR-*K. pneumoniae* isolates recovered from surveillance rectal swabs in Brazil and to develop a booklet to disseminate information about bacterial resistance to the population. **Methods:** Bacterial identification was performed by conventional techniques and susceptibility to antibiotics was determined by disk diffusion and E-test. The production of carbapenemase was tested using enzymatic blockers. PCR was used to investigate resistance and virulence genes. Molecular typing was performed by PFGE and MLST and the localization of the genes was performed by S1-PFGE and Southern Blot. **Results:** 126 isolates of *K. pneumoniae* recovered from 2007-2013 from 11 Brazilian states were selected. Most of the isolates were resistant to  $\beta$ -lactams (97%) and to several other antimicrobials, however, susceptible to fosfomicin/trometamol, polymyxin B (PMB) and tigecycline. About 89% of the isolates were considered MDR, 3% extensively-drug resistant (XDR); 1% pan-drug resistant (PDR) and 7% were susceptible to three or more antimicrobial classes. The production of carbapenemase was positive in 82% of the isolates. We detected 82%, 1.6%, 78%, 100% and 93% of the isolates carrying the *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-370</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> genes, respectively. Among the KPC-producing isolates, 40 representative strains were selected from each PFGE pulsotype of each state to perform MLST. 23 STs were found, being 45% belonging to clonal complex 258 (CC258). The Isolates of CC258 were found in all states and comprised 70% of the 102 KPC-positive isolates. *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was associated with Tn4401b in 76% of the representatives. We also detected the concomitant presence of resistance determinants for quinolones and aminoglycosides and virulence genes common to the specie. All of the 10 PMB-resistant isolates showed disruption of the *mgrB* gene, 8 isolates carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> and 7 belonging to CC258. The complete genome of an isolate with XDR profile belonging to CC258 revealed several acquired genes and mutations associated with antimicrobial resistance. We describe the previous detection of *K. pneumoniae* ST17 producing OXA-370 in Brazil. This isolate had the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene located on a  $\cong$ 57 kb plasmid. A booklet about antimicrobial resistance was constructed in the "questions and answers" style and contains simplified language, characters and illustrations for the population understanding. **Conclusion:** We describe the prevalence of CC258 strains carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> associated with Tn4401b isolated from from rectal swab samples, with most isolates presenting MDR profiles and resistance determinants for quinolones and aminoglycosides, but without association of resistance phenotypes to virulence profiles. We also emphasize that the interruption of the *mgrB* regulator is the main mechanism of resistance to PMB. We stimulated surveillance for XDR and PDR samples as well as for other  $\beta$ -lactamase genes such as *bla*<sub>OXA-370</sub>, in the perspective of a better understanding of the national resistance panorama. We encourage the dissemination of the bacterial resistance topic to the population since few specialized materials reach this public. In general, this work alerts to the presence of multiresistant bacteria in our country carrying a variety of mechanisms associated with resistance in a silent way.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemase, KPC, Clonal complex 258



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> <i>K. pneumoniae</i> cultivada em meio de cultura EMB ( <i>Eosin methylene blue</i> ).....   | 18 |
| <b>Figura 2:</b> Representação esquemática dos fatores de virulência de <i>Klebsiella</i> .....   | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Colônias de <i>K. pneumoniae</i> mostrando fenótipo virulento de HMV indicado pelo “ <i>String Test</i> ” positivo (formação de fio de muco >5mm)..... | 24 |
| <b>Figura 4:</b> Mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas e os antibióticos afetados.....  | 30 |
| <b>Figura 5:</b> Representação do Transposon Tn4401.....  | 39 |
| <b>Figura 6:</b> Características epidemiológicas das amostras produtoras de KPC por país de origem.....   | 40 |
| <b>Figura 7:</b> Modelo de ativação dos sistemas de dois componentes envolvidos na modificação do LPS.....  | 50 |

### ARTIGO 1

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Antimicrobial susceptible profile of KPC-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates.....     | 71 |
| <b>Figura 2:</b> Distribution of the STs according to state and geographical region of 102 KPC-KP from Brazil..... | 72 |
| <b>Figura 3:</b> Dendrogram and genetic features of KPC-KP of the study.....                                       | 73 |

### ARTIGO 2

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Dendrogram and genetic features of KPC-KP of the study..... | 77 |
|--|----|

### ARTIGO 3

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Time-kill curve assay showing no synergistic effect in <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain CCBH6984..... | 84 |
|---|----|

## ARTIGO 4

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Plasmid analysis of the bacterial strains analyzed in this work..... | 88 |
|---|----|

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Classificação dos antimicrobianos segundo Tenover et al., 2006.....28

**Tabela 2:** Esquema de classificação de  $\beta$ -lactamases.....36

### ARTIGO 2

**Tabela 1:** Phenotypic and molecular characterization of polymyxin B-resistant *K. pneumoniae* isolates analyzed in this work.....78

### ARTIGO 3

**Tabela 1:** Antimicrobial susceptibility and genetic determinants associated with the XDR phenotype of *Klebsiella pneumoniae* strain CCBH6984.....83

### ARTIGO 4

**Tabela 1:** Phenotypic and genetic features of the bacterial strains analyzed in this work.....88

## LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>AMK</b>            | Amicacina   |
| <b>AMP</b>            | Adenosina-monofosfato   |
| <b>ANVISA</b>         | Agencia Nacional de Vigilância Sanitária                                    |
| <b>ATCC</b>           | do inglês <i>American Type and Culture Collection</i>                       |
| <b>ATM</b>            | Aztreonam   |
| <b>ATP</b>            | Adenosina-trifosfato  |
| <b>BLAST</b>          | do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                          |
| <b>BSM</b>            | Brasil Sem Miséria  |
| <b>CAZ</b>            | Ceftazidima   |
| <b>CC</b>             | Complexo clonal   |
| <b>CCBH</b>           | Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar                       |
| <b>CDC</b>            | do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>                 |
| <b>CHL</b>            | Cloranfenicol   |
| <b>CIM</b>            | Concentração Inibitória Mínima  |
| <b>CIP</b>            | Ciprofloxacina  |
| <b>CLSI</b>           | do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>                    |
| <b>CTX</b>            | Cefotaxima  |
| <b>DNA</b>            | Ácido Desoxirribonucleico   |
| <b>EMA</b>            | Enzima Modificadora de Aminoglicosídeos                                     |
| <b>EMB</b>            | do inglês <i>Eosin Methylene- blue Agar</i>                                 |
| <b>ESBL</b>           | $\beta$ -Lactamase de Espectro Estendido                                    |
| <b>EUCAST</b>         | do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| <b>EDTA</b>           | do inglês <i>Ethylene Diamine TetrAcetic acid</i>                           |
| <b>ETP</b>            | Ertapenem   |
| <b>FEP</b>            | Cefepime  |
| <b>FIOCRUZ</b>        | Fundação Oswaldo Cruz   |
| <b>FOT</b>            | Fosfomicina/trometamol  |
| <b>GEN</b>            | Gentamicina   |
| <b>HMV</b>            | Hipermucoviscosidade  |
| <b>H<sub>2</sub>S</b> | Ácido Sulfídrico  |
| <b>Inc</b>            | Grupo de Incompatibilidade Plasmideal                                       |
| <b>IOC</b>            | Instituto Oswaldo Cruz  |
| <b>IPM</b>            | Imipenem  |
| <b>IR</b>             | Sequencia repetitiva invertida  |
| <b>IRAS</b>           | Infecção relacionadas à assistência à saúde                                 |
| <b>IS</b>             | Sequencia de inserção   |
| <b>ITU</b>            | Infecção do Trato Urinário  |
| <b>kb</b>             | Quilobases  |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>KPC</b>    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase                               |
| <b>KPC-KP</b> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC                            |
| <b>LAPIH</b>  | Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar                           |
| <b>LPS</b>    | Lipopolissacarídeo   |
| <b>LPSN</b>   | do inglês <i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i> |
| <b>MBL</b>    | Metallo- $\beta$ -Lactamase  |
| <b>MDR</b>    | do inglês <i>Multi-Drug Resistant</i>                                    |
| <b>MEM</b>    | Meropenem  |
| <b>MLST</b>   | do inglês <i>Multilocus sequence typing</i>                              |
| <b>NCBI</b>   | do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>           |
| <b>NDM</b>    | New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase                                    |
| $\mu\text{m}$ | Micrometros  |
| <b>OMS</b>    | Organização Mundial da Saúde   |
| <b>OMP</b>    | Classe de porinas presente em Procariotos                                |
| <b>OXA</b>    | Oxacilinase  |
| <b>pb</b>     | Pares de bases   |
| <b>PBP</b>    | Proteínas ligadoras de penicilina  |
| <b>PDR</b>    | do inglês <i>Pan-Drug Resistant</i>                                      |
| <b>PCR</b>    | Reação em Cadeia da Polimerase   |
| <b>PFGE</b>   | Eletroforese em gel de campo pulsado                                     |
| <b>pH</b>     | Potencial de hidrogênio  |
| <b>PMQR</b>   | do inglês <i>Plasmid-Mediated Quinolone Resistance</i>                   |
| <b>PMB</b>    | Polimixina B   |
| <b>QRDR</b>   | do inglês <i>Quinolone-Resistance Determining Region</i>                 |
| <b>TZP</b>    | Piperacilina/tazobactam  |
| <b>RAST</b>   | do inglês <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>             |
| <b>RNA</b>    | Ácido ribonucleico   |
| <b>rRNA</b>   | RNA ribossômico  |
| <b>ST</b>     | do inglês <i>Sequence type</i>   |
| <b>SUS</b>    | Sistema Único de Saúde   |
| <b>SXT</b>    | Sulfametoxazole/trimetroprima  |
| <b>TGC</b>    | Tigeciclina  |
| <b>TEM</b>    | $\beta$ -lactamase Temoneira   |
| <b>Tn</b>     | Transposon   |
| <b>UTI</b>    | Unidade de terapia intensiva   |
| <b>XDR</b>    | do inglês <i>Extensively-Drug Resistant</i>                              |

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 15 |
| 1.1. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.....   | 15 |
| 1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....  | 17 |
| 1.2.1. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos das Infecções .....   | 18 |
| 1.2.2. Colonização Intestinal.....   | 20 |
| 1.2.3. Fatores de Virulência .....   | 22 |
| 1.2.3.1. Cápsula Polissacarídica e Mucoviscosidade .....   | 23 |
| 1.2.3.2. Adesinas e Fímbrias .....   | 24 |
| 1.2.3.3. Captação e Utilização de Metabólitos.....   | 25 |
| 1.3. Agentes Antimicrobianos.....  | 26 |
| 1.4. Resistência aos Antimicrobianos .....   | 28 |
| 1.4.1. Associações da resistência bacteriana com elementos genéticos.....  | 31 |
| 1.4.1.1. Plasmídeos.....   | 31 |
| 1.4.1.2. Sequências de inserção e transposons .....  | 32 |
| 1.4.1.3. Integrons.....  | 33 |
| 1.5. Resistência aos Antimicrobianos em <i>K. pneumoniae</i> .....   | 34 |
| 1.5.1. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos.....  | 34 |
| 1.5.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC).....   | 38 |
| 1.5.1.2. New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM).....  | 41 |
| 1.5.1.3. OXA-48-like .....   | 42 |
| 1.5.2. Resistência a aminoglicosídeos.....   | 43 |
| 1.5.3. Resistência a quinolonas .....  | 46 |
| 1.5.4. Resistência às polimixinas .....  | 48 |
| 1.6. Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos .....   | 51 |
| 1.7. Metodologias de Tipagem de <i>K. pneumoniae</i> .....   | 53 |
| 1.8. Resistência Bacteriana na Perspectiva do Plano Brasil sem Miséria.....  | 56 |
| 1.8.1. Educação em Saúde na Temática da Resistência Bacteriana na<br>Perspectiva do Plano Brasil sem Miséria ..... | 58 |
| 2. JUSTIFICATIVA .....   | 62 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 64 |
| 3.1. Objetivo Geral .....  | 64 |
| 3.2. Objetivos Específicos.....  | 64 |

|   |     |
|---|-----|
| 4. RESULTADOS .....   | 65  |
| 4.1. Artigo 1 - Population structure of KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from surveillance rectal swabs in Brazil, 2009-2013. ....   | 66  |
| 4.2. Artigo 2 - <i>mgrB</i> mutations mediating polymyxin B resistance in <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates from rectal surveillance swabs in Brazil.....   | 76  |
| 4.3. Artigo 3 - Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST855 (CC258) only susceptible to Ceftazidime-Avibactam isolated in Brazil. .... | 81  |
| 4.4. Artigo 4 - Early detection of OXA-370-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST17 co-harboring <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> in Brazil.. ....  | 86  |
| 4.5. Cartilha Resistência Bacteriana Aos Antibióticos: O Que Você Deve Saber e Como Prevenir .....  | 90  |
| 5. DISCUSSÃO .....  | 107 |
| 5.1. Cartilha como Estratégia de Educação em saúde no Combate à Resistência Bacteriana.....   | 111 |
| 6. CONCLUSÕES .....   | 115 |
| 7. REFERÊNCIAS.....   | 117 |
| 8. ANEXOS .....   | 132 |

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde**

Como definição, as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) compreendem qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente, se manifestadas durante a internação ou após a alta, uma vez que estejam relacionadas com a internação e/ou com procedimentos realizados durante a internação (ANVISA, 2013). A partir da década de 1990, o termo “infecções hospitalares” foi substituído por “infecções relacionadas à assistência em saúde” (IRAS), sendo essa designação uma ampliação conceitual que incorpora infecções adquiridas e relacionadas à assistência em qualquer ambiente (HORAN et al., 2008). Além dos hospitais, as IRAS também podem estar relacionadas com procedimentos realizados em ambulatórios, consultórios e outras unidades de atendimento à saúde (ANVISA, 2013).

As IRAS são um grave problema de saúde pública mundial, constituindo os eventos adversos relacionados à assistência à saúde mais recorrentes e apresentando alta morbidade e mortalidade, o que repercute diretamente na segurança do paciente e, por sua vez, na qualidade dos serviços de saúde (COSTA, 2016).

Um estudo da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou que a maior prevalência de IRAS ocorre em unidades de terapia intensiva (UTI), em enfermarias cirúrgicas e alas de ortopedia. Sendo que as infecções de sítio cirúrgico, infecções do trato urinário (ITU), do trato respiratório inferior e da corrente sanguínea são as mais frequentes (WHO, 2002). Contudo, as infecções respiratórias e de corrente sanguínea evoluem com maior gravidade (PELEG & HOOPER, 2010).

As IRAS estão associadas, primariamente, à gravidade clínica dos pacientes, longas internações, procedimentos cirúrgicos ou materiais invasivos, recebimento de terapia antimicrobiana ou imunossupressora, ventilação mecânica e o próprio ambiente que favorece a seleção natural de bactérias resistentes aos medicamentos utilizados na terapêutica (SINGH et al., 2006; SIEGEL et al., 2007).



Centenas de milhões de pacientes são afetados pelas IRAS a cada ano em todo o mundo, provocando significativas taxas de mortalidade e enormes perdas financeiras para os sistemas de saúde. Estima-se que em países desenvolvidos, 7% dos pacientes admitidos em hospitais adquirem pelo menos uma IRAS e, em países em desenvolvimento, essa taxa pode ser superior a 10% (WHO, 2014).

No Brasil, as IRAS têm sido um problema entre os órgãos governamentais e embora as regulamentações de medidas de controle tenham sido iniciadas na década de 80, as dificuldades de prevenção e controle de IRAS no país permanecem (OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008). Dados de 2014, referentes às UTIs de 1.692 hospitais publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), evidenciaram a densidade de incidência de infecção primária da corrente sanguínea, como sendo de 5,1 infecções a cada 1.000 cateteres venosos centrais/dia em UTI adulto, e em pacientes pediátricos essa incidência foi de 5,5 (ANVISA, 2015).

Dentre as diversas consequências e impactos causados pelas IRAS, destacam-se os danos físico e psicológico ao paciente; sequelas funcionais; perda de órgãos vitais; óbito; danos pessoais, que muitas vezes comprometem os familiares envolvidos. Além disso, aumento do custo hospitalar é bastante significativo (COUTO et al., 2003).

Os gastos com tratamento das IRAS têm sido altos e inúmeros, com impactos negativos e têm acarretado muitos danos econômicos como os gerados pela necessidade do aumento da permanência de internação em pelo menos quatro dias a mais, elevando os custos e o risco de falecer em decorrência desta nova patologia (MARTINS, 2002).

Embora os vírus, fungos e protozoários sejam causadores de IRAS, as bactérias permanecem como a causa mais comum (SINGH et al., 2006). Entre o grupo de patógenos bacterianos que causam IRAS destaca-se o chamado grupo “ESKAPE”, o qual inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Este grupo está intimamente associado à resistência aos antimicrobianos, em parte pela alta capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência e também, pelo contato prolongado com

antimicrobianos no ambiente hospitalar que favorece a seleção de cepas resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, denominadas multirresistentes (MDR), o que dificulta a terapêutica antimicrobiana. (LUNA, 2002; SANTOS, 2004; ANVISA, 2005).

Nesse contexto, *K. pneumoniae* é uma das principais causadoras de IRAS, chegando a ser responsável por até 29% das infecções que, muitas vezes, estão associadas a uma alta morbimortalidade (PEREIRA et al., 2003).

## 1.2. *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* é a espécie bacteriana de maior notoriedade dentro do gênero *Klebsiella* (LI et al., 2014). Este gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, recebeu este nome em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs por Trevisan em 1885 (KONEMAN, 2005). Atualmente, as espécies do gênero *Klebsiella* são taxonomicamente classificadas em seis espécies: *K. pneumoniae*, *K. granulomatis*, *K. quasipneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca* e *K. michiganensis*. A espécie *K. pneumoniae* compreende as subespécies: *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*; enquanto *K. quasipneumoniae* compreende as subespécies: *quasipneumoniae* e *similipneumoniae* (LPSN, 2017).

Caracteriza-se por ser um bacilo Gram-negativo não esporulado, aeróbio facultativo, com tamanho que varia de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6,0 µm de comprimento; podem ser observadas em células únicas, ou em pares e cadeias curtas; utiliza o citrato como única fonte de carbono, é capaz de fermentar glicose e lactose e possui positividade para a prova de Voges-Proskauer e para as enzimas lisina descarboxilase e uréase; é negativa nas provas de indol, enzimas ornitina e arginina descarboxilase e enzima citocromo oxidase; não produz gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) ou motilidade. Este micro-organismo apresenta uma cápsula proeminente formada de polissacarídeos (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; KONEMAN, 2005).

Quando cultivada em Ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*), *K. pneumoniae* produz colônias rosadas com centro negro, de aparência brilhante, com

consistência mucoide devido à produção de cápsula (Figura 1) (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; KONEMAN, 2005).



**Figura 1** - *Klebsiella pneumoniae* cultivada em meio de cultura EMB (*Eosin methylene blue*). Fonte: American Society for Microbiology, 2007.

Assim como as demais espécies do gênero, *K. pneumoniae* encontra-se de maneira ubíqua na natureza, distribuída em corpos hídricos, esgoto, solo, vegetação e também colonizando a pele, a nasofaringe e principalmente, o trato gastrointestinal de humanos e outros animais (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). O fato de ser um micro-organismo saprófito da microbiota humana torna *K. pneumoniae* um típico patógeno oportunista, que afeta principalmente pessoas com sistema imunológico enfraquecido e tendem a causar infecções nosocomiais (LI et al., 2014).

### **1.2.1. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos das Infecções**

O bacilo hoje conhecido como *Klebsiella*, foi descrito no fim do século XIX como “bacilo de Friedlander” por Carl Friedlander, como causador de uma pneumonia grave e com frequência fatal. Desde então, *K. pneumoniae* tem sido cada vez mais reconhecida como causa de morbidade e mortalidade humana significativa (KONEMAN, 2005; LI et al., 2014). Das espécies do gênero, *K. pneumoniae* é considerada a espécie clinicamente mais importante, causando 75% a 86% das infecções clínicas (ACHEAMPONG & BOAMPONSEM, 2011).

Esta espécie é isolada com frequência de amostras clínicas e causa uma ampla gama de infecções incluindo a pneumonia primária que geralmente ocorre em pacientes em condições debilitantes, como alcoolismo, diabetes mellitus e doença pulmonar obstrutiva crônica. Esta bactéria também pode causar infecções extrapulmonares, incluindo enterite e meningite (em lactentes), infecções do trato urinário (em crianças e adultos), septicemia e abscessos hepáticos (KONEMAN, 2005; PACZOSA & MECSAS, 2016).

Anteriormente considerado predominantemente como um agente de infecção adquirido na comunidade, progressivamente as infecções por *Klebsiella* se tornaram mais prevalentes no âmbito hospitalar. O paciente hospitalizado, imunocomprometido e com doenças subjacentes é o principal alvo dessa bactéria. Assim, as infecções por *Klebsiella* podem servir como um paradigma de infecções adquiridas no hospital. Sua incidência dentre todas as infecções adquiridas no hospital classifica-os entre um dos agentes patogênicos nosocomiais mais importantes (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

*K. pneumoniae* causa infecções graves principalmente em indivíduos imunocomprometidos, mas o recente surgimento e disseminação de cepas hipervirulentas ampliou o número de pessoas suscetíveis a infecções para incluir pessoas saudáveis e imunocompetentes. Este subtipo, com produção elevada de cápsula, pode causar infecções adquiridas na comunidade com risco de morte, como abscesso hepático piogênico, meningite, fasciite necrotizante, endoftalmologia e pneumonia grave (LI et al., 2014; PACZOSA & MECSAS, 2016). Na sua maior parte, essas cepas hipervirulentas estão geograficamente limitadas a Taiwan e ao Sudeste Asiático. Em contraste, as cepas clássicas de *K. pneumoniae* que causam infecções nosocomiais graves podem ser encontradas em todo o mundo (YU et al., 2006; RUSSO et al., 2011, 2014; MAGILL et al., 2014).

Dados relatados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) entre 2011 e 2014, indicam que *Klebsiella* foi o terceiro patógeno mais comum em todos os casos de infecção sanguínea associada a cateter central, infecção do trato urinário associada a cateter, pneumonia associada ventilação e infecção do local cirúrgico, representando 7,7% de todos os patógenos relatados (WEINER et

al., 2016). Em geral, as pneumonias causadas por bactérias são a principal causa de mortalidade entre infecções nosocomiais, sendo *K. pneumoniae* responsável por cerca de 12% dessas infecções (MAGILL et al., 2014).

Dentre os bacilos Gram negativos, este patógeno destaca-se como agente causador de bacteremias associadas tanto à comunidade quanto nosocomiais (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Cerca de 50% das bacteremias origina-se de infecções primárias nos pulmões (TSAI, 2010) e podem apresentar altas taxas de mortalidade que variam de 27 a 37% (PACZOSA & MECSAS, 2016).

Acredita-se que a colonização do trato gastrointestinal, a presença de *K. pneumoniae* no ambiente, instrumentos contaminados e as mãos dos profissionais de saúde são os principais reservatórios de *K. pneumoniae* associados à transmissão desse patógeno (MARTIN et al., 2016), podendo ocorrer em qualquer área física hospitalar e acometer pacientes clínicos, cirúrgicos e pediátricos (MARRA, 2002).

### **1.2.2. Colonização Intestinal por *Klebsiella pneumoniae***

A colonização de *K. pneumoniae* no trato gastrointestinal é importante por várias razões. Primeiramente, pode preceder e, possivelmente, servir como fonte de infecção clínica subsequente nos pacientes colonizados (BORER et al., 2012; SCHECHNER et al., 2013). Em segundo lugar, os pacientes colonizados podem servir como um reservatório importante para a disseminação de *K. pneumoniae* nas instituições de saúde (CALFEE & JENKINS, 2008; BILAVSKY et al., 2010; WIENER-WELL et al., 2010).

Estudos epidemiológicos demonstraram que, independentemente do local de infecção, o primeiro estágio em infecções nosocomiais por *K. pneumoniae* consiste na colonização do trato gastrointestinal do paciente (COUDEYRAS et al., 2008; MARTIN et al., 2016; GORRIE et al., 2017). A contaminação de diferentes locais do corpo a partir deste sítio anatômico provavelmente ocorrerá através de processos exógenos ou endógenos (MARONCLE et al., 2006).

As taxas de colonização gastrointestinal por *K. pneumoniae* são variáveis e estima-se que, em pessoas saudáveis, variem entre 3,8 a 38% (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; CHUNG et al., 2012; CONLAN, 2012; GORRIE et al., 2017). Em pacientes hospitalizados, essas taxas são ainda maiores, variando entre 18,5 a 77% tanto em pesquisas antigas quanto mais recentes (SELDEN et al., 1971; ROSE & BABCOCK, 1975; PODSCHUN & ULLMANN, 1998; FILIUS et al., 2005; MARTIN et al., 2016; GORRIE et al., 2017).

O aumento da incidência de infecção por *K. pneumoniae* entre pessoas com exposições a tratamentos de saúde atuais ou recentes parece ser devido, pelo menos em parte, a taxas aumentadas de colonização gastrointestinal do micro-organismo (CALFEE, 2017). Em dois estudos com pacientes admitidos na UTI, a colonização por *K. pneumoniae* foi encontrada como um fator de risco significativo para a infecção posterior por *K. pneumoniae* e a maioria dos portadores assintomáticos desenvolveram infecção por este micro-organismo quando comparados aos não-portadores (MARTIN et al., 2016; GORRIE et al., 2017)

Para sobreviver e persistir no trato gastrointestinal do hospedeiro, *K. pneumoniae* deve detectar e responder a várias condições biológicas estressantes. A primeira grande barreira encontrada após a ingestão oral é a acidez do estômago (COUDEYRAS et al., 2008). A sobrevivência de bactérias em um ambiente de hospedeiro ácido requer respostas de tolerância ácida. A lisina descarboxilase é um dos principais sistemas de aminodecarboxilases envolvidos na homeostase de pH (BEGLEY et al., 2005; HSIEH et al., 2010). Em seguida, as bactérias entram no intestino delgado, onde encontram estresses associados a ácidos graxos voláteis, variações de pH e osmolaridade e competição com flora endógena (COUDEYRAS et al., 2008).

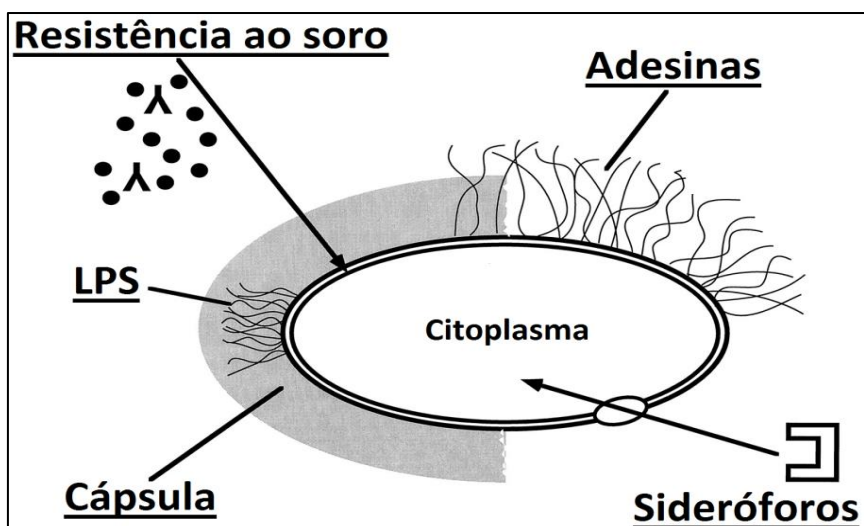
A colonização intestinal também depende da habilidade destas bactérias de aderir às superfícies mucosas. As cepas bacterianas só podem persistir dentro do trato gastrointestinal se estiverem firmemente estabelecidas na superfície mucosa intestinal e, portanto, são capazes de formar biofilme dentro da camada de muco e resistir às fortes ondas de peristaltismo (MARONCLE et al., 2006; MacFARLANE, 2008).

Várias adesinas foram caracterizadas na superfície celular e nas fimbrias de *K. pneumoniae* e demonstraram desempenhar um papel na adesão às células epiteliais intestinais (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1992; DI MARTINO et al., 1996). Também foi demonstrado que a cápsula polissacarídica desempenha um papel ativo durante o processo de colonização intestinal (FAVRE-BONTE et al., 1999), bem como outras estruturas e funções, incluindo o transporte de membrana, bombas de efluxo e vias metabólicas (MARONCLE et al., 2006; COUDEYRAS et al., 2008).

### **1.2.3. Fatores de Virulência em *K. pneumoniae***

Os agentes patogênicos caracterizam-se pela capacidade de produzir doença, já os fatores de virulência são propriedades que aumentam a capacidade de produzir efeitos graves ou fatais (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Apesar disso, é de senso comum que o desfecho clínico de um paciente não está somente ligado aos fatores de virulência apresentados pelo micro-organismo, como também, sua condição imunológica no momento do contato com o patógeno (BRISSE et al., 2009; SCHEMBRI et al, 2005).

Os fatores de virulência provavelmente estão associados a uma melhor adaptabilidade da bactéria em relação ao hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento de infecções e na capacidade de manutenção no organismo hospedeiro, facilitando a capacidade de sobrevivência e disseminação dessas bactérias (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Na figura 2 encontram-se os fatores comumente associados com a virulência em *K. pneumoniae*, como lipopolissacarídeos (LPS), sideróforos, adesinas fimbriais e não-fimbriais, produção de biofilme e a cápsula polissacarídica (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; BRISSE et al., 2009).



**Figura 2** - Representação esquemática dos fatores de virulência de *Klebsiella*. Fonte: adaptado de Podschun & Ullmann, 1998.

### 1.2.3.1. Cápsula Polissacarídica e Mucoviscosidade

A cápsula polissacarídica produzida usualmente por isolados de *K. pneumoniae* é espessa, hidrofílica, e representa o principal mecanismo de virulência desta espécie. A cápsula tem função de neutralizar a atividade antibacteriana do sistema complemento presente no soro, dificulta a fagocitose dos micro-organismos por macrófagos, induz a maturação das células dendríticas e é responsável pelo aspecto mucoide e brilhante dos isolados quando semeados em placas com meios de cultura sólidos. (CLEGG & MURPHY, 2016; PODSCHUN & ULLMANN, 1998; SIU et al., 2011).

A complexidade bioquímica destas cápsulas dá origem à produção de antígenos específicos. Atualmente, no sistema internacional de sorotipagem, já foram incluídos aproximadamente 80 antígenos capsulares (K). Esses antígenos têm sido usados para discriminação de cepas durante infecções clínicas. Análises bioquímicas de cápsulas de *K. pneumoniae* indicam que são compostos polissacarídeos ácidos complexos consistindo em repetições de unidades básicas de três a seis açúcares. Estes variam de acordo com a composição dos resíduos de açúcar que podem ser manose, ramnose, ácido glucurônico, galactose e glucopiranosilo (BRISSE et al., 2009; CLEGG & MURPHY, 2016).

Algumas estirpes de *K. pneumoniae* possuem colônia mucoide de consistência viscosa, este fenótipo denominado hipermucoviscosidade (HMV) é



atribuído à produção de grandes quantidades de polissacarídeos capsulares que promovem maior resistência à eliminação através de proteínas do soro e fagocitose. Além disso, o grau de mucoviscosidade parece correlacionar-se positivamente com o estabelecimento bem sucedido de infecções invasivas (HUNT et al., 2011; LIN et al., 2011). Dois fatores podem ter influência direta neste perfil; a presença da proteína MagA, codificada pelo gene *magA*, que confere um fenótipo de HMV em isolados de *K. pneumoniae* invasivas (HUNT et al., 2011); e a proteína RmpA, codificada por um gene plasmideal denominado *rmpA* que regula de forma positiva a síntese do polissacarídeo capsular (HSU et al., 2011).



**Figura 3** – Colônias de *Klebsiella pneumoniae* mostrando fenótipo virulento de HMV indicado pelo “String Test” positivo (formação de fio de muco >5mm) Fonte: Shon, 2013.

### 1.2.3.2. Adesinas e Fímbrias

A capacidade de adesão à mucosa e superfícies de células epiteliais pelas bactérias é, frequentemente, um dos passos mais importantes na colonização e desenvolvimento de infecções no hospedeiro. A adesão bacteriana de espécies Gram-negativas geralmente é mediada por adesinas fimbriais, que são estruturas proteicas, filamentosas, expressas na superfície celular bacteriana, com capacidade de reconhecer receptores moleculares, facilitando a aderência do micro-organismo nas superfícies de tecidos específicos do hospedeiro, mas sem qualquer envolvimento na motilidade (STAHLHUT et al., 2009; STRUVE et al., 2008).

Pelo menos quatro tipos de fimbrias foram caracterizados experimentalmente em *K. pneumoniae*, fimbrias do tipo 1, fimbrias do tipo 3, fimbrias Kpc e adesina KPF-28 (LI et al., 2014). No entanto, a maioria das investigações do papel de adesinas em *K. pneumoniae* se concentra em dois tipos fimbriais, que são produzidos pela maioria dos isolados clínicos de *K. pneumoniae*, as fimbrias do tipo 1 (manose-sensível) e fimbrias do tipo 3 (manose-resistente), que possuem as subunidades de adesina principais denominadas FimH e MrkD, respectivamente, que podem ser codificados por genes cromossômicos e plasmidiais (CLEGG & MURPHY, 2015).

### **1.2.3.3. Captação e Utilização de Metabólitos**

O ferro é um fator crucial para o desenvolvimento bacteriano, funcionando principalmente como catalisador redox de proteínas e no processo de transporte de elétrons, além de desempenhar papel importante na regulação de alguns fatores de virulência e *quorum-sensing* (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; BRISSE et al., 2009).

No hospedeiro, o ferro é pouco disponível para o desenvolvimento das bactérias, uma vez que está ligado a proteínas como hemoglobina, ferritina, hemossiderina, mioglobina, lactoferrina e transferrina (PODSCHUN et al., 2000). A tática predominante utilizada por muitos agentes patogênicos, incluindo *K. pneumoniae*, para adquirir ferro é através da secreção de sideróforos, que são moléculas que possuem maior afinidade pelo ferro que as proteínas de transporte do hospedeiro (MIETHKE & MARAHIEL, 2007).

As cepas de *K. pneumoniae* produzem vários sideróforos e a expressão e contribuição de cada sideróforo para a virulência variam. A produção de mais de um sideróforo pode ser um meio de otimizar a colonização de diferentes tecidos e/ou evitar a neutralização de um sideróforo pelo hospedeiro (MIETHKE & MARAHIEL, 2007; BACHMAN et al., 2012). Vários sideróforos são expressos em *K. pneumoniae*, incluindo enterobactina, yersiniabactina, salmochelin e aerobactina, e a afinidade destes sideróforos para o ferro também é variável (PACZOSA & MECSAS, 2016). A presença concomitante de enterobactina e aerobactina pode dar acesso a fontes de ferro distintas, resultando em maior

crescimento bacteriano no hospedeiro (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Portanto, foi observado que amostras que produzem mais de um sideróforo apresentam maior virulência (LAWLOR et al., 2007).

Ainda, no que se refere à utilização de metabólitos, pode-se destacar também a alantoína, que é um composto químico formado como resultado da degradação do ácido úrico e é uma das formas de excreção de nitrogênio por alguns mamíferos. O nitrogênio é uma molécula essencial para os micro-organismos, por ser um dos componentes principais de quase todas as macromoléculas. Assim, quando as fontes primárias de nitrogênio estão reduzidas ou não estão disponíveis, diferentes fontes de nitrogênio como purinas, proteínas ou alantoína precisam ser utilizadas. A capacidade de metabolização da alantoína é outro mecanismo descrito em *K. pneumoniae*, que pode auxiliar na competição por fontes de nitrogênio e ser um importante fator associado à virulência dessa espécie. A presença do gene *allS* em amostras de *K. pneumoniae* propicia a utilização da alantoína como única fonte de nitrogênio, carbono e energia em condições aeróbicas e anaeróbicas (CHOU et al., 2004).

A produção de urease citoplasmática para hidrolisar ureia em amônia e dióxido de carbono como fonte de nitrogênio para crescimento é comum a muitos patógenos intestinais, incluindo *K. pneumoniae*. O operon *ureDABCEFG* codifica subunidades estruturais (UreA, UreB e UreC) da metaloenzima urease e proteínas de ligação a níquel acessórias (UreD, UreE, UreF e UreG) que são responsáveis pela incorporação de íons de níquel no local ativo da enzima urease (LEE et al., 1992). A inativação do metabolismo da ureia, baseado na urease em *K. pneumoniae*, prejudicaria o crescimento deste patógeno no trato gastrointestinal do hospedeiro, onde a ureia é abundante (MARONCLE et al., 2006).

### **1.3. Agentes Antimicrobianos**

Os antimicrobianos ou antibióticos são compostos que apresentam ação inibitória contra diferentes tipos de micro-organismos patogênicos e são agrupados como antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais

(DHANASEKARAN et al., 2015). No entanto, a palavra antibiótico tornou-se sinônimo de "droga antibacteriana". Portanto, neste documento, o termo antibiótico ou antimicrobiano foi definido como fármacos utilizados para o tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana.

Os antimicrobianos têm atuação na interferência do crescimento da bactéria (efeito bacteriostático) e/ou indução da sua morte (efeito bactericida ou bacteriolítico), inviabilizando-a, com mínimo prejuízo ao seu hospedeiro, caracterizando o princípio da toxicidade seletiva (DRAWZ & BONOMO, 2010; HARRIS & THORARENSEN, 2004).

Com o emprego dos antibióticos no controle das infecções microbianas na década de 1940, começou-se a acreditar que estas enfermidades seriam brevemente eliminadas. Porém, ao longo dos anos, a sua ação frente aos micro-organismos promoveu a emergência de patógenos resistentes a estas drogas. A resistência tornou-se um problema clínico substancial, de modo que, para suprir a necessidade de novos antibióticos, nos anos que se seguiram, vários novos compostos foram descobertos, desenvolvidos e implantados, restaurando a confiança (STRYJEWski & COREY, 2010; VENTOLA, 2015).

Os antimicrobianos podem ser de origem natural, produzidos por micro-organismos; semi-sintéticos, desenvolvidos a partir de moléculas naturais já existentes que são modificadas em laboratório; e quimioterápicos, moléculas sintetizadas totalmente em laboratório (TORTORA, 2005; TRABULSI, 2005; RAVAT et al., 2010). São distribuídos em grupos de acordo com seus mecanismos de ação contra a célula bacteriana (TAVARES, 2001; PAGÈS 2004; FLUHR et al., 2010). A classificação dos principais antimicrobianos e seus mecanismos de ação podem ser vistos na tabela 1.

Devido à variedade de patógenos e mecanismos de resistência detectados em unidades assistência à saúde, as infecções causadas por enterobactérias são geralmente tratadas com  $\beta$ -lactâmicos ou quinolonas, em alguns casos associados aos aminoglicosídeos (MINARINI, 2008; PAPP-WALLACE et al., 2011).

**Tabela 1** - Classificação dos antimicrobianos segundo Tenover et al., 2006.

| Mecanismo de ação                            | Mecanismo de ação específico   | Classe (Exemplo de antimicrobianos)  |
|--|--|--|
| Interferência na síntese da parede celular   | Ligação às PBPs (Penicillin Binding Protein), inibindo a síntese do peptidoglicano           | $\beta$ -lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos)                     |
|  | Inibição da enzima MurA, inibindo a primeira etapa da síntese do peptidoglicano              | Fosfomicinas   |
|  | Ligação à D-alanina, inibindo a síntese do peptidoglicano                                    | Glicopeptídeos (Vancomicina e Teicoplanina)  |
| Inibição da síntese proteica                 | Ligam-se à subunidade ribossomal 50S, inibindo a síntese proteica                            | Cloranfenicol, Macrolídeos, Estreptograminas, Lincosamidas (Clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolida) |
|  | Ligam-se à subunidade ribossomal 30S, inibindo a síntese proteica                            | Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), Glicilciclina (Tigeciclina) e Tetracilinas                 |
| Interferência na síntese de ácidos nucleicos | Inibe a síntese de DNA através da ligação com DNA girase e DNA topoisomerase                 | Quinolonas (Ciprofloxacina)  |
|  | Inibe a síntese de RNA através da ligação com RNA polimerase                                 | Rifampicina  |
| Inibição de vias metabólicas                 | Inibe a via de síntese do ácido fólico   | Sulfonamidas e Pirimidinas   |
| Dano à membrana citoplasmática               | Ligam-se aos LPS presentes nas membranas externas bacterianas, alterando sua permeabilidade. | Polimixinas (Polimixina B e Colistina)   |

#### 1.4. Resistência aos Antimicrobianos

Entende-se que resistência bacteriana seja a capacidade de um micro-organismo de crescer *in vitro* na presença de determinado antimicrobiano com concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pelo fármaco no sítio da infecção (CALVO, 2009; HOIBY et al., 2010).

Com a descoberta dos antimicrobianos e sua utilização indiscriminada nos anos subsequentes, começou-se a observar o fenômeno de resistência juntamente com a disseminação de cepas resistentes (WHO, 2014; GIEDRAITIENÉ et al., 2011). Apesar da resistência aos antibióticos ser um fenômeno natural, devido ao fato das bactérias evoluírem para resistir à ação de produtos antibacterianos naturais por bilhões de anos (BLAIR et al., 2014), a associação entre o uso irracional de antimicrobianos e o posterior aparecimento de isolados bacterianos resistentes foi uma evidência clara do efeito seletivo dos antimicrobianos (VILELA, 2009).

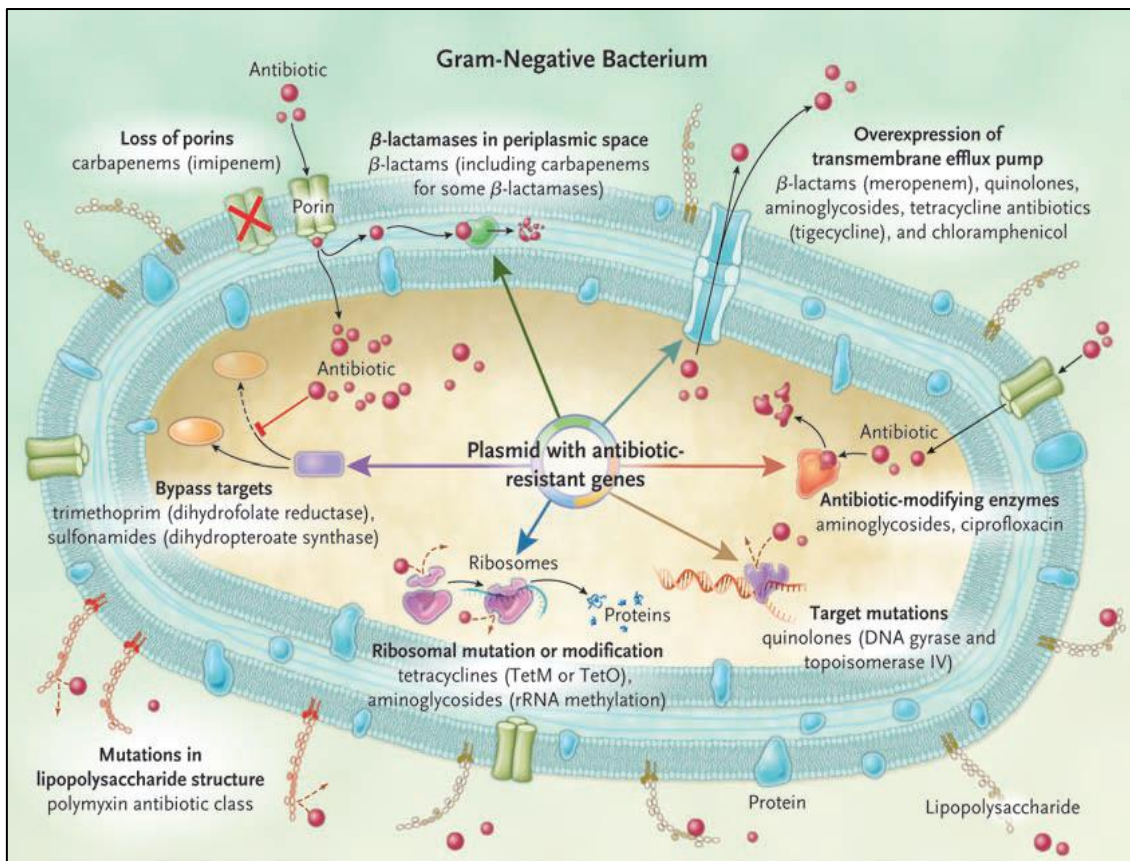
As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antimicrobianos, mas também podem adquirir resistência aos antibióticos. A resistência intrínseca de um grupo bacteriano a um antibiótico específico é a capacidade de resistir à ação desse antibiótico como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes (BLAIR et al., 2014).

A resistência adquirida ocorre quando uma bactéria previamente sensível a determinado antibiótico desenvolve resistência, podendo ser causada por mutações espontâneas ou por aquisição de material genético exógeno que contenha genes associados à resistência (LI et al., 2007; RUPPÉ et al., 2015). Essa aquisição de material genético pode ocorrer por eventos genéticos como a transformação, conjugação e transdução (LI et al., 2007).

Ao se multiplicarem, cepas resistentes podem passar os seus genes de resistência por transferência vertical para as células filhas, ou realizar troca genética de determinantes de resistência entre diferentes espécies de bactérias, o que favorece a disseminação dessas cepas (FLUIT & SCHMITZ, 2004; LI et al., 2007; ANDERSSON et al., 2010).

As bactérias podem se tornar resistentes aos antimicrobianos por meio de alguns mecanismos já bem difundidos na literatura (BLAIR et al., 2014; RUPPÉ et al., 2015). A figura 4 mostra a representação esquemática dos mecanismos de resistência que se dividem em quatro grupos principais:

- Modificação ou inativação do agente antimicrobiano;
- Alteração do sítio alvo da droga;
- Diminuição da permeabilidade celular ao antimicrobiano;
- Sistemas de efluxo.



**Figura 4** – Mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas e os antibióticos afetados. Fonte: Peleg & Hooper, 2010.

Os problemas com cepas resistentes vêm se agravando ao longo dos anos, em todo o mundo, colocando em risco a eficácia de antibióticos. A crise de resistência aos antibióticos tem sido atribuída ao uso excessivo e/ou indevido desses medicamentos, bem como à falta de desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica devido a incentivos econômicos reduzidos e requisitos regulatórios desafiadores (VENTOLA, 2015).

Em pleno século XXI, o desafio imposto pela resistência bacteriana se mostra ainda mais crítico, face ao crescente aparecimento de cepas bacterianas multi-droga resistentes (MDR) (LI et al., 2007; ANDERSSON et al., 2010). Uma série de bactérias foi classificada como ameaças urgentes, graves e preocupantes, muitas das quais já são responsáveis por colocar um substancial fardo clínico e financeiro sobre os sistemas de saúde, dentre elas encontra-se *K. pneumoniae* (VENTOLA, 2015).

Em 2012, Magiorakos e colaboradores definiram como MDR aqueles isolados que apresentam não susceptibilidade adquirida a pelo menos um

agente em três ou mais categorias antimicrobianas; isolados XDR (do inglês *extensively-drug resistant*) apresentam não susceptibilidade adquirida a pelo menos um ou dois agentes em todas as categorias de antimicrobianos e isolados PDR (do inglês *pandrug resistant*) apresentam não susceptibilidade adquirida a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (MAGIORAKOS et al., 2012).

A resistência bacteriana demonstra ser um fator importante a ser considerado, visto que a complexidade dos mecanismos de resistência exibida pelos patógenos bacterianos está em constante desenvolvimento (TENOVER, 2006) e a compreensão dos mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias para a terapia anti-infecciosa (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

#### **1.4.1. Associações da resistência bacteriana com elementos genéticos**

Os elementos genéticos móveis são os principais meios de propagação e acúmulo de genes de resistência. Alguns elementos genéticos, como plasmídeos, transposons, integrons e sequências de inserção (IS – *Insertion Sequences*) servem como veículos para a transmissão de material genético entre uma mesma espécie ou espécies diferentes e contribuem grandemente para a rápida disseminação da resistência antimicrobiana entre vários gêneros bacterianos de importância humana e veterinária (CAG et al., 2016).

Os genes de resistência antimicrobiana demonstraram acumular-se em elementos móveis, levando a uma situação em que os fenótipos de resistência a múltiplos fármacos podem ser transferidos para um receptor suscetível através de um único evento genético. A participação desses elementos genéticos tem sido relatada como um dos maiores fatores de desenvolvimento de multirresistência bacteriana nos últimos 50 anos (MAZEL, 2006).

##### **1.4.1.1. Plasmídeos**

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA de fita dupla geralmente circulares extra-cromossômicas, que estão localizados no



citoplasma das células bacterianas e que possuem a capacidade de replicação autônoma, ou seja, independente do cromossomo bacteriano (CARATTOLI, 2009; LEAVITT et al., 2010). Por definição, os plasmídeos não possuem genes essenciais para o crescimento das células que os hospedam (THOMAS & NIELSEN, 2005),

Plasmídeos podem promover a transferência horizontal entre bactérias de diferentes gêneros através do processo de conjugação e a maioria dos plasmídeos conferem fenótipos positivamente selecionáveis com a presença de genes de resistência antimicrobiana, além da capacidade de portar genes responsáveis por processos de virulência, toxinas, produção de antibióticos, entre outros (CARATTOLI, 2009; CUZÓN et al., 2011; LEAVITT et al., 2010).

A rápida disseminação de importantes determinantes de resistência a antimicrobianos é atribuída à presença de plasmídeos conjugativos nestes isolados bacterianos, conferindo uma vantagem aos micro-organismos que em ambientes onde existe grande pressão seletiva, como em unidades hospitalares (CARATTOLI, 2009; LEAVITT et al., 2010; QUEENAN & BUSH, 2007)

#### **1.4.1.2. Sequencias de inserção e transposons**

As ISs são elementos curtos de DNA transponível, composto de um ou dois genes que codificam uma transposase, uma proteína com atividade de recombinase, juntamente com sequências repetidas invertidas (IR - *Inverted Repeats*) flanqueadoras, de vários comprimentos, que reconhecem e se inserem em sítios específicos no DNA (NEVERS & SAEDLER, 1977).

Os transposons também são segmentos de DNA com grande mobilidade, através da codificação das transposases, que realizam transposição para outros segmentos de DNA. Sua inserção cria diversas variações no DNA hospedeiro (BENNET, 2008). Dois diferentes tipos de transposons (Transposon simples e transposon composto) estão relacionados a bactérias e sua presença na célula bacteriana pode proporcionar vantagem seletiva, uma vez que muitos dos transposons carregam genes de resistência aos antimicrobianos (SKIPPER et al., 2013).

Os transposons compostos normalmente são flanqueados por duas ISs idênticas, que apresentam papel crucial para a transposição do fragmento de DNA (SIEFERT, 2009). Já os transposons simples não apresentam as ISs flanqueando, a transposição é dependente das IRs (SKIPPER et al., 2013).

Diversos transposons já caracterizados, tiveram sua relação com a disseminação de genes de resistência estabelecidas. Devido a sua alta mobilidade no genoma bacteriano, comumente os transposons podem estar associados à plasmídeos conjugativos, facilitando também a mobilidade de genes de resistência entre diferentes micro-organismos (CUZÓN et a., 2011).

#### **1.4.1.3. Integrons**

Integrons são elementos de aquisição de genes, associados à resistência bacteriana, que podem adquirir mobilidade quando associados à transposons ou plasmídeos. Apresentam função de rearranjar genes e inseri-los dentro da sua região variável, bem como expressá-los (CAMBRAY et al., 2010).

A enzima integrase é responsável pelo rearranjo dos genes. Cinco classes de integron foram caracterizadas por seu papel na disseminação de genes de resistência com base na sequência das integrases codificadas. Os integrons de classe 1, 2 são os principais envolvidos com fenótipos de multirresistência a antibióticos. Integrons de classe 1 são encontrados extensivamente em isolados clínicos (MAZEL et al., 2006).

Estruturalmente os integrons de classe 1 são divididos em duas regiões conservadas e uma região variável entre elas que pode ou não apresentar cassetes gênicos ou variar de um a múltiplos cassetes, dentre os quais, podem estar associados à mecanismos de resistência à diversas drogas antimicrobianas (CAMBRAY et al., 2010; MAZEL, 2006).

## 1.5. Resistência aos Antimicrobianos em *K. pneumoniae*

### 1.5.1. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos constituem a mais numerosa família de antimicrobianos utilizada na prática clínica. O uso é extenso em infecções comunitárias ou hospitalares, devido ao seu amplo espectro de atividade e baixa toxicidade. (KONG et al., 2010). O anel  $\beta$ -lactâmico é a estrutura comum a todos os antimicrobianos dessa família, sendo responsável por sua atividade ao ligar-se ao sítio ativo na célula bacteriana. Porém, para que tenha atividade, o anel  $\beta$ -lactâmico deve estar ligado a outro radical, geralmente outro anel. Os radicais e a estrutura formada pelos dois anéis básicos classificam os  $\beta$ -lactâmicos em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamases (KONG et al., 2010).

Esses antimicrobianos agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana pela sua ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas – *penicillin bind protein* (PBPs). Estes antibióticos atuam bloqueando a transpeptidação, ligação covalente das cadeias lineares de fragmentos precursores do peptidoglicano, catalisada pelas transpeptidases (também chamadas PBPs). O antibiótico  $\beta$ -lactâmico é um análogo estereoquímico do segmento ativo das PBPs, o que torna tais enzimas indisponíveis para o funcionamento, desestruturando a camada de peptidoglicano da célula bacteriana e predispondo a bactéria à lise celular (SAMPAIO, 2007; NETO et al., 2007).

Em *K. pneumoniae*, são três os mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos: hiperexpressão dos sistemas de efluxo, diminuição da permeabilidade celular e principalmente a produção de  $\beta$ -lactamases (DRAWZ & BONOMO, 2010), enquanto que a alteração nas PBPs é um mecanismo essencialmente mais prevalente em cocos Gram-positivos (ZAPUN, 2008).

Bombas de efluxo também têm sido descritas relacionadas à resistência à  $\beta$ -lactâmicos em *K. pneumoniae*, a hiperexpressão de sistemas de efluxo que tem como substrato os  $\beta$ -lactâmicos colabora ejetando o antimicrobiano, minimizando desta forma os danos causados pelo antimicrobiano (POOLE, 2005). O sistema de efluxo AcrAB-TolC tem sido apontado como um dos mais

relevantes, relacionado à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (SUN et al., 2014; PADILLA et al., 2010).

As porinas mais importantes em *K. pneumoniae* são a OmpK35 e OmpK36 e a perda ou a diminuição da expressão de determinada porina se dá por mutações pontuais, inserções e deleções nos genes que as codificam. Tendo sido associadas à diminuição da susceptibilidade a alguns  $\beta$ -lactâmicos, como os carbapenêmicos. Entretanto, este fenômeno geralmente só acarreta na diminuição da susceptibilidade a determinado  $\beta$ -lactâmico e não é suficiente para a produção de fenótipo de resistência total aos  $\beta$ -lactâmicos (JACOBY et al., 2004).

As enzimas  $\beta$ -lactamases constituem um grupo diverso de enzimas, que tem em comum a capacidade de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, tornando o antimicrobiano inativo e impedindo que este apresente atividade sobre enzimas que atuam na síntese da parede celular bacteriana. Essas enzimas inicialmente acilam os  $\beta$ -lactâmicos e a seguir atuam hidrolisando-os, o que permite a regeneração de sua capacidade catalítica, tornando-as disponíveis para atuar em outra catálise (DRAWZ & BONOMO, 2010).

Diferentes tipos de  $\beta$ -lactamases já foram descritos e inúmeras tentativas de estabelecer um sistema de classificação foram propostas. Atualmente, duas classificações têm sido consideradas (Tabela 2): Classificação de Ambler (1980), com base na estrutura molecular e na homologia da sequência de aminoácidos; e a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), baseada na atividade enzimática, características estruturais e propriedades inibitórias (BUSH et al., 2010).

*K. pneumoniae* possui características intrínsecas que a tornam naturalmente resistente a algumas classes de antibióticos. A presença constitutiva de genes de  $\beta$ -lactamases como: *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>LEN</sub> é responsável por este fenótipo. Estas  $\beta$ -lactamases conferem resistência à penicilina e cefalosporinas de espectro restrito (HÆGGMAN et al., 2004).

A resistência adquirida também pode envolver a transferência lateral/horizontal de genes codificadores de enzimas que metabolizam os antibióticos, como os genes de  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PSE</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> que

apresentam alta prevalência em *Klebsiella* (LIVERMORE & BROWN 2001; MARRA et al., 2006), sendo encontrados frequentemente associados aos plasmídeos. Diversas classes de  $\beta$ -lactamases, com genes codificantes presentes em plasmídeos, já foram relatadas em membros da família Enterobacteriaceae, inclusive em *K. pneumoniae* (CHEN et al., 2009).

**Tabela 2** – Esquema de classificação de  $\beta$ -lactamases (adaptado de Bush et al., 2010).

| <b>Grupo Funcional Bush-Jacob</b> | <b>Classe Molecular Ambler</b> | <b>Exemplos</b>                        | <b>Características</b>  |
|-----------------------------------|--------------------------------|--|---|
| 1                                 | C                              | CMY-2, FOX-1, MIR-1.                   | Hidrolizam todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenêmicos. Não são inibidas por clavulanato e tazobactam.                                |
| 1e                                | C                              | GC1, CMY-37.                           | Hidrolizam penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.   |
| 2a                                | A                              | PC1 e outras penicilinases             | Hidrolizam penicilinas. Inibidas por clavulanato e tazobactam.  |
| 2b                                | A                              | SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.           | Hidrolizam penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração, inibidas por clavulanato e tazobactam.   |
| 2be                               | A                              | CTX-M-15, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-26, | Hidrolizam penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (ESBL).   |
| 2br                               | A                              | TEM-30, TEM-103, SHV-10                | Hidrolizam penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, pouco inibidas por clavulanato  |
| 2ber                              | A                              | TEM-50, TEM-68, TEM-89                 | Hidrolizam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por clavulanato e tazobactam.                                     |
| 2c                                | A                              | PSE-1, CARB-3                          | Hidrolizam penicilinas e carbenicilina, inibidas por clavulanato.   |
| 2d                                | D                              | OXA-1, OXA-10                          | Hidrolizam cloxacilina, levemente inibidas por clavulanato.   |
| 2de                               | D                              | OXA-11, OXA-15                         | Hidrolizam penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por clavulanato.  |
| 2df                               | D                              | OXA-23, OXA-48                         | Hidrolisam carbapenêmicos e cloxacilina, pouco inibidas por clavulanato.  |
| 2e                                | A                              | CepA                                   | Hidrolisam cefalosporinas, exceto aztreonam e são inibidas por clavulanato e tazobactam   |
| 2f                                | A                              | IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2      | Hidrolisam carbapenêmicos e possuem uma serina no seu sítio ativo. Pouco inibidas por clavulanato e tazobactam.                               |
| 3a                                | B                              | IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1                | Hidrolisam todos os $\beta$ -lactâmicos exceto aztreonam. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por clavulanato e tazobactam. |
| 3b                                | B                              | CphA, Sfh-1                            | Hidrolisam preferencialmente carbapenêmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por clavulanato e tazobactam.              |

Alguns genes de  $\beta$ -lactamases sofreram mutações pontuais em sua sequência nucleotídica ao longo dos anos, dando origem às denominadas de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). Essas enzimas se destacam pela capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (exceto as cefamicinas) e o aztreonam (BUSH, 2010; PATERSON & BONOMO, 2005).

As ESBLs são enzimas das classes moleculares A ou D (classificação de Ambler) primordialmente produzidas por membros da família Enterobacteriaceae, em particular *K. pneumoniae* (PITOUT & LAUPLAND, 2008). A emergência da disseminação destas enzimas em diferentes espécies bacterianas compromete o uso dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos no tratamento de infecções, visto que este mecanismo está amplamente disseminado por todo mundo (BUSH, 2010; DHILLON & CLARK, 2012).

As ESBLs mais frequentemente encontradas pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M. No entanto, as do tipo OXA, PER, VEB, BES e GES também tem sido bastante reportadas na literatura (PATERSON, 2006). Dentre as ESBLs as cefotaximases CTX-M, enzimas que apresentam como substrato preferencial a cefotaxima, são as mais prevalentes entre isolados de *K. pneumoniae* (BUSH, 2010; PITOUT et al., 2005). Atualmente, existem aproximadamente 200 variantes de CTX-M (Genbank - NCBI), este alto número de variantes deve-se as constantes mutações no gene codificador *bla*<sub>CTX-M-like</sub>, resultando em diferentes enzimas, com padrões hidrolíticos distintos (CERGOLE-NOVELLA et al., 2010; DHILLON & CLARK, 2012).

No Brasil, 30 a 60% das *Klebsiella* spp. são produtoras de ESBL (PATERSON & BONOMO, 2005). Estudos demonstraram a alta prevalência do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> em diferentes clones de *K. pneumoniae*, provavelmente devido à localização destes genes em plasmídeos e integrons de classe 1, o que permite a transferência e expressão dos genes entre diferentes isolados de *K. pneumoniae* (TOLLENTINO, et al. 2011; OLIVEIRA GARCIA, et al. 2008).

Com o aumento do isolamento de amostras produtoras de ESBL, os carbapenêmicos passaram a ser amplamente utilizados como alternativa para tratamento, pois apresentam espectro de ação elevado e maior estabilidade

frente às ESBL. Com o aumento da prescrição destes antimicrobianos, começaram a surgir amostras apresentando fenômenos de resistência. A resistência aos carbapenêmicos pode ser mediada por diferentes mecanismos, entretanto a produção de carbapenemases (beta-lactamases com atividade sobre carbapenêmicos) é o mecanismo epidemiologicamente mais importante (QUEENAN & BUSH, 2007).

As enzimas carbapenemases têm se difundido gradualmente ao longo da última década entre os isolados da família Enterobacteriaceae. Localizadas em elementos genéticos altamente móveis, estas enzimas têm estabelecido a sua bem sucedida presença em clones bacterianos, sinalizando o prelúdio de uma nova era endêmica no ambiente hospitalar (VOULGARI, 2013).

As carbapenemases são as mais versáteis, pela alta capacidade de hidrólise da maioria dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, além de apresentar uma fraca inibição por inibidores de  $\beta$ -lactamases comerciais (QUEENAN; BUSH, 2007). Estas enzimas têm em comum a capacidade de hidrolisar, pelo menos, imipenem ou meropenem juntamente com outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, penicilinas e cefalosporinas (NORDMANN, 2002).

Desde sua descoberta em bactérias de importância clínica, as carbapenemases têm atraído atenção crescente, devido ao seu significado clínico (WALSH, 2008). Podem ser distinguidas nas classes moleculares A (serino-carbapenemases), B (Metallo- $\beta$ -lactamase - MBL) e D (oxacilinas), podendo ter seus genes codificadores localizados em cromossomos ou plasmídeos (NORDMANN & POIREL, 2014). Dentre as várias carbapenemases descritas, as que têm sido mais associadas à *K. pneumoniae* são as do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), NDM (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase) e OXA-48-like.

#### **1.5.1.1. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)**

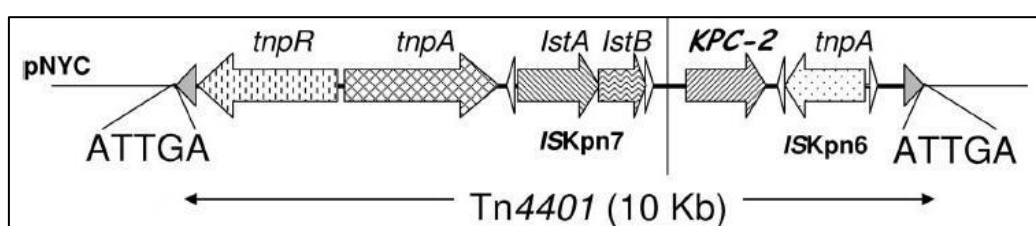
Esta enzima é considerada a carbapenemase de classe A de maior importância devido sua hidrólise mais eficiente dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos quando comparado a outras enzimas da mesma classe (QUEENAN & BUSH, 2007). Esta carbapenemase é capaz de hidrolisar  $\beta$ -lactâmicos de todas as

classes, apresentando maior potencial de hidrólise para cefalotina, nitrocefina, benzipenicilina, ampicilina e piperacilina (BUSH & FISHER, 2011).

O primeiro relato dessa enzima ocorreu em 2001 a partir de um isolado de *K. pneumoniae* datado de 1996, nos Estados Unidos e seu nome refere-se à espécie *K. pneumoniae* na qual KPC-1 foi identificada. Tempos depois, uma variante KPC-2 foi descrita em *Klebsiella* sp. e *Salmonella enterica*, porém uma correção da sequência do gene codificante de KPC-1 indicou que  $bla_{KPC-1}$  e  $bla_{KPC-2}$  eram idênticas (YIGIT et al., 2003).

Mutações do gene estrutural da enzima  $bla_{KPC-2}$  têm resultado em novas variantes, diferindo umas das outras por algumas trocas de aminoácidos (WALTHER-RASMUSSEN & HOIBY, 2007). Atualmente são conhecidos 24 alelos para KPC (GENBANK - NCBI, 2017).

*K. pneumoniae* produtoras de KPC vêm sendo frequentemente encontradas em diversas regiões do mundo (GUPTA, 2011), demonstrando a grande capacidade de disseminação desta enzima, cujo gene codificante de localização plasmideal geralmente está contido no elemento genético móvel identificado como Tn4401 (Fig. 5). Este elemento possui cerca de 10 kb e é composto por sequências repetitivas invertidas imperfeitas, um gene de transposase, um gene de resolvase e duas IS, denominadas *ISKpn6* e *ISKpn7* (NAAS et al., 2008, GOOTZ et al., 2009).



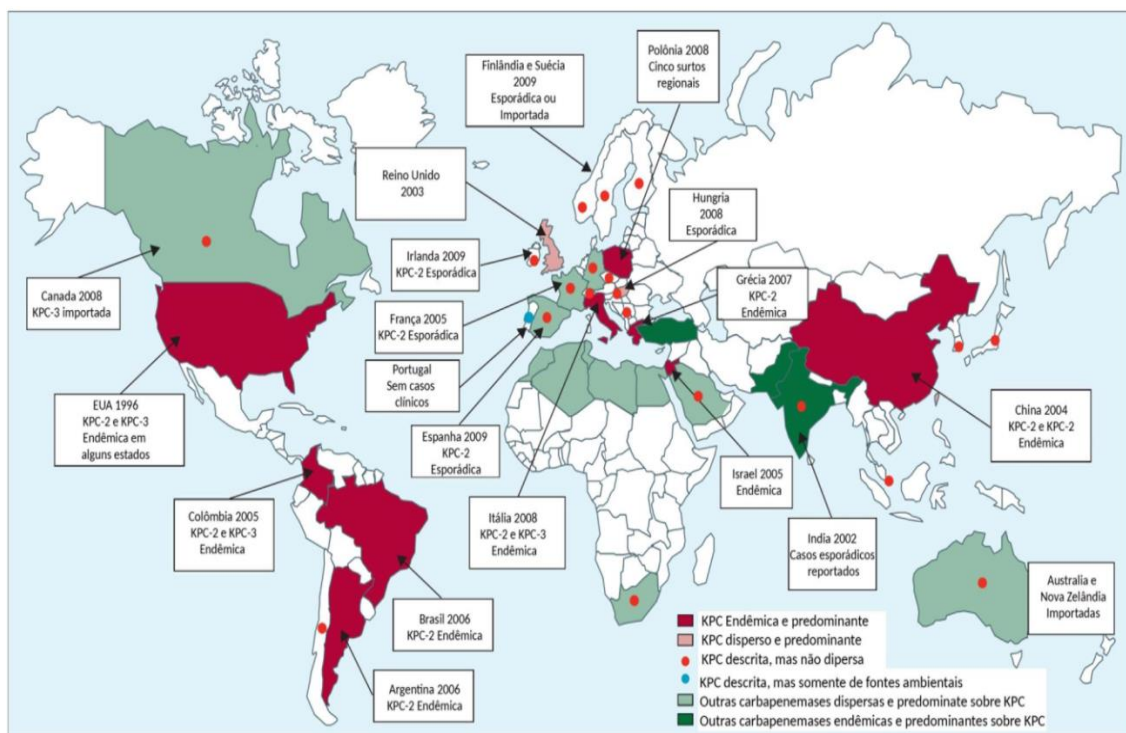
**Figura 5** – Representação do Transposon Tn4401. Fonte: adaptado de Naas et al., 2008.

Variações desse elemento genético têm sido descritas e são caracterizadas por mutações na região da *ISKpn7*. Até à presente data, foram identificadas oito isoformas Tn4401 únicas (Tn4401a - Tn4401h), sendo “a” e “b” os mais difundidos. A caracterização original dessas isoformas se dá pela presença ou não de deleções na região não codificante a montante de  $bla_{KPC}$  e alguns genes: isoforma “a”, -99 pb; isoforma “b”, sem mutação; isoforma “c”, -



215 pb; isoforma “d”, -68 pb e -5,3 kb; isoforma “e”, -255 pb; isoforma “f”, *tnpA* truncado e sem *tnpR*, *ISKpn7* esquerda; isoforma “g”, falta de *tnpA*, *tnpR* e *ISKpn7* esquerda, com uma remoção de -215 pb na região não codificadora; e isoforma “h” -188 pb (CHERUVANKY et al, 2017).

Amostras produtoras de KPC têm sido descritas em diferentes partes do mundo sendo consideradas endêmicas e epidêmicas em algumas partes do globo, incluindo o Brasil (Fig. 6). As enzimas do tipo KPC têm sido apontadas atualmente como as mais significativas clinicamente entre as carbapenemase de classe A devido a sua grande disseminação (NORDMANN & POIREL, 2014).



**Figura 6** - Características epidemiológicas das amostras produtoras de KPC por país de origem. Fonte: adaptado de Munoz-Price et al, 2013.

A disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub> associado aos elementos genéticos móveis, também tem sido associada a clones internacionais de *K. pneumoniae*. Através da técnica de MLST (Multi-locus Sequence Typing), foi possível identificar a associação deste gene à dispersão de amostras pertencentes ao Complexo Clonal 258 (CC258), sendo o ST258 o mais disseminado enquanto

outros sequence types (ST11, ST340, ST437 e ST512) também têm sido descritos, mas em menor proporção (MATHERS et al., 2015).

No Brasil, as primeiras detecções do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> ocorreram em *K. pneumoniae* em 2006 a partir de pacientes internados em Pernambuco, Rio de Janeiro, e São Paulo (MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ et al., 2009; PEIRANO et al., 2009). Desde então diversos estudos epidemiológicos tem sido realizados, associando estes fenótipos a genótipos e clones específicos (clones pertencentes ao CC258) e sua capacidade de disseminação (ANDRADE et al., 2011; SEKI et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

Isolados produtores de KPC tornaram-se endêmicos no território nacional, já sendo descritos nas cinco regiões do Brasil (MONTEIRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013; ROSSI, 2011). Até a presente data, apenas os alelos *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>KPC-3</sub> foram detectados em território brasileiro (RIBEIRO et al., 2016; PEREIRA et al., 2013). Em nosso país, o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, que é o mais disseminado, está associado as variantes “a” e “b” do transposon Tn4401 contidos em plasmídeos de diferentes tamanhos e tipos (IncN, IncL/M, IncA/C e IncFII) (ANDRADE et al., 2011; PEREIRA, et al., 2013).

#### **1.5.1.2. New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM)**

Atualmente, a carbapenemase do tipo NDM é a principal MBL de interesse clínico a ser investigada (LASCOLS et al., 2012; CARVALHO-ASSEF et al., 2013; POIREL et al., 2011).

NDM é capaz de inativar quase todos os β-lactâmicos (exceto aztreonam). Desde a primeira descrição da NDM em 2009, na Índia, a partir de isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* oriundos da Suécia (YONG et al., 2009;), bactérias produtoras de NDM foram relatadas em todo o mundo (NORDMANN & POIREL, 2014).

A primeira descrição da enzima NDM no Brasil ocorreu em um isolado de *Providencia rettgeri* do Estado do Rio Grande do Sul, em 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). A partir daí, houve outros relatos, inclusive envolvendo *K. pneumoniae* (CARNEIRO, 2014). A publicação do genoma de um isolado de *K. pneumoniae* produtor de NDM do Rio de Janeiro revelou um

grande arsenal de genes de resistência a diferentes classes antimicrobianas (PEREIRA et al., 2015). Estes relatos chamam a atenção para a necessidade de adoção de medidas eficazes para controlar a propagação desta importante carbapenemase (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

Dados recentes, oriundos da caracterização de isolados de *Klebsiella* que produzem NDM-1 do Rio de Janeiro, indicam que a maioria dos isolados apresentava múltiplos genes de resistência. Porém, diferentemente do que ocorre com as cepas produtoras de KPC, a disseminação do gene *bla*<sub>NDM</sub> que codifica a enzima não está associada à expansão clonal, mas parece estar aparentemente associada a um transposon Tn3000 (AIRES et al., 2017a).

### 1.5.1.3. OXA-48-like

As  $\beta$ -lactamases de Classe D do tipo OXA-48 são cada vez mais relatadas em Enterobacteriaceae em todo o mundo. A maioria dessas enzimas hidrolisam penicilinas em alto nível e carbapenêmicos em um nível baixo e não são suscetíveis aos inibidores de  $\beta$ -lactamase mais antigos (POIREL et al., 2012).

Contudo, nem todas as variantes OXA-48 possuem atividade significativa contra carbapenêmicos. Estas variantes diferem por algumas substituições de aminoácidos ou por amino deleções de ácido que resultam em espectro de hidrólise modificado (DORTET et al., 2015).

O primeiro relato de OXA-48 ocorreu em 2001, em *K. pneumoniae* proveniente da Turquia. O gene *bla*<sub>OXA-48</sub> foi identificado em plasmídeos, associado a estrutura denominada Tn1999 (POIREL et al., 2004). Após a primeira descrição, este gene tem sido identificado em muitos outros países, predominantemente em amostras de *K. pneumoniae*. A presença de amostras produtoras de OXA-48 têm sido endêmica para países do Oriente Médio e do norte de África (POTRON et al., 2013).

Em 2014 ocorreu o primeiro relato de OXA-48-like no Brasil envolvendo bactérias coletados em 2013 no Rio Grande do Sul (PINTO et al., 2014). Um estudo no mesmo ano descreveu no Brasil uma variante da OXA-48

denominada OXA-370 (SAMPAIO et al., 2014). Simultaneamente, isolados produtores de OXA-370, incluindo *K. pneumoniae* coletados entre 2013 e 2014 foram relatados no Rio de Janeiro, sendo que 95% desses isolados de *K. pneumoniae* representaram uma propagação clonal de ST16 em 3 hospitais (PEREIRA et al., 2015). Nesta tese, identificamos um isolado de *K. pneumoniae* ST17 produtor de OXA-370, isolado em 2012, anterior ao primeiro relato (AIRES et al., 2016a).

### **1.5.2. Resistencia a aminoglicosídeos**

Todos os aminoglicosídeos apresentam o mesmo mecanismo de ação, ligando-se ao RNA ribossomal bacteriano, induzindo alterações conformacionais que resultam na tradução errônea das proteínas. (WACHINO & ARAKAWA, 2012). O ribossomo bacteriano é formado por três moléculas de RNA e mais de 50 proteínas. Consiste na subunidade maior (50S) composta pelas moléculas de RNA 5S e 23S e mais 33 proteínas, e subunidade menor (30S) composta pelo RNA 16S e cerca de 20 proteínas (VAKULENKO & MOBASHERY, 2003).

Os aminoglicosídeos ligam-se ao sítio A da porção 16S da subunidade 30S, porção esta que desempenha papel crucial para a alta fidelidade da tradução do material genético. A ligação dos aminoglicosídeos no sítio A, impede a translocação do RNA transportador ao seu anticódon específico impedindo a correta leitura da fita de RNA mensageiro ocasionando erros de tradução e posterior morte bacteriana (PINSETA, 2010; VAKULENKO & MOBASHERY, 2003).

Os antimicrobianos mais frequentemente prescritos na prática clínica são a tobramicina, amicacina e gentamicina, enquanto a estreptomicina ainda é largamente utilizada para o tratamento da tuberculose, brucelose, tularemia e peste bubônica (PINSETA, 2010).

A bomba de efluxo AcrAB-TolC está envolvida na resistência aos aminoglicosídeos e outras drogas. Expressão aumentada desta bomba, devido a alterações na transcrição de genes envolvidos na regulação e/ou expressão

deste sistema de efluxo, acarreta em um aumento nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) (HASDEMIR, et al. 2004; PADILLA, et al. 2010).

O mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos mais comumente encontrado em enterobactérias é a modificação enzimática, que é mediada por três classes de enzimas, as acetiltransferases (AACs), as nucleotidiltransferases (ANTs) e as fosfotransferases (APHs). Estas enzimas catalisam a modificação nos radicais ou nas moléculas de açúcar desses antimicrobianos, gerando um fármaco quimicamente modificado com reduzida afinidade de ligação aos ribossomos. (DOI & ARAKAWA, 2007; RAMIREZ & TOLMASKY, 2010). Conhecidas como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMA), sua presença em bactérias eleva os valores das CIMs em mais de 10 vezes, principalmente para a gentamicina (DURANTE-MAGONI et al., 2009).

As AACs promovem acetilação, usando Acetil Coenzima A como doador; as ANTs promovem a transferência de um AMP proveniente do ATP para a molécula do aminoglicosídeo; e APHs catalisam a transferência de um grupo fosfato para a molécula de aminoglicosídeo. Além de serem classificadas de acordo com as alterações que provocam na molécula de antimicrobiano, as EMAs também são subdivididas em subclasses baseadas na posição onde provocam esta alteração no antimicrobiano e espectro de atividade em relação aos antimicrobianos da classe (VAKULENKO & MOBASHERY, 2003; RAMIREZ & TOLMASKY, 2010).

Diversas EMAs são comumente reportadas em isolados MDR, produtores de  $\beta$ -lactamases. Normalmente, esses genes estão localizados em integron de classe 1, reforçando papel crucial desse elemento genético na disseminação dos genes codificadores dessas enzimas (PEIRANO et al., 2009; VINUÉ et al., 2008).

Encontradas comumente em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, as enzimas da família AAC(6') geralmente estão associadas a elementos genéticos tais como sequencias de inserção, transposons, integrons e plasmídeos. A enzima AAC(6')-Ib é provavelmente a acetiltransferase com maior relevância na clínica, tendo sido descrita em cerca de 70% dos Gram-negativos de origem clínica (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010). A variante

AAC(6')-Ib-cr, que possui modificação em dois aminoácidos (Trp102Arg, Asp179Tyr), apresenta atividade tanto para aminoglicosídeos quanto para quinolonas. Esta variante tem sido detectada em várias regiões geográficas associada a outros genes de importância epidemiológica como *qnr* (associados à resistência à quinolonas) e genes codificadores de  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX-M</sub>; *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>KPC</sub>) (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010).

Essa classe de antimicrobianos é naturalmente produzida por Actinomicetos, assim, para tornarem-se inertes aos aminoglicosídeos produzidos, essas bactérias lançam mão da metilação da porção 16S do RNA ribossomal contido na subunidade ribossomal 30S (DOI & ARAKAWA, 2007). O mecanismo de resistência consiste na adição de grupos metil ao ribossomo bacteriano por enzimas denominadas de metilases, tal modificação impede a ligação do aminoglicosídeo com a subunidade 30S, garantindo um alto nível de resistência a quase todos os aminoglicosídeos disponíveis (DURANTE-MAGONE et al., 2009; WACHINO & ARAKAWA, 2012).

Até alguns anos atrás, os genes que codificavam a 16S rRNA metilases somente tinham sido restritos nos produtores de aminoglicosídeos, mas a partir das últimas duas décadas, genes semelhantes têm sido descritos em isolados clínicos de patógenos Gram-negativos humanos, incluindo *K. pneumoniae* (DOI & ARAKAWA, 2007). Existem pelo menos dez classes de 16s rRNA metilases reportadas: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH e NpmA. Quase todas já foram detectadas em isolados de *K. pneumoniae*, com baixa prevalência entre produtores de ESBL e KPC e alta prevalência entre os isolados clínicos produtores de NDM (DOI et al., 2016).

A ocorrência das 16s rRNA metilases é mais comum em países da Ásia e Europa. Os genes codificantes dessas enzimas são comumente transportados por elementos genéticos móveis, como integrons e transposons inseridos em plasmídeos, o que contribui para a disseminação desses determinantes de resistência (LIVERMORE, 2012; DOI et al., 2016). No Brasil, as metilases RmtD e RmtG foram descritas em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e CTX-M (BUENO et al., 2013).

### 1.5.3. Resistência a quinolonas

As quinolonas e fluoroquinolonas são potentes antibióticos sintéticos de amplo espectro comumente usados para tratar uma variedade de infecções. Foram introduzidos na prática médica desde o final da década de 1980. Até o momento, existem quatro gerações de quinolonas/fluoroquinolonas em uso clínico; as fluoroquinolonas mais comumente prescritas na prática médica atual são ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina (REDGRAV, 2014).

O mecanismo de ação antimicrobiana das quinolonas consiste fundamentalmente na atuação sobre a replicação do DNA bacteriano. Esses efeitos são mediados pela habilidade desses compostos em estabilizar e inibir as enzimas bacterianas topoisomerases do tipo II (DNA-girase e topoisomerase IV), que controlam o super-enrolamento dentro da célula no momento da replicação, resultando em replicação prejudicada do DNA e morte celular (HOOPER, 2001; DRLICA, 2009).

O alvo preferencial das quinolonas nos bacilos Gram-negativos é a DNA-girase. Essa enzima é um tetrâmero, composta por duas subunidades A e duas subunidades B, as quais são codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV apresenta uma estrutura com duas subunidades A e duas subunidades B codificadas respectivamente, por *parC* e *parE*, homólogos aos genes *gyrA* e *gyrB* (CORBETT et al., 2005).

A resistência as quinolonas pode ocorrer por alteração do alvo, redução da concentração intracelular, proteção do alvo mediada por peptídeos e degradação enzimática (RUIZ, 2003; ROBICSEK & STRAHILEVITZ et al., 2006). Estes mecanismos podem acontecer em genes cromossômicos transferidos verticalmente ou em elementos móveis como plasmídeos que são transferidos horizontalmente (RUIZ, 2003), além disso, estes mecanismos de resistências podem surgir isoladamente ou em combinação, sendo certo que o aumento do grau de resistência às quinolonas se deve à atuação de vários mecanismos em simultâneo (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Com base em dados agrupados de uma série de estudos realizados em diferentes partes do globo, as taxas de resistências às quinolonas entre os isolados de *K. pneumoniae* estão em torno de 80% para norfloxacina, 65%

para ácido nalidíxico, 50% para ciprofloxacina, 52% para ofloxacina, 25% para moxifloxacina (WOLDU, 2015).

A resistência às quinolonas em *K. pneumoniae* ocorre principalmente através de mutações nos genes que codificam a DNA girase e topoisomerasa IV (*gyrA*, *gyrB* e *parC*) em uma região dos genes designada de região determinante de resistência à quinolonas (QRDR - *Quinolone Resistance Determining Region*). São prevalentes as mutações nos códons 83 e 87 em *gyrA* e no códon 80 em *parC* levando a elevadas CIM para ciprofloxacina (YANG et al., 2011; NAGASAKA et al., 2015; XUE et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017).

Modificações nas estruturas de porinas podem conduzir a modificações nos padrões de susceptibilidade bacteriana às quinolonas (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2010), devido a diminuição da penetração intracelular do fármaco. Estas modificações se originam por alterações dos genes que codificam os canais de porinas (TÁLENS-VISCONTI, 2002).

Já o sistema de efluxo tem o papel de remover diversas substâncias do citoplasma ou da membrana citoplasmática. Mutações nos genes repressores do sistema levam a uma hiper-expressão dos mesmos e consequentemente conduz a uma diminuição da concentração do fármaco dentro da célula bacteriana (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2010). Já foi demonstrado que hiper-expressão do sistema de efluxo AcrAB tem influência na resistência à fluoroquinolonas (MAZZARIOL et al., 2002)

Além das mutações em genes cromossômicos, destaca-se a resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR – *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*), que surgiu em meados de 2000 e inclui os genes *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA*, *oqxB*. As proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS, e QnrVC) identificadas inicialmente em um plasmídeo de *K. pneumoniae*, são codificadas por genes com o mesmo nome e conferem baixos níveis de resistência para fluoroquinolonas, protegendo a DNA girase e a topoisomerase IV da ligação com as quinolonas (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998; JACOBY et al., 2014).



Outro gene disseminado através de plasmídeos, denominado *aac(6')-Ib-cr* é um variante do gene *aac(6')-Ib* que codifica uma acetiltransferase ativa contra aminoglicosídeos e estende o espectro de resistência à ciprofloxacina e norfloxacina (STRAHILEVITZ et al., 2009; RAMIREZ & TOLMASKY, 2010). QepA (codificada por *qepA*) e OqxAB (codificada pelos genes *oqxA* e *oqxB*) constituem dois sistemas bomba de efluxo de natureza proteica, codificados por genes de localização plasmideal que promovem a expulsão de fluoroquinolonas para o meio extracelular (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2010).

Em vários países, incluindo o Brasil, a presença de PMQR em isolados clínicos de *K. pneumoniae* é bastante frequente, com destaque para os genes *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, enquanto o gene *qepA* apresenta baixa prevalência. Vale ressaltar que a presença de PMQR está intimamente relacionada a isolados MDR, que apresentam determinantes de resistência à  $\beta$ -lactâmicos (ESBL) e aminoglicosídeos (NAGASAKA et al., 2015; XUE et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017; EL-BADAWY et al., 2017).

#### **1.5.4. Resistencia a polimixinas**

As polimixinas são uma família de antimicrobianos lipopeptídeos cíclicos isolados do *Bacillus polymyxa*, com excelente atividade antimicrobiana contra de bactérias Gram-negativas (PARUSSOLO et al., 2014). Esta classe de antibióticos é composta por um grupo de cinco diferentes polimixinas: A, B, C, D e E. Porém, somente as polimixinas B e E (colistina) são utilizadas clinicamente, devido à alta toxicidade das restantes (ZAVASCKI et al., 2007).

As polimixinas haviam sido mantidas como agentes de reserva por causa de nefrotoxicidade grave e problemas de neurotoxicidade (BERINGER, 2001). Porém, o aumento rápido na prevalência de agentes patogênicos Gram-negativos resistentes a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e todos os  $\beta$ -lactâmicos, levou a reconsideração das polimixinas como uma opção terapêutica válida para pacientes críticos (LANDMAN et al., 2008).

As polimixinas são antibióticos anfipáticos que se ligam ao LPS e moléculas de fosfolipídeos na membrana externa das bactérias Gram-

negativas, deslocando competitivamente as pontes de cálcio e magnésio que os estabilizam (EVANS et al., 1999; HERMSEN et al., 2003). Essa ligação leva a desestabilização da membrana externa da bactéria e mudanças de permeabilidade no arcabouço da célula, extravasamento de conteúdo intracelular e conseqüentemente morte celular (NIKOO et al., 2017).

A resistência à polimixinas em *K. pneumoniae* tem sido relatada globalmente, sendo a espécie mais comumente envolvida neste fenômeno, dentro da família Enterobacteriaceae (GIAMARELLOU, 2016). Apesar das polimixinas ainda apresentarem susceptibilidade significativa na espécie, as taxas de resistência são crescentes em todo o mundo, inclusive no Brasil, e coincidem com o aumento do uso deste antimicrobiano. Os níveis de resistência são ainda maiores em isolados produtores de ESBL e carbapenemases (BARTOLLETTI et al., 2016; GIAMARELLOU, 2016; SAMPAIO & GALES, 2016).

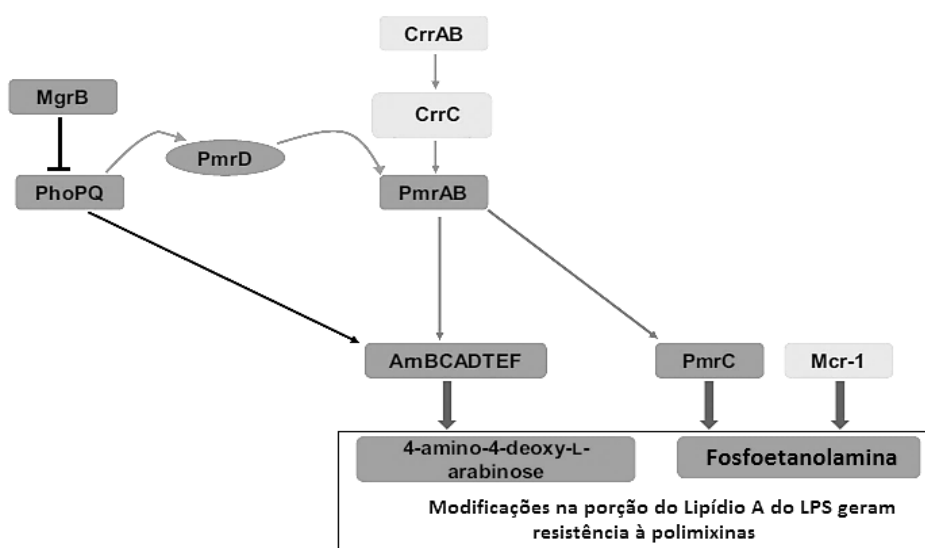
A maioria dos mecanismos que medeiam ou contribuem para a resistência à polimixinas envolvem modificações da fração lipídica A do LPS, que é o principal alvo da droga, reduzindo a afinidade eletrostática entre o antimicrobiano catiónico e o LPS aniónico (CLAUSELL et al., 2007), principalmente pela adição de grupos carregados positivamente, tais como 4-amino-4-deoxy-l-arabinose (L-Ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PEtN) (RAETZ et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2012). Na figura 7 está demonstrado um modelo de ativação dos sistemas envolvidos nas modificações do lipídio A do LPS bacteriano.

As mutações nos sistemas de dois componentes (PhoP-PhoQ e PmrA-PmrB) reguladores da transcrição que controlam as modificações do LPS e/ou inativação da proteína MgrB, um regulador de *feedback* negativo do sistema PhoP-PhoQ, são mecanismos genéticos que levam à resistência às polimixinas (Fig. 7) (OLAITAN et al., 2014). Um novo sistema de dois componentes, CrrAB, também foi descrito como mediador da resistência à colistina em algumas cepas de *K. pneumoniae* por meio da ativação de PmrAB (WRIGHT et al., 2015). Além da via de modificação do LPS, os sistemas de bomba de efluxo AcrAB, KpnEF e a produção aumentada de cápsula são outros mecanismos

únicos descritos como envolvidos na resistência à polimixinas em *K. pneumoniae* (BARON et al., 2016).

Mutações no gene *mgrB* têm sido o mecanismo de resistência à polimixina mais relatado em todo o mundo em *K. pneumoniae*. A maioria das mutações se dá pelo truncamento do gene por uma IS, mas também pode ocorrer mutações ou deleções de nucleotídeos, ou perda do gene. Entre as inserções por elementos IS, a família IS5 é o elemento mais frequente, seguido pela família IS1, que podem se inserir no promotor ou na região de codificação do gene. Este fenômeno demonstra ser estável em diferentes clones frequentemente encontrados em amostras clínicas (BARON et al., 2016).

Até então, a resistência às polimixinas sempre tinha sido associada a mecanismos cromossômicos sem possibilidade de transferência horizontal. No entanto, em 2016, foi reportado um novo mecanismo de resistência à polimixina, que mudou completamente o cenário, tornando a resistência à polimixinas uma preocupação global. O gene *mcr-1* que codifica uma transferase de PEtN, foi detectado em plasmídeos em cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* na China (LIU et al., 2016). Após a descoberta do gene *mcr-1*, variantes têm sido reportadas em diversos lugares (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*), aumentando ainda mais as chances de dispersão da resistência polimixinas (BOROWIAK et al., 2017; YIN et al., 2017).



**Figura 7** - Modelo de ativação dos sistemas de dois componentes envolvidos na modificação do LPS. Fonte: adaptado de Baron, 2016.

Um dos trabalhos realizados nesta tese foi o primeiro a indicar a interrupção do gene de *mgrB* por sequências de inserção ou mutações como sendo o mecanismo mais frequente de resistência à polimixinas em *K. pneumoniae* no Brasil (AIRES et al., 2016b), em sequência, outra pesquisa confirmou este achado (BRAUN et al., 2016). Além disso, detecção crescente no Brasil, do gene *mcr-1* em isolados clínicos de *K. pneumoniae* pertencentes à clones de alto risco e associados a carbapenemases e determinantes de resistência para outras drogas, tem alertado para uma vigilância mais intensa (AIRES et al., 2017b; DALMOLIN et al., 2017).

#### **1.6. Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos em *K. pneumoniae***

A vigilância da susceptibilidade antimicrobiana é fundamental, de forma a prevenir a dispersão da resistência bacteriana, pois o uso persistente ou indiscriminado de determinado antimicrobiano pode, por pressão seletiva, conduzir à seleção de estirpes resistentes e conseqüentemente, à falha terapêutica (COSTA et al., 2009).

A prevenção da emergência e transmissão de micro-organismos multirresistentes requer uma compreensão que inclui, não apenas intervenções relativas a medidas de controle, mas também o envolvimento administrativo. Entre estas intervenções pode-se destacar na conscientização da equipe médica e de outros profissionais da área da saúde, compreensão de métodos de vigilância para micro-organismos multirresistentes, aplicação de precauções padrão no cuidado aos pacientes, medidas de cuidado do ambiente como limpeza e desinfecção do ambiente do paciente colonizado ou infectado, materiais não críticos de uso exclusivo, aparelhos individuais, entre outros sistemas de comunicação, um processo que assegure a adesão às recomendações do controle de infecção, uso racional de antimicrobianos (SIEGEL, et al., 2007).

A colonização do hospedeiro é um fator de risco para o desenvolvimento de infecção. Embora os fatores que promovem a progressão da colonização para infecção não sejam bem elucidados, a maioria das infecções adquirida no

hospital é precedida de colonização do hospedeiro pelo micro-organismo responsável, sendo este fato confirmado por estudos epidemiológicos que revelaram que as infecções por *K. pneumoniae* são frequentemente precedidas de colonização gastrointestinal e se acredita ser este o mais importante reservatório para a transmissão das bactérias (STRUVE, 2003; PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, 2012).

De particular preocupação, é a ocorrência mundial de infecções por estirpes multirresistentes de *K. pneumoniae* que são difíceis de erradicar. O conhecimento dos fatores envolvidos na capacidade de *K. pneumoniae* em colonizar e permanecer no trato gastrointestinal do hospedeiro é escasso (STRUVE, 2003).

Por ser uma bactéria ubíqua, *K. pneumoniae* pode ser isolada de diferentes substratos, podendo colonizar plantas e animais. Estudos, avaliando as taxas de colonização humana por bactérias mostram que, no caso do gênero *Klebsiella*, as taxas de colonização, de modo geral, apresentam-se mais altas em ambiente hospitalar: indivíduos hospitalizados e funcionários (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; BLASCHKE et al.,2010).

A identificação de surtos causados por linhagens do gênero *Klebsiella* multirresistentes a antibióticos tem crescido nos últimos anos, atingindo UTIs e alas pediátricas de hospitais localizados ao redor do mundo. A maioria dos surtos está relacionada a linhagens multirresistentes, frequentemente produtoras de  $\beta$ -lactamases, cujos genes são encontrados geralmente em plasmídeos. Com isso, a possibilidade de disseminação da resistência é grande, levando à emergência e disseminação de novas linhagens multirresistentes (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; OLIVEIRA GARCIA et al.,2008; SAMUELSEN et al.,2009).

Assim, a triagem de vigilância de amostras de fezes ou *swabs* retais ou perianais geralmente produzem um rendimento mais elevado do que em outros sítios (PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, 2012). O rastreo para a colonização na admissão no hospital, bem como a caracterização dos isolados de *K. pneumoniae* de colonização em pacientes em risco, podem ajudar a orientar as decisões de tratamento e informar os programas de controle de infecção. Além disso, há potencial para desenvolver novas intervenções terapêuticas para

proteger os pacientes de infecções causadas pelos isolados que eles carregam (DORMAN & SHORT, 2017).

O rastreamento de contatos de pacientes infectados com bactérias resistentes aos carbapenêmicos é essencial para reduzir as transmissões e controlar os surtos. No entanto, as abordagens para o rastreio de rotina para o transporte dessas bactérias variam de acordo com a epidemiologia, os recursos e as políticas institucionais. A vigilância basal é recomendada para determinar a prevalência e os tipos de enzimas carbapenemases que circulam em uma instituição. É preconizado o rastreio através de culturas de amostras de *swab* retal ou perianal em pacientes de alto risco, transferidos de outras unidades ou com internações prévias (RICHTER & MARCHAIM, 2017).

### **1.7. Metodologias de Tipagem de *Klebsiella pneumoniae***

O papel principal da tipagem microbiana é avaliar as relações entre os isolados microbianos. A compreensão da relação clonal entre as cepas microbianas é essencial para determinar a origem e as rotas das infecções, confirmar ou excluir os surtos, traçar a transmissão cruzada de patógenos associados à saúde, reconhecer estirpes particularmente virulentas e/ou resistentes e avaliar a eficácia das medidas de controle (TENOVER et al., 1997; MACCANNELL, 2013; PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

Décadas atrás, antes das técnicas de manipulação do DNA, várias metodologias convencionais de tipagem epidemiológica, como antibiograma, biotipagem, sorotipagem, tipagem de fagos, tipagem de bacteriocinas e MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*), foram úteis para a diferenciação de cepas bacterianas. No entanto, grande parte dessas metodologias disponíveis eram limitadas, muito variáveis, trabalhosas e demoradas para terem valor prático nas investigações epidemiológicas (DWORKIN et al., 2006; MACCANNELL, 2013).

Conseqüentemente, os métodos de tipagem molecular, que realizam a discriminação entre as cepas com base nas diferenças obtidas na sequência ou na organização do DNA genômico, tornaram-se indispensáveis para estudar

a epidemiologia da maioria dos agentes patogênicos microbianos (MACCANNELL, 2013).

Os métodos de tipagem moleculares mais utilizados são análise de restrição de DNA genômico e plasmideal por endonuclease, hibridização com sondas de DNA específicas, perfil de plasmideal, perfil de DNA genômico usando eletroforese em gel de campo pulsado - *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), ou métodos baseados na reação em cadeia da polimerase - *polimerase chain reaction* (PCR), como *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD); *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC)-PCR; ribotipagem; rep-PCR; (MACCANNELL, 2013; LIN et al., 2014; RANJBAR et al., 2014).

Os métodos de tipagem baseados em sequenciamento são uma realidade. Os genomas microbianos estão sujeitos à variabilidade devido à mutação ou recombinação, tal variabilidade dentro de genes particulares pode ser usada em esquemas de tipagem molecular para determinar a relação das bactérias. Hoje em dia, podemos usar a metodologia de PCR para acumular uma grande quantidade de material que pode ser sequenciado diretamente após a purificação. Nesta abordagem, temos como exemplo o *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST); análise de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). A tecnologia Microarray que permitiu mais recentemente a avaliação simultânea de um grande número de alvos genéticos microbianos (MACCANNELL, 2013; PÉREZ-LOSADA et al., 2013; LIN et al., 2014; RANJBAR et al., 2014). Além da revolucionária adoção da abordagem de sequenciamento do genoma completo – *Whole Genome Sequencing* (WGS) (ERLICH et al., 2013; PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

De particular importância, as metodologias de tipagem são imprescindíveis para o ambiente hospitalar, visto que nestes locais, as vias de transmissão de bactérias são bastante complexas e favorecem a disseminação de bactérias MDR. Assim, estudos que utilizam métodos de tipagem bacteriana são extremamente necessários para investigação da fonte de possíveis surtos e para identificar cepas epidêmicas ou endêmicas (TENOVER et al., 1995).

Surto e epidemias são definidos pela dispersão de clones, assim determinar a tipagem dos isolados é fundamental para a definição destas

situações (PARSONS et al., 2007; GOERING, 2010). A disseminação mundial de clones bacterianos abrigando genes de resistência é uma ameaça real para o controle de infecções bacterianas e para a antibioticoterapia (CARATTOLI, 2009; GOOTZ, 2010). Relatos apontam alguns clones como responsáveis pela disseminação de importantes determinantes de resistência, por exemplo, disseminação mundial de *K. pneumoniae* ST258 produtora de KPC-2 ou KPC-3 (KITCHEL et al., 2009; LEAVITT et al., 2010)

As análises filogenéticas e do conteúdo gênico mostram que a transferência horizontal é um mecanismo-chave para a aquisição de determinantes de resistência. Portanto, essas análises permitem uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos nas diferenças de susceptibilidade a drogas em *K. pneumoniae* e uma visão geral da dinâmica da diversidade genética e evolutiva desta espécie (KUMAR & SUN et al., 2011).

Uma das abordagens mais utilizadas para a caracterização de isolados de *K. pneumoniae* é a determinação de perfis genômicos por macro-restrição, por meio da técnica de PFGE, que gera pulsotipos e se aplica principalmente aos estudos de surtos limitados no tempo e no espaço (PARSONS et al., 2007; GOERING, 2010). Nessa técnica, extrações de DNA total de diferentes isolados de uma espécie bacteriana seguido de seu aprisionamento em blocos de agarose, que são submetidas à clivagem por uma enzima de restrição. A separação dos fragmentos é realizada em eletroforese de campo pulsado onde campos elétricos alternados são aplicados permitindo a separação de fragmentos de grande tamanho. Os fragmentos obtidos são comparados conforme sua migração no gel de agarose. O grau de similaridade entre os tamanhos dos fragmentos obtidos demonstra a maior ou menor probabilidade de relação clonal entre os isolados analisados (TENOVER, et al., 1995).

A tipagem por sequenciamento de multilocus – *multi-locus sequence typing* (MLST) é atualmente uma ferramenta molecular eficiente no estudo e caracterização epidemiológica de bactérias. Esta técnica é baseada na amplificação por PCR e sequenciamento de fragmentos internos de sete genes essenciais (constitutivos) à espécie. A combinação das sequências dos genes é utilizada para definir um tipo de sequência (ST, do inglês *sequence type*). Quando STs diferem em apenas um alelo, diz-se que estes pertencem a um



complexo clonal. Essa técnica permite a caracterização das relações entre isolados e produz dados não ambíguos que, através da utilização de uma base de dados internacional, permite a comparação de resultados obtidos por diferentes laboratórios (DIANCOURT, et al.,2005).

O sequenciamento de genomas bacterianos tem sido utilizado para uma ampla gama de objetivos. A clara vantagem da WGS sobre o sequenciamento tradicional é a capacidade de gerar milhões de leituras em corridas únicas a custos comparativamente baixos. Para construir a sequência de nucleótidos completa de um genoma, as múltiplas sequências curtas de leitura (reads) devem ser montadas com base em regiões sobrepostas (montagem de novo), ou em comparações com genomas de "referência" previamente disponíveis (SABAT et al., 2013).

Em pouco tempo, é provável que o WGS substitua as atuais metodologias de tipagem e diagnóstico para bactérias, no entanto, o desafio principal seja a análise e interpretação rápida dos dados, bem como o acesso facilitado (SABAT et al., 2013). Na perspectiva da resistência, os dados gerados podem ser usados para identificar os mecanismos de resistência, os genes de virulência e também identificar a proximidade filogenética, sendo possível o monitoramento de patógenos ao longo do tempo e em regiões geográficas diferentes além de serem úteis para a investigação de surtos (DIDELLOT et al, 2012).

### **1.8. Plano Brasil sem Miséria e a Resistência Bacteriana**

O plano Brasil sem Miséria (BSM), criado em 2011 pelo governo federal e coordenado pelo Ministério de Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS), tem o intuito de combater a extrema pobreza, com um caráter mais abrangente, uma vez que a insuficiência de renda é um relevante indicador de privações, mas não é o único. Fatores sociais, geográficos e biológicos multiplicam ou reduzem o impacto exercido pelos rendimentos sobre cada indivíduo. Assim, além de elevar a renda familiar per capita, o BSM tem como objetivo promover a inclusão social e produtiva da população extremamente pobre, ampliar o acesso aos serviços públicos e o acesso às oportunidades de

ocupação, na perspectiva da melhoria das condições de vida e bem estar (<http://www.brasilsemisera.gov.br/>).

Para aderir ao Plano BSM, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) firmou, em 2011, um acordo de Cooperação Técnica com o MDS. O objetivo foi colocar na agenda do Plano, as “doenças da pobreza” e combatê-las com a produção de conhecimento de excelência em saúde, com implementação de projetos que visassem investigar e mitigar os problemas relacionados à pobreza (ARAÚJO-JORGE, 2011).

É reconhecido que algumas doenças, em especial, estão relacionadas à pobreza, particularmente à pobreza extrema e por outro lado são perpetuadoras da miséria, na medida em que pioram a exclusão social e prejudicam tanto a capacidade cognitiva como a laboral das pessoas acometidas, comprometendo o ingresso e o sucesso no mercado de trabalho, acarretando más condições de vida, oportunidades e geração de renda (BRASIL, 2010).

O termo "Doenças da Pobreza" refere-se às doenças adquiridas em condições como aglomeração populacional, falta de abastecimento de água tratada e rede de esgoto adequada, que favorecem a infecção por patógenos causadores de doenças como malária, doença de Chagas, leptospirose, hanseníase, tuberculose, leishmaniose, dengue, febre reumática, esquistossomose e diversas outras parasitoses intestinais (ARAÚJO-JORGE 2011).

Apesar da resistência bacteriana não se tratar de uma doença específica, as infecções causadas por bactérias resistentes gera consequências graves como a falha do tratamento das infecções, aumento significativo em todas as causas mortalidade, aumento de risco de internação, aumento no risco de progressão para choque séptico. Além disso, as infecções por bactérias resistentes aos antibióticos contribuem para outros custos: requerem tratamentos prolongados e mais caros, estadias hospitalares prolongadas e visitas médicas adicionais (WHO, 2014).

Nesse contexto, os índices de pacientes com infecção obtida nos hospitais públicos com atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com

uma taxa de 18,4%, são maiores em relação aos 10% dos hospitais privados sem fins lucrativos (BRASIL, 1995). Apesar do SUS garantir a todos, do mais pobre ao mais rico, o direito a um tratamento integral de saúde e totalmente gratuito, a crise nos serviços de saúde e suas consequências acarretam na utilização do sistema, principalmente, pelos estratos populacionais pobres e de baixa-renda assim como médio-inferior, que não têm alternativas (MESA-LAGO et al., 2007).

A maior parte dos pacientes atendidos em hospitais da rede pública possui baixo grau de instrução (a maioria possui ensino fundamental incompleto), utiliza o ambulatório hospitalar como principal fonte de atendimento médico, pertence à classe social designada proletariado não típico, e é pobre (STAMM et al., 2002; ROSA et al., 2011). Portanto, conclui-se que essa parcela da população, que se encaixa no perfil contemplado pelo plano BSM, é a que mais sofre com as consequências causadas pelas infecções por bactérias resistentes aos antimicrobianos.

### **1.8.1. Educação em Saúde na Temática da Resistência Bacteriana na Perspectiva do Plano Brasil sem Miséria**

A resistência bacteriana aos antibióticos representa um dos mais graves problemas de saúde pública que ocorre em todo o mundo, podendo afetar qualquer pessoa, de qualquer idade, em qualquer país. Embora a resistência aos antibióticos ocorra naturalmente, o uso indiscriminado de antibióticos em seres humanos e animais está acelerando o processo (WHO, 2015a).

A resistência antimicrobiana coloca todas as nações em risco, pois ameaça o núcleo da medicina moderna e a sustentabilidade dos antimicrobianos, que são pré-requisitos para medidas preventivas e curativas, protegendo os pacientes de doenças potencialmente fatais e garantindo que procedimentos complexos, como cirurgia e quimioterapia, possam ser realizados com baixo risco. Poucos produtos de substituição estão em andamento. Sem ação harmonizada e imediata em escala global, o mundo está indo em direção a uma era pós-antibiótico em que infecções comuns poderiam mais uma vez matar (WHO, 2015b).

Diversas medidas simples podem ser tomadas em todos os níveis da sociedade para reduzir o impacto e limitar a propagação da resistência bacteriana, incluindo o público, que pode ajudar, prevenindo infecções através de uma boa higiene e vacinação, utilizando apenas antibióticos quando prescrito por um profissional de saúde certificado, utilizando-os até o fim, e nunca compartilhar ou usar antibióticos prescritos para outros pacientes (WHO, 2015a).

O combate à resistência aos antibióticos é uma prioridade elevada para a Organização Mundial de Saúde (OMS). Por esta razão, é fundamental que as pessoas compreendam o problema e a forma como podem mudar seu comportamento. Como parte da implementação do objetivo 1 do plano de ação global sobre resistência antimicrobiana, a OMS pretende melhorar a conscientização e a compreensão da resistência aos antibióticos através de comunicação, educação e treinamentos efetivos (WHO, 2015b).

Portanto, torna-se imprescindível a introdução de estratégias de conscientização sobre a resistência aos antibióticos, na tentativa de combater esse problema. Desta forma, o Plano Fiocruz-Capes de apoio ao Plano Brasil Sem Miséria, cujo um dos objetivos é gerar conhecimentos voltados para a mitigação do problema da miséria no Brasil através de estratégias de combate às doenças infecciosas e parasitárias associadas à pobreza, recomenda que a educação popular seja inserida nas ações do Programa, objetivando contribuir para prevenir e controlar estas doenças e promover a saúde da população a quem se dirigem tais ações (ARAÚJO-JORGE, 2011).

Para alcançar os objetivos do plano BSM e ajudar a controlar as doenças promotoras da pobreza, em busca de maior equidade e justiça social, o MDS sugere ações de enfrentamento em diversas áreas como em serviços públicos que vão aderir ao Programa e nas ações de inclusão produtiva. A educação em saúde se insere nas ações das áreas citadas no que se refere à ampla disseminação de materiais de educação, informação e comunicação sobre as doenças da pobreza para educação técnica e da população (ARAÚJO-JORGE 2011).

As estratégias de educação em saúde abordam informações essenciais que visam à promoção da saúde e melhor qualidade de vida. No entanto, para

o entendimento do processo saúde-doença, é necessário levar em consideração várias características sociais como cultura, intelectualidade, escolaridade e, ainda, fatores ligados ao ambiente como saneamento, acesso ao transporte, moradia, água potável e, por fim, o aspecto econômico. Tais fatores influenciam e caracterizam a vida social e qualidade de vida. Logo, percebe-se que “saúde” possui significados variados e íntima relação com bem-estar e concepção do ambiente (SILVA, 2005).

A experiência oriunda da práxis constitui uma vantagem do profissional que utiliza a educação em saúde como ferramenta de prevenção, promoção e reabilitação. Dados científicos elencados pelo profissional, ao executar a ação educacional, devem ser codificados em mensagens passíveis de entendimento pela pessoa que está absorvendo (SILVA, 2005).

O educador em saúde deve visar à qualidade da informação, sua recepção, forma e o quanto é compreendida pela clientela, traçando estratégias de ensino que resultem em ações transformadoras por parte da população alvo. A conscientização é o primeiro passo para o autocuidado, bem como é importante ressaltar que cada indivíduo possui um ritmo para aprender, compreender e pôr em prática as orientações. Por conseguinte, o cliente pode vir a estabelecer adaptações para o seu estilo de vida (SILVA, 2005).

Entende-se que a educação em saúde e promoção da saúde caminham juntas, gerando as possibilidades para que a população gerencie as informações, se conscientize e tome providências tendo em vista sua qualidade de vida (SILVA, 2005). A comunicação é fundamental nesse processo, seja de informações, conhecimentos, valores, experiências, saberes, competências (KELLY-SANTOS et al., 2010).

No âmbito das práticas comunicativas dos serviços de saúde, os materiais de divulgação, nos formatos de cartazes, cartilhas, folhetos, convencionalmente denominados de materiais educativos, fazem parte das iniciativas da promoção da saúde nas comunidades e assumem um importante papel na mediação entre profissionais e a população (MONTEIRO & VARGAS, 2006). A produção de cartazes, folhetos e cartilhas para a distribuição e comunicação nos serviços de saúde pública são investimentos na descentralização do diagnóstico, no tratamento e nas ações preventivas na

rede básica de saúde e contribuem para o esclarecimento das populações sobre as mudanças e prevenção (KELLY-SANTOS et al., 2010).

Neste sentido, como demanda obrigatória da parceria entre o Plano BSM e o IOC/Fiocruz, esta tese apresenta um produto em forma de cartilha educativa, destinada à população em geral, que disponibiliza informações relevantes para apoiar ações na perspectiva do combate à resistência aos antibióticos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes são um grave problema de saúde pública no Brasil. A realidade brasileira sobre a epidemiologia molecular da resistência em *K. pneumoniae* é basicamente atrelada a estudos que utilizam isolados proveniente de culturas de infecções nosocomiais. No entanto, esta bactéria está presente na flora intestinal de humanos e sabe-se que infecções são precedidas de colonização.

Tendo em vista que pacientes internados em locais associados à assistência a saúde são constantemente submetidos a terapia antimicrobiana, culminando em uma pressão seletiva no ambiente, estes internos podem atuar como reservatórios de isolados portadores de genes de resistência, gerando um ciclo de colonização seguido de invasão pelo patógeno, infecção, choque séptico e morte.

Nesta perspectiva, aspectos da multirresistência atrelados a este trabalho de tese, tais como aquisição de mecanismos de resistência e sua disseminação, são pouco abordados e difundidos na população de uma forma geral. Esse desconhecimento acerca do tema propicia a progressão do problema, visto que, mesmo após a dispensação do antibiótico mediante receita médica estar atualmente regulamentada, o uso incorreto de antimicrobianos realizado pela população leiga contribui para o aparecimento da resistência.

Assim, este projeto visou analisar geneticamente isolados de *K. pneumoniae* oriundos de culturas de vigilância realizadas em hospitais de diferentes estados brasileiros, a fim de caracterizar as populações presentes nestes ambientes e executar uma análise fenotípica e molecular, buscando uma associação de fenótipos de resistência aos antimicrobianos com os genótipos. Além disso, pretendemos contribuir para difundir o conhecimento sobre o tema da resistência bacteriana no âmbito populacional.

Os resultados deste trabalho permitirão um mapeamento da resistência bacteriana no cenário nacional, além de possibilitar o monitoramento da prevalência da resistência aos antimicrobianos. As informações obtidas, assim, contribuirão para orientar medidas que conduzam de forma mais racional o

combate à resistência, além de popularizar a temática da resistência bacteriana, através da educação sobre o tema, que culminarão em medidas que podem ter grande impacto na redução da disseminação da resistência bacteriana.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar a caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes provenientes de culturas de vigilância obtidas de hospitais de diferentes estados brasileiros.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos através das técnicas de disco-difusão e Etest;
- Investigar a presença de genes de resistência a antimicrobianos através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento;
- Avaliar o polimorfismo genético das amostras de *K. pneumoniae* através das técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e Multilocus sequence typing (MLST).
- Investigar os possíveis mecanismos de transferência de genes de resistência através de técnicas moleculares como extração plasmideal e hibridização;
- Determinar a presença de genes de virulência através da técnica de PCR;
- Confeccionar cartilha educativa sobre resistência bacteriana.

#### 4. RESULTADOS

Os isolados bacterianos selecionados para esta tese foram recebidos no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH – IOC – FIOCRUZ) no período entre 2007 e 2013, e apresentavam resistência ou resistência intermediária aos carbapenêmicos (ANEXO 2). Estes isolados foram enviados voluntariamente pelos Laboratórios Centrais e unidades de saúde dos estados de origem. As cepas fazem parte da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) e encontram-se preservadas em Ágar BHI com glicerol (armazenadas a -200 °C). Para este estudo, foi selecionado um total de 126 amostras de *K. pneumoniae* com perfil de resistência ou resistência intermediária aos carbapenêmicos coletadas a partir de amostras de *swab* retal de vigilância.

O critério para a seleção das amostras incluía a somente a espécie *K. pneumoniae* com perfil de resistência ou resistência intermediária a pelo menos um carbapenêmico coletadas a partir de amostras de *swab* retal de vigilância de pacientes não repetidos. Com este perfil, estavam disponíveis amostras provenientes de 11 estados brasileiros (Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (ANEXO 3). Os isolados foram selecionados aleatoriamente quando o número de amostras era >15 por estado, já para os estados que dispunham de um número de amostras <15, todas as cepas foram incluídas.

A maioria dos isolados mostrou resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas testados e susceptibilidade somente à fosfomicina/trometamol, tigeciclina e polimixina B (ANEXOS 4 e 5). Nesta perspectiva, 89% dos isolados eram MDR, 3% XDR, 1% PDR e 7% eram suscetíveis a três ou mais classes antimicrobianas (ANEXO 6).

Das 126 amostras de *K. pneumoniae*, 102 foram positivas para o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> e uma positiva para *bla*<sub>OXA-48-like</sub> (ANEXO 3). Um fluxograma com as metodologias realizadas neste estudo foi incluído no anexo 7.

#### 4.1. Artigo 1 - Population structure analysis of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from surveillance rectal swabs in Brazil, 2009-2013.

- **Objetivos:** Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *K. pneumoniae* multirresistente recuperados de swab de vigilância no Brasil.
- **Situação do Manuscrito:** a ser submetido ao *Journal of Hospital Infection*. Fator de Impacto da Revista: 3.126 (Qualis-Capes B1).
- **Referência:** Aires CAM, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Population structure of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from surveillance rectal swabs in Brazil, 2009-2013. *Infection Control and Hospital Epidemiology*.

**Resumo:** Realizar caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente recuperados de swab de vigilância no Brasil. A susceptibilidade a antibióticos foi determinada por disco-difusão e E-test. A PCR foi utilizada para investigar genes de resistência e virulência. A tipagem molecular foi realizada por PFGE e MLST. Foram selecionados 102 isolados de *K. pneumoniae* coletados durante 2009-2013 em 10 estados e Distrito Federal. Os isolados foram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos (média de 99.5%), sulfonamidas (90%), cloramfenicol (78.5%), quinolonas (média de 93%) e aminoglicosídeos (média de 57%), porém, suscetível à fosfomicina/trometamol (88%), polimixina B (92%) e tigeciclina (50%). Além do gene  $bla_{KPC}$ , detectamos 78%, 100% e 93% dos isolados carregando  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ , respectivamente. Através da técnica de PFGE foi possível selecionar 40 estirpes representativas de cada pulsotipo distinto para cada estado. MLST das cepas representativas revelou 23 STs, sendo 45% do complexo clonal 258 (CC258). Isolados do CC258 foram encontrados em todos os estados e compreenderam 70% dos 102 isolados KPC-positivos. O  $bla_{KPC-2}$  foi associado ao Tn4401b em 76% dos representantes. Detectamos ainda a presença concomitante de determinantes de resistência para quinolonas e aminoglicosídeos e virulência comuns à espécie. Descrevemos a disseminação de *K. pneumoniae* pertencentes ao CC258 associado ao  $bla_{KPC-2}$  e Tn4401b colonizando pacientes no Brasil.

# Population structure analysis of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from surveillance rectal swabs in Brazil, 2009-2013.

**Authors:** Caio Augusto Martins Aires<sup>1</sup>, Polyana Silva Pereira<sup>1</sup>, Claudio Marcos Rocha-de-Souza, Natacha Ferreira Pereira, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>1</sup> and Marise Dutra Asensi<sup>#1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

## ABSTRACT

We aimed to investigate the molecular genotyping of 102 KPC-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP) recovered from rectal swabs in Brazil, its prevalence of  $\beta$ -lactamase genes, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR), aminoglycosides determinants and virulence profile. The isolates were collected from 2009 to 2013 and were characterized by antimicrobial susceptibility profile (19 antimicrobial agents), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and multi-locus sequence typing (MLST). Most of isolates were considered multidrug-resistant, and belonging to CC258. The *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was mainly associated with Tn4401b and the presence of other  $\beta$ -lactamase encoding genes, plasmid-mediated quinolone genes, aminoglycoside resistance determinants.

## INTRODUCTION

The globally widespread *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP), has become one of the most important issues in public health [1]. KPC-KP is often resistant to most  $\beta$ -lactams and many other antimicrobials [2], and high rates of morbidity and mortality usually result from infections caused by these pathogens [1].

The KPC carbapenemase has a high capacity to spread, since its gene (*bla*<sub>KPC-2</sub>) is mainly associated with transferable plasmids and transposons such

as Tn4401 [3]. Besides that, the expansion of KPC-KP clonal lineages plays a major role in the spread of resistance [1].

In Brazil, KPC production is currently the most frequent resistance mechanism in carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, leading to an endemicity status [1]. Molecular studies describes the prevalence of KPC-KP isolates belonging to clonal complex 258 (CC258) in this country, with main focus on isolates collected from clinical samples of infected patients [4-6].

Several studies indicate that prior intestinal colonization by KPC-KP is one of the most important risk factors associated with progression to extraintestinal nosocomial KPC-KP infections [7,8]. Furthermore, colonized patients may serve as a reservoir for the spread of KPC-KP in healthcare facilities [1].

The knowledge of the epidemiologic, phenotypic and molecular features of KPC-producing strains became fundamental to understand the resistance panorama and to allow measures to control the dissemination [2]. In this regard, this study aims to investigate the population structure of KPC-KP collected from the gut environment of colonized patients, in order to continue monitoring the evolution of KPC-KP in Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial isolation and identification**

As part of the Bacterial Nosocomial Infection Resistance Surveillance network, the Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), located at Oswaldo Cruz Institute (Rio de Janeiro, Brazil), routinely receives clinical bacterial isolates from Brazilian healthcare services to perform multiplex PCR for investigation of genes currently associated with carbapenem-resistance in Enterobacteriaceae isolates (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA-48-like</sub>). This study included 102 non-duplicated KPC-KP isolates collected from rectal swabs of hospitalized patients. The isolates were received during 2009 to 2013 from 11 Brazilian states, comprising four different geographical regions of this country. All isolates previously identified with automated systems were confirmed by conventional biochemical techniques [9].

## **Antimicrobial susceptibility testing**

Antimicrobial susceptibility tests of all isolates were evaluated by using disk diffusion method to amikacin (AMK), aztreonam (ATM), cefepime (FEP), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), ertapenem (ETP), fosfomycin/trometamol (FOT), gentamicin (GEN), piperacillin/tazobactam (TZP), sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT) and the minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using the Etest (AB Biodisk, Sweden) method for imipenem (IPM), meropenem (MEM), polymyxin B (PMB) and tigecycline (TGC). The results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints [10] except for PMB and TGC, for which the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [11] criteria were applied. Phenotypic detection of carbapenemases was based on the use of phenyl boronic acid and EDTA as enzymatic blockers [12]. *Escherichia coli* ATCC® 25922 were used as control for antimicrobial susceptibility testing.

## **Genetic relatedness and genotyping**

Genetic similarities among all the KPC-KP isolates were investigated by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). The DNA was digested with the restriction enzyme XbaI, and the DNA fragments were separated by 1% agarose gel electrophoresis for 17 hours using a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad, USA), with pulses varying from 0,5–35 s at a voltage of 6 V/cm. After staining with ethidium bromide (0.5 µg/mL), the resulting fragments were examined using BioNumerics v.6.6 (Applied Maths, Belgium). Similarity among the isolates was estimated using the Dice coefficient with 1.5% optimization and a 1.0% tolerance setting. The PFGE clusters (pulsotypes) were defined as isolates with a cut-off of 80% similarity and named by a capital letter.

A total of 40 representative isolates was selected from each distinct pulsotype for each studied state to perform Multi-locus Sequence Typing (MLST). PCR and sequencing of seven housekeeping gene loci (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* and *tonB*) were conducted according to the protocol of the Institut Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). New alleles and sequence types (STs) were submitted to the MLST website for approval.

## Molecular Investigations of antimicrobial resistance

All KPC-KP isolates were screened for the presence of carbapenemases genes, including *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, by PCR amplification followed by DNA sequencing of *bla*<sub>KPC</sub>. PCR assays were also used to detect other  $\beta$ -lactamase encoding genes (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>); plasmid-mediated quinolone (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) and aminoglycoside resistance determinants (*aac(3)IIa*, *aac(6)-Ib*, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtG*, *npmA*).

### Detection of flanking regions of *bla*<sub>KPC</sub>

The genetic environment of the *bla*<sub>KPC</sub> gene was analyzed by multiplex PCR according to the primers described by Naas et al. (2008) [3] except for the amplification of the IS*Kpn7* region, in which the primers described by Kitchel et al. (2009) [13] were adopted. The Tn4401 isoform was determined by sequencing of IS*Kpn7* amplicon.

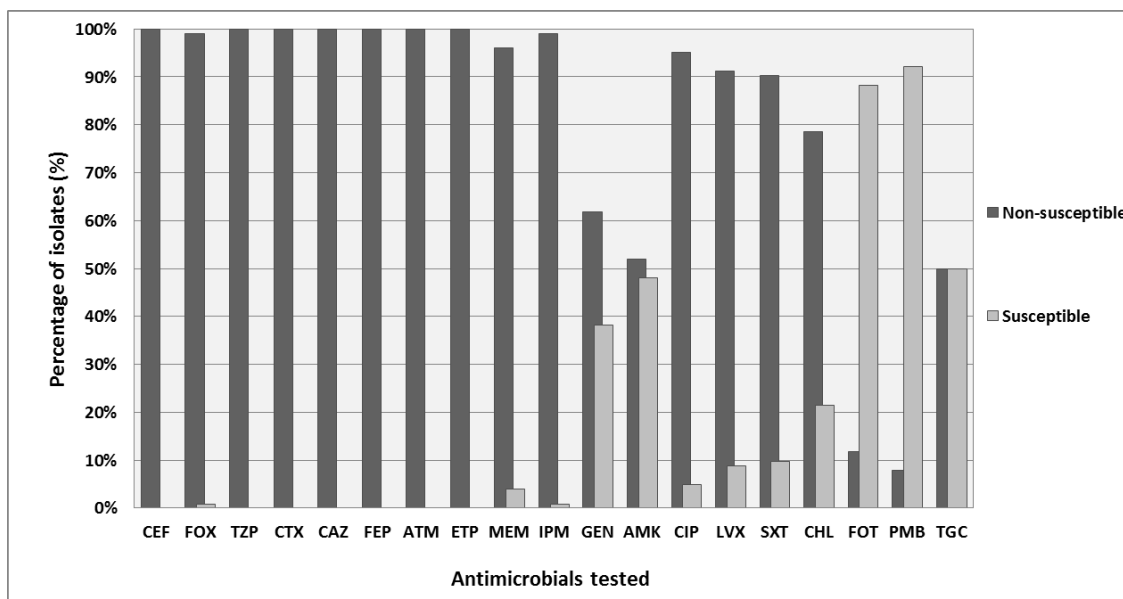
### Detection of virulence-associated features

The virulence factor-encoding genes *cf29a*, *mrkD*, *fimH*, *entB*, *ycfM*, *iroN*, *kfu*, *magA*, *allS* and *ybtS* were searched by PCR. The hypermucoviscosity (HMV) phenotype was searched by the string test [14].

## RESULTS

The 102 isolates were recovered from patients from four Brazilian regions, south-east (n=37) and mid-west (n=20) regions, south (n=24) and northeast (n=21) (Fig. 2). No isolates from the north region were received by LAPIH during the study period.

All KPC-KP isolates were positive for carbapenemase production and only possessed the KPC-2 allele variant among the investigated carbapenemase genes. Most of isolates were non-susceptible to all  $\beta$ -lactams (99.5%), fluoroquinolones (93%), aminoglycosides (57%), chloramphenicol (78%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (90)%, but exhibited susceptibility to polymyxin B (92%), Fosfomycin/trometamol (88%), being half of isolates susceptible to tigecycline (50%) as showed in Fig 1.



**Fig 1.** Antimicrobial susceptible profile of KPC-KP isolates. CEF, cephalothin; FOX, cefoxitin; TZP, piperacillin-tazobactam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; ETP, ertapenem; MEM, meropenem; IPM, imipenem; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; CHL, chloramphenicol; FOT, fosfomycin/trometamol; PMB, polymyxin B; and TGC, tigecycline.

A total of 26 PFGE pulsotypes (A to Z) were observed among the 102 KPC-KP. Despite the clonal diversity observed, the most prevalent profile was clone A (Fig. 2). MLST performed in 40 isolates representing each distinct PFGE pulsotypes for each state revealed 23 STs, being the ST2277 first described in this study. A total of 18/40 (45%) of the representative isolates belonged to clonal complex 258 (CC258), which was detected in all studied Brazilian states (Fig. 3). The CC258 comprised 70% of all the isolates (ST11 n=26, ST340 n=10, ST437 n=28, ST855 n=7 and ST864 n=1).

We detected a large variety of genes associated with  $\beta$ -lactamases and resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides among the 40 representative isolates. Most of isolates harbor *bla*<sub>CTX-M</sub> (75%), *bla*<sub>SHV</sub> (92.5%), *bla*<sub>TEM</sub> (100%) and *aac(6')-Ib* (67.5%) genes. The research for virulence determinants identified *mrkD* (97.5%), *fimH* (100%), *ycfM* (100%), *kfu* (15%), *ybtS* (87.5%), *entB* (100%) genes and positive HMV phenotype (7.5%) (Fig 2).

The *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was associated with Tn4401b in 76% of 40 representative strains. No isolate amplified the inverted repeat sequences of the flanking region of Tn4401. Besides that, one of the isolates presented a deletion of 71 pb in ISKpn7 region.



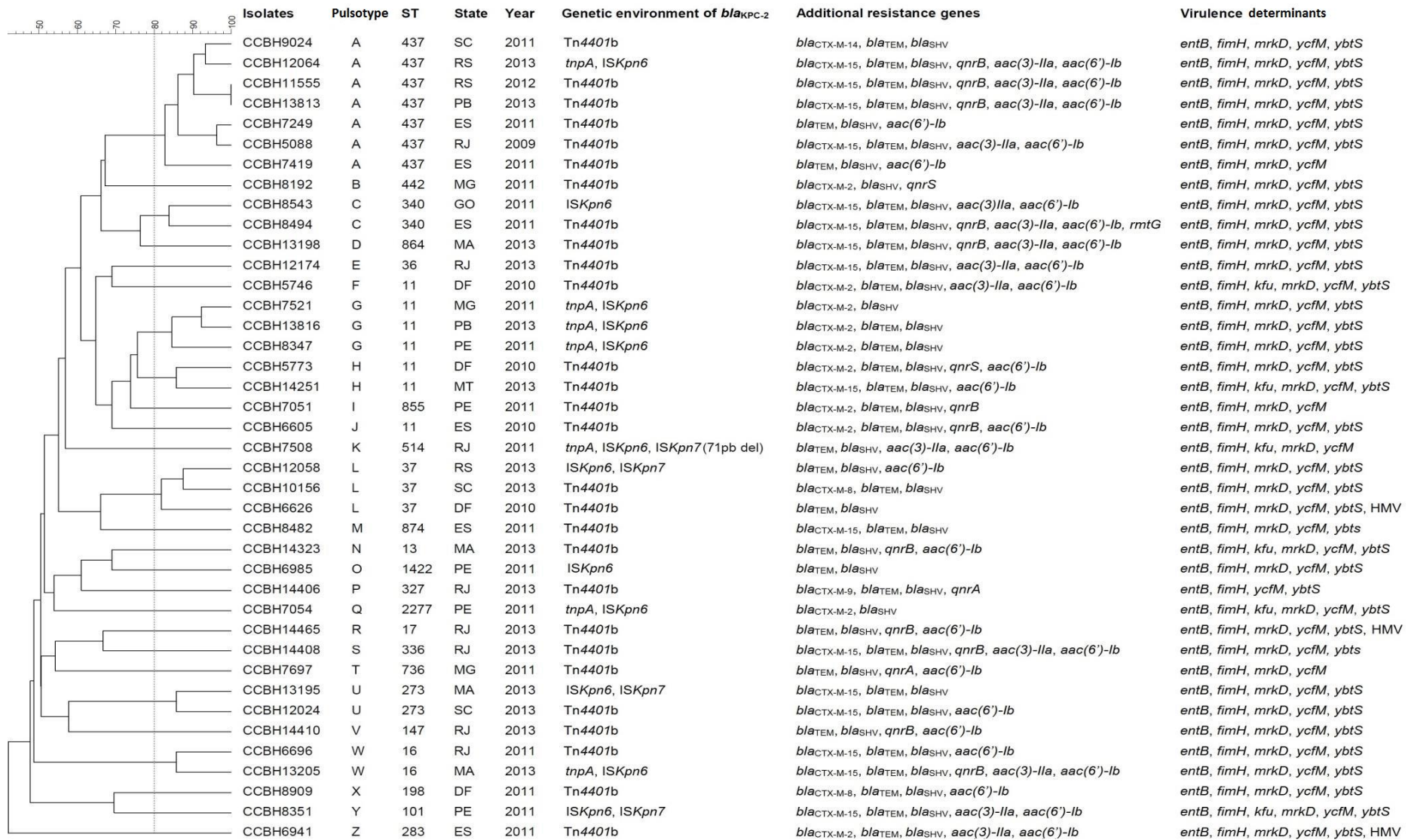
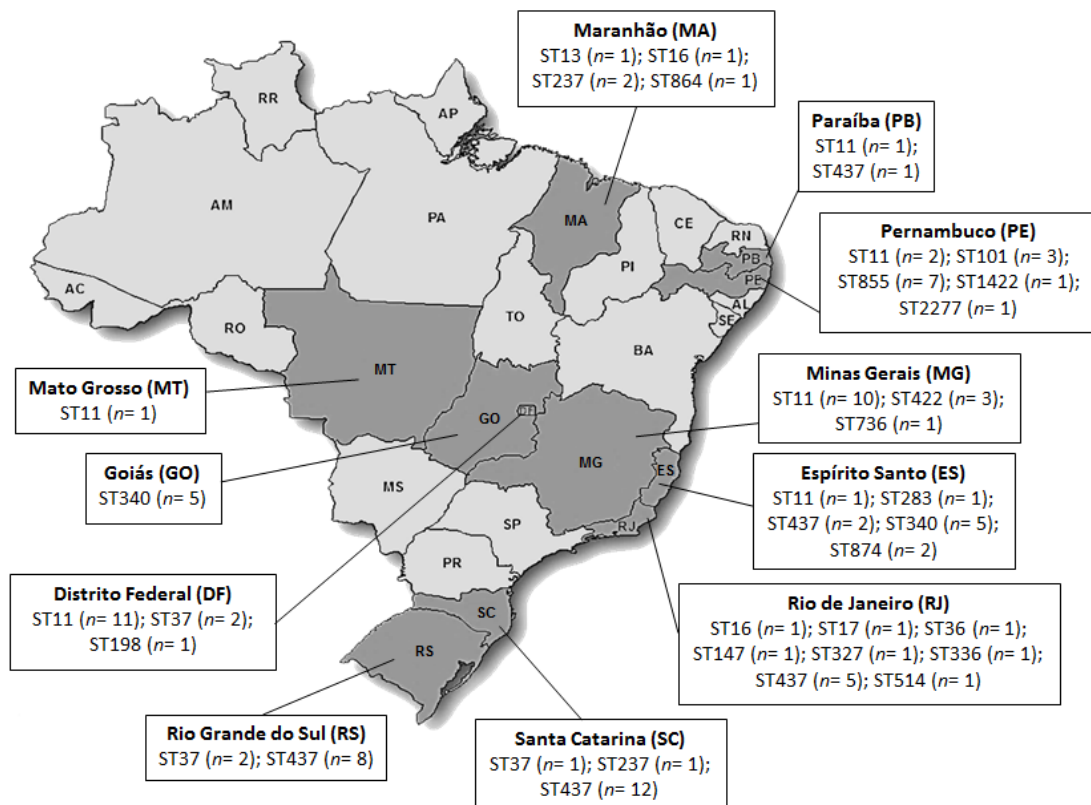


Fig 2. Dendrogram and genetic features of KPC-KP of the study.



**Fig. 3.** Distribution of the STs according to state and geographical region of 102 KPC-KP from Brazil.

## DISCUSSION

Most studies which assessed genotype of KPC-KP in Brazil have focused on infected patients [4-6]; there have been few reports assessing data of KPC-KP carriage in patients around the country [5,15,16].

We observed an increase in the resistance rates for Tigecycline (12%) when compared to a previous study [4]. A high level of resistance to different antimicrobial classes has frequently been observed in KPC-producing isolates worldwide. Resistance to polymyxin and tigecycline is very worrisome, because these antimicrobials have been the last option for treatment of severe infections caused by KPC-producing organisms [2].

In previous reports that considered isolates from infected patients during the years 2006–09 [6] and 2010 [4], there was prevalence of ST11, ST340 and ST437 in several Brazilian regions. The same result was found in this work, which means that

these high-risk clones are probably colonizing patients and cause subsequent infections.

The clustering of PFGE analysis was consistent with the clones indicated by MLST, except for clones of ST11 which was grouped in four pulsotypes (F, G, H and J). This phenomenon is commonly described in ST11 [17,18], showing the diversity of this clone.

The *bla*<sub>KPC</sub> gene is predominantly associated with the transposon Tn4401, but the loss of regions of this genetic element and other structures is commonly described [4,19]. The presence of other  $\beta$ -lactamase encoding genes, plasmid-mediated quinolone genes, aminoglycoside resistance determinants is commonly associated with *bla*<sub>KPC-2</sub> in *K. pneumoniae* [17,20]. But the virulence genes found in isolates our study is common in clinical *K. pneumoniae* isolates [20] and not associated with the resistance profile [21,22].

This study describes the spread of multidrug-resistant KPC-KP belonging to CC258 in colonized patients from Brazil. The *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was mainly associated with Tn4401b and the presence of other  $\beta$ -lactamase encoding genes, plasmid-mediated quinolone genes, aminoglycoside resistance determinants.

## References

1. Munoz-Price LS., Poirel L., Bonomo RA., et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013;**13**(9):785–96. Doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7.
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. *Front Microbiol* 2016;**7**(JUN):1–30. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00895.
3. Cuzon G., Naas T., Truong H., et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. *Emerg Infect Dis* 2010;**16**(9):1349–56. Doi: 10.3201/eid1609.091389.
4. Pereira PS., De Araujo CFM., Seki LM., Zahner V., Carvalho-Assef APDA., 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):312–6. Doi: 10.1093/jac/dks396.
5. Andrade LN., Curiao T., Ferreira JC., et al. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> 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):3579–83. Doi: 10.1128/AAC.01783-10.

6. Seki LM., Pereira PS., de Souza MDP a H., et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;**70**(2):274–7. Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.006.
7. Bassetti M., Giacobbe DR., Giamarellou H., et al. Management of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Clin Microbiol Infect* 2017. Doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.030.
8. Perez, LRR., Dias CG. Emergence of Infections due to a Polymyxin B – Resistant KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Critically Ill Patients : What Is the Role of a Previous Colonization ? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;**37**(2):240–1. Doi: 10.1017/ice.2015.294.
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM et al. *Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
10. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100 - S25*. 2015.
11. EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0*; 2015:0–78.
12. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Nota Técnica 01/2013*. 2013: 1–22.
13. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**:3365–70.
14. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. 2013. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*; **4**:107–118.
15. Martins WMBS., Almeida ACS., Nicoletti AG., et al. Coproduction of KPC-2 and QnrB19 in *Klebsiella pneumoniae* ST340 isolate in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;**83**(4):375–6. Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.003.
16. Almeida ACS., de Sá Cavalcanti FL., Vilela MA., Gales AC., de Moraes MA., Camargo de Moraes MM. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the blaKPC-2 gene in an Intensive Care Unit patient. *Int J Antimicrob Agents* 2012;**40**(4):374–6. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.05.022.
17. Cuzon G., Naas T., Truong H., et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010;**16**(9):1349–56. Doi: 10.3201/eid1609.091389.
18. Castanheira M., Costello AJ., Deshpande LM., Jones RN. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;**56**(3):1668–9. Doi: 10.1128/AAC.05942-11.
19. Ribeiro VB., Andrade LN., Linhares AR., et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol* 2013;**62**(PART 11):1721–7. Doi: 10.1099/jmm.0.062141-0.
20. Andrade LN., Vitali L., Gaspar GG., Bellissimo-Rodrigues F., Martinez R., Darini ALC. 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. Doi: 10.1128/JCM.00088-14.
21. Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochim Pol.* 2015;**62**(4):867–74.
22. Chiang T-T, Yang Y-S, Yeh K-M, Chiu S-K, Wang N-C, Lin T-Y, et al. Quantification and comparison of virulence and characteristics of different variants of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Taiwan and the United States. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;**49**(1):83–90.

#### 4.2. Artigo 2 - *mgrB* mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil.

- **Objetivo:** Investigar a prevalência da resistência à polimixina B (PMB) e seus mecanismos moleculares em 126 isolados de *K. pneumoniae* oriundos de swabs retais no Brasil.
- **Situação do Manuscrito:** publicado na *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Fator de Impacto da Revista: 4.302 (Qualis-Capes A1).
- **Referência:** Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. *mgrB* mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Nov; 60(11): 6969–6972.

**Resumo:** Polimixina é amplamente utilizada para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. No entanto, relatos de resistência têm se tornado frequente. A resistência à polimixina pode ser causada por modificações nos sistemas de dois componentes PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ, inativação do gene *mgrB* (regulador de PhoP/PhoQ) e pelo gene plasmideal *mcr-1*. Pretendemos investigar a resistência à polimixina B (PMB) e seus mecanismos moleculares em 126 isolados de *Klebsiella pneumoniae* isolados de swab retal de 11 estados brasileiros durante 2007-2013. Os 126 isolados selecionados foram triados para a resistência à PMB utilizando Etest. Dez isolados foram resistentes e suas CIMs de PMB confirmadas por microdiluição com caldo Mueller-Hinton com cátions ajustados. As MICs para meropenem, imipenem e tigeciclina foram também determinadas por Etest, e susceptibilidade a outros antimicrobianos foram determinados por difusão em ágar. Realizamos PCR e sequenciamento para investigar mutações nos genes *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ* a presença dos genes *mcr-1*, e genes de resistência à  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. PFGE e MLST foram usados para tipagem molecular das cepas. Todos os dez isolados apresentaram interrupção do gene de *mgrB* por sequências de inserção ou mutações missense. A maioria dos isolados carregava *bla*<sub>KPC-2</sub> (n=8) e pertenciam ao complexo clonal 258 (n=7). Esses resultados destacam a importância de monitorar a disseminação de bactérias resistentes a polimixina nos hospitais, uma vez que existem poucas opções para tratar isolados resistentes a vários medicamentos.

## *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil

Caio Augusto Martins Aires, Polyana Silva Pereira, Marise Dutra Asensi, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

We aimed to investigate polymyxin B (PMB) resistance and its molecular mechanisms in 126 *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal swabs in Brazil. Ten isolates exhibited PMB resistance with interruption of *mgrB* gene by insertion sequences or missense mutations. Most of the PMB-resistant isolates harbored *bla*<sub>KPC-2</sub> ( $n = 8$ ) and belonged to clonal complex 258 (CC258) ( $n = 7$ ). These results highlight the importance of monitoring the spread of polymyxin-resistant bacteria in hospitals, since few options remain to treat multidrug-resistant isolates.

Polymyxin has been widely used to treat infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria, including *Klebsiella pneumoniae*. However, reports of polymyxin-resistant *K. pneumoniae* (PRKP) isolates have increased worldwide, becoming a great public health concern (1).

Most studies on PRKP have focused on patients with infections. However, there have been few reports assessing data on PRKP carriage in patients around the world (2). Some studies have described a remarkable and concerning number of patients who developed infection by PRKP after previous colonization, resulting in elevated mortality rates (3, 4). Colonization by KPC-producing *K. pneumoniae* and polymyxin therapy are considered important risk factors for PRKP infection (5, 6).

Studies have demonstrated that modifications of PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ two-component systems and inactivation of the *mgrB* gene (a regulator of the PhoP/PhoQ system) led to polymyxin resistance by modification of the lipopolysaccharide target (7). Recently, the plasmid-mediated transferable polymyxin resistance *mcr-1* gene, causing resistance by modification of lipid A, was identified in China in *Escherichia coli* and *K. pneumoniae* strains (8).

Here, we searched for molecular mechanisms associated with polymyxin resistance in *K. pneumoniae* isolates from Brazil. A first-step screening for polymyxin B (PMB) resistance was conducted using Etest (bioMérieux, France) in 126 isolates randomly selected from approximately 850 *K. pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to carbapenems recovered from rectal swabs

from 11 Brazilian states during 2007 to 2013. The bacterial identification was confirmed by conventional biochemical techniques. Considering the PRKP strains showing a MIC of >2.0 mg/liter (9), 10 (8%) PRKP isolates were observed and included in this study. These 10 PRKP isolates were collected between 2009 and 2013 from five Brazilian states (Fig. 1).

To confirm the resistance phenotype, the PMB MIC was retested in duplicate by microdilution with cation-adjusted Mueller-Hinton broth (10). The isolates showed a MIC<sub>50</sub> of 64 mg/liter, a MIC<sub>90</sub> of >128 mg/liter, and a MIC range of 16 to >128 mg/liter (Table 1). Concordant Etest and microdilution results were found for only three isolates. The Etest MICs tended to be 1.3-fold to 4.0-fold lower than the microdilution MICs. Discrepancy between the two methodologies demonstrated that the Etest provided a

Received 6 July 2016 Returned for modification 24 July 2016

Accepted 3 September 2016

Accepted manuscript posted online 12 September 2016

Citation Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. 2016. *mgrB* mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 60:6969–6972. doi:10.1128/AAC.01456-16.

Address correspondence to Marise Dutra Asensi, marise@ioc.fiocruz.br, or Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, anapdca@ioc.fiocruz.br.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

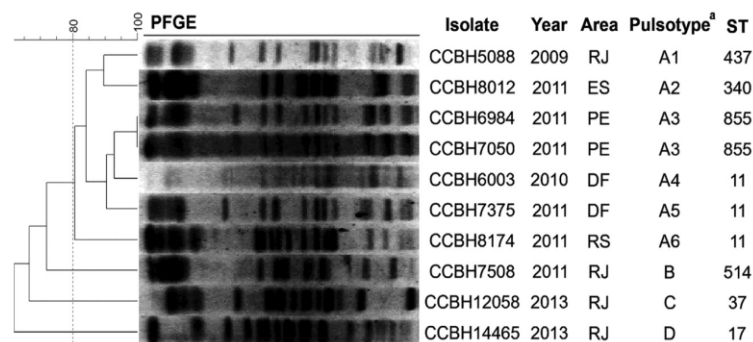


FIG 1 Epidemiological and molecular typing of polymyxin B-resistant *K. pneumoniae* isolates analyzed in this work. DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; PE, Pernambuco; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; ST, sequence type. The PFGE pulsotypes and subtypes (indicated by a superscript “a”) were defined as strains with at least 80% and 95% similarities, respectively.

TABLE 1 Phenotypic and molecular characterization of polymyxin B-resistant *K. pneumoniae* isolates analyzed in this work

| Isolate               | PMB MIC (mg/liter) <sup>a</sup> |                | Modification in protein <sup>b</sup> |                            | Additional susceptibility profile <sup>c</sup> |       |      |   | Resistance genes <sup>d</sup> |   |
|-----------------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------------|----------------------------|--|-------|------|---|-------------------------------|---|
|                       | Etest                           | Broth dilution | MgrB                                 | PmrB                       | PmrA   | PhoP  | PhoQ | Nonsusceptible to:  |                               | Susceptible to:   |
| CCBH5088 <sup>d</sup> | 192                             | > 128          | Gene disrupted by IS903B             | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | A30S' | WT   | FOT, CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, GEN, CIP, SXT, CHL, MEM, ERT, IPM           | AMK, TGC                      | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib  |
| CCBH6003 <sup>d</sup> | 64                              | 128            | Gene disrupted by IS903B             | Gene deletion (570 bp)     | WT   | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, CIP, SXT, MEM, ERT, IPM                          | FOT, AMK, GEN, CHL, TGC       | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>qnrS</i> , <i>aadA</i> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib                                |
| CCBH6984 <sup>d</sup> | 32                              | 128            | Gene disrupted by IS903B             | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | WT    | WT   | FOT, CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, GEN, CIP, SXT, CHL, MEM, ERT, IPM, TGC | FOT, MEM, IPM, CHL, TGC       | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-MP</sub> , <i>qnrB</i> , <i>aadA</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib               |
| CCBH7050 <sup>d</sup> | 32                              | > 128          | Gene disrupted by IS903B             | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, GEN, CIP, SXT, CHL, ERT, TGC                | FOT, MEM, IPM, CHL, TGC       | <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-MP</sub> , <i>qnrB</i> , <i>aadA</i> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib                                |
| CCBH7375 <sup>d</sup> | 24                              | 64             | Gene disrupted by IS10L              | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | WT    | WT   | FOT, CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, CIP, SXT, MEM, ERT, IPM                | GEN, CHL, TGC                 | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib   |
| CCBH7508              | 16                              | 16             | Gene disrupted by IS5                | WT                         | WT   | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, GEN, CIP, MEM, ERT, IPM                     | FOT, SXT, CHL, TGC            | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib  |
| CCBH8012 <sup>d</sup> | 64                              | 64             | C28R <sup>b</sup>                    | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, GEN, CIP, SXT, CHL, MEM, ERT, IPM           | FOT, TGC                      | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-MP</sub> , <i>qnrA</i> , <i>aadA</i> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib |
| CCBH8174 <sup>d</sup> | 48                              | 128            | Gene disrupted by ISKpn26            | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, GEN, CIP, SXT, CHL, MEM, ERT, IPM           | FOT, TGC                      | <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-MP</sub> , <i>aadA</i> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib  |
| CCBH12058             | 12                              | 16             | Q30stop <sup>b</sup>                 | T246A', R256G <sup>e</sup> | WT   | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, SXT, CHL, MEM, ERT, IPM                          | FOT, AMK, GEN, CIP, TGC       | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib  |
| CCBH14465             | 24                              | 32             | Gene disrupted by IS102              | T246A'                     | E57G'  | WT    | WT   | CAZ, ATM, FEP, CTX, TZP, AMK, CIP, SXT, CHL, MEM, ERT, IPM, TGC           | FOT, AMK                      | <i>bla</i> <sub>KPC-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-50</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-5</sub> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>aadB</i> , <i>aac</i> (3)/IIa, <i>aac</i> (6')-Ib                                |

<sup>a</sup> PMB, polymyxin B.

<sup>b</sup> WT, wild type.

<sup>c</sup> ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; TZP, piperacillin-tazobactam; ERT, ertrapenem; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CHL, chloramphenicol; FOT, fosfomicin/trometamol; MEM, meropenem; IPM, imipenem; TGC, tigecycline.

<sup>d</sup> Isolates belonging to CC258.

<sup>e</sup> Mutation predicted as deleterious by PROVEAN.

<sup>f</sup> Mutation predicted as neutral by PROVEAN.

<sup>g</sup> The resistance genes searched were related to polymyxin resistance (*mcr-1*), plasmid-mediated quinolone resistance [*aadA*, *qnrB*, *qnrS*, *aadB*, *aac*(3)/IIa, *aac*(6')-Ib], and β-lactam resistance (*bla*<sub>KPC-23</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>QJM-2</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub>, *bla*<sub>TEM-50</sub>, *bla*<sub>CTX-MP</sub>).

conservative estimate (11). Furthermore, the cation concentration variability of culture media was correlated to the low accuracy and discrepancies in Etest results (12); thus, the use of a dilution method to confirm the PMB susceptibility is recommended (13).

The MICs for meropenem, imipenem, and tigecycline were also determined by Etest, and susceptibility to other antimicrobial agents was determined by agar diffusion (Table 1). Most of the isolates were nonsusceptible to  $\beta$ -lactams ( $n = 10$ ), ciprofloxacin ( $n = 9$ ), sulfamethoxazole-trimethoprim ( $n = 9$ ), gentamicin ( $n = 7$ ), chloramphenicol ( $n = 7$ ), and amikacin ( $n = 6$ ) and remained susceptible to fosfomycin/trometamol ( $n = 7$ ) and tigecycline ( $n = 7$ ). Data from SENTRY (2008 to 2010) showed a 3.2% incidence of PRKP isolates in Brazil (14). This rate increased to 6.6% for extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae* isolates from medical centers in Latin America in 2011 (15) and 9.7% for KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates from Brazil in 2010 (16), showing a clear association between PMB resistance and other acquired resistance mechanisms.

We performed PCR to detect resistance genes to  $\beta$ -lactams, quinolones, and aminoglycosides and performed sequencing when required. Genetic determinants associated with resistance to those classes were observed in all isolates (Table 1), with *bla*<sub>KPC-2</sub> observed in eight strains. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (17) and multilocus sequence typing (MLST) (18) analyses (Fig. 1) revealed four pulsotypes (A [A1 to A6], B, C, and D) and seven sequence types (ST), which may indicate independent events of PMB resistance acquisition. A total of seven PRKP isolates belonged to clonal complex 258 (CC258), the most important CC associated with KPC production (19). Corroborating our findings, the expansion of PRKP isolates belonging to ST11 (CC258) and harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> was previously reported in Brazil in 2014 (20). The data raise concerns about the surveillance of PRKP spread, since PMB is one of the limited number of treatment options against infections caused by the endemic KPC-2-producing *K. pneumoniae* strains in Brazil (21).

To investigate the presence of *mcr-1* and related variants and mutational events affecting *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, and *phoQ* genes, PCR and DNA sequencing were conducted. Mutation analysis of genes involved in polymyxin resistance was performed using Geneious (6.1.8) software and the BLASTN (NCBI) tool. The online platform ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr>) was employed to identify insertion sequences (IS) and the PROVEAN platform (<http://provean.jcvi.org/index.php>) to predict alterations of biological functions of the proteins by the use of *K. pneumoniae* MGH 78578 (CP000647.1) as a reference.

Regarding polymyxin resistance, the presence of the *mcr-1* gene was not detected. All of the PRKP strains exhibited alterations in the *mgrB* gene (Table 1), including disruption by IS903B, IS5, IS102, ISKpn26 (IS5 family), and IS10L (IS4 family). Previous studies (2, 22, 23, 24) have already shown the interruption of the *mgrB* region by IS10-like and IS5-like elements. This mechanism seems to be common in *K. pneumoniae*, including KPC-producing isolates of CC258 (22). In Brazil, disruption of *mgrB* by IS903 was already reported in a BKC-1 (Brazilian *Klebsiella* carbapenemase-1)-producing *K. pneumoniae* isolate from São Paulo (25). In addition, deleterious mutations (C28R and Q30stop) were observed in *mgrB*. Mutations at these same amino acid positions were also reported in PRKP isolates from Europe (2, 22, 26).

Alterations in the *phoQ* gene were not detected. However, a partial deletion of the *PmrB*-encoding gene was identified in one

isolate and a deleterious mutation (R256G) was found in seven isolates (Table 1). This specific mutation was not related to polymyxin resistance as previously reported (27). The T246A, E57G, and A30S mutations detected in *PmrB*, *PmrA*, and *PhoP*, respectively, were not considered deleterious by PROVEAN. Furthermore, we suggest that the specific *PmrB* (T246A) and *PmrA* (E57G) mutations found in this study were not capable of producing PMB resistance alone, since these mutations were also found in PMB-susceptible isolates (data not shown).

In this study, the disruption of the *mgrB* gene was shown to be associated with PMB resistance in *K. pneumoniae*. It is worrisome that the spread of PRKP in Brazil is associated with KPC-producing strains belonging to the epidemic CC258 variant. The present findings indicate the importance of broad and effective monitoring of PMB-resistant Gram-negative bacteria in order to follow the evolution of PMB resistance in Brazil, as well the importance of screening for PMB resistance in colonized nosocomial patients in order to prevent possible infection by these pathogens.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the PDTIS-IOC DNA Sequencing Platform for DNA sequencing.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and PAPES/Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ).

We declare no conflict of interests.

## FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Marise Dutra Asensi, was funded by MCTI | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work, including the efforts of Marise Dutra Asensi, was funded by PAPES/Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ). This work, including the efforts of Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, was funded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## REFERENCES

- Ah YM, Kim AJ, Lee JY. 2014. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents 44:8–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016>.
- Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Chaisiri K, Komalamisra C, Adelowo OO, Fagade OE, Banjo OA, Oke AJ, Adler A, Assous MV, Morand S, Raoult D, Rolain JM. 2014. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob Agents 44:500–507. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020>.
- Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Koukos G, Galani I, Poulakou G, Dimopoulos G, Antoniadou A, Armaganidis A, Giamarelou H. 2011. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. Clin Microbiol Infect 17:E9–E11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03649.x>.
- Rodrigues Perez LR, Dias CG. 2016. Emergence of infections due to a polymyxin B-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: what is the role of a previous colonization? Infect Control Hosp Epidemiol 37:240–241. <http://dx.doi.org/10.1017/ice.2015.294>.
- Giacobbe DR, Del Bono V, Treccarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, Bartoloni A, Losito AR, Corcione S, Bartoletti M, Mantengoli E, Saffioti C, Pagani N, Tedeschi S, Spanu T, Rossolini GM, Marchese A, Ambretti S, Cauda R, Viale P, Viscoli C, Tumbarello M; ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva). 2015. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: re-



- sults from a multicenter case-control-control study. *Clin Microbiol Infect* 21:1106.e1–1106.e8.
6. Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, de Andrade LN, Darini AL, Martinez R. 2015. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 48:483–487. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0041-2015>.
  7. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 5:643. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>.
  8. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
  9. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing—(BrCAST)—EUCAST. 2016. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 6.0, 2016. <http://brcast.org.br>.
  10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
  11. Lat A, Clock SA, Wu F, Whittier S, Della-Latta P, Fauntleroy K, Jenkins SG, Saiman L, Kubin CJ. 2011. Comparison of polymyxin B, tigecycline, cefepime, and meropenem MICs for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by broth microdilution, Vitek 2, and Etest. *J Clin Microbiol* 49:1795–1798. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02534-10>.
  12. Girardello R, Bispo PJM, Yamanaka TM, Gales AC. 2012. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. *J Clin Microbiol* 50:2414–2418. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06686-11>.
  13. Perez LR. 2015. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan Walk-Away automated system. *APMIS* 123:951–954. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12438>.
  14. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 73:354–360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>.
  15. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro ALL, Martino MDV, Vega S, Zurita J, Cepparulo M, Castanheira M. 2013. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Brazilian J Infect Dis* 17:672–681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.07.002>.
  16. Pereira PS, de Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. 2013. 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* 68:312–316. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks396>.
  17. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3:59–67. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>.
  18. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Patrick AD, Grimont PAD, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43:4178–4182. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
  19. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5873–5884. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01019-15>.
  20. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini ALC. 2014. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS-1, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *J Clin Microbiol* 52:2530–2535. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00088-14>.
  21. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13:785–796. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).
  22. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, Tryfinopoulou K, Vatopoulou A, Rossolini GM; COLGRIT Study Group. 2014. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5696–5703. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03110-14>.
  23. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P. 2015. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 70:75–80. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku323>.
  24. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, Rossolini GM. 2013. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5521–5526. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01480-13>.
  25. Martins WMBS, Nicoletti AG, Santos SR, Sampaio JLM, Gales AC. 22 July 2016. Frequency of BKC-1-producing *Klebsiella* species isolates. *Antimicrob Agents Chemother* <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00470-16>.
  26. Britto XB, Plantinga NL, Lammens C, Poirel L, Nordmann P, Bonten MJ, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016. Novel mgrB variants identified in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*, abstr O594. Abstr 26th Eur Cong Clin Microbiol Infect Dis (ECCMID), 9 to 12 April 2016, Amsterdam, Netherlands.
  27. Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. 2015. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2909–2913. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04763-14>.

#### 4.3. Artigo 3 - Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to Ceftazidime-Avibactam isolated in Brazil.

- **Objetivo:** Descrever as características genéticas de um isolado XDR de *K. pneumoniae* produtor de KPC-2 através do sequenciamento de genoma total.
- **Situação do Manuscrito:** publicado na *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Fator de Impacto da Revista: 2.401 (Qualis-Capes B1).
- **Referência:** Aires CAM, Rybak MJ, Yim J, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Albano RM, Cavalcanti VO, Carvalho-Assef APD, Gomes MZ, Asensi MD. Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to Ceftazidime-Avibactam isolated in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Nov; 89(4): 324-327.

**Resumo:** Bacilos Gram-negativos extensivamente resistentes (XDR) e pan-droga resistentes (PDR) têm sido um grande desafio na medicina. Este estudo caracteriza geneticamente um isolado de *Klebsiella pneumoniae* XDR. Foram incluídos dois isolados de *K. pneumoniae* mostrando inicialmente, possíveis perfis PDR, coletados de um mesmo paciente internado em Pernambuco (2010). Identificação e perfil de resistência foram realizadas pelo sistema Vitek 2. PCR e teste Carba-NP modificado foram realizados para detecção de carbapenemases. A clonalidade dos isolados foi investigada por PFGE (XbaI). A cepa CCBH6984 foi submetida ao sequenciamento de genoma completo; investigação da localização do gene *bla*<sub>KPC</sub> por S1-PFGE e Southern blotting; testes de susceptibilidade antimicrobiana adicionais e testes de sinergismo antimicrobiano por análise da curva de tempo-morte. Os dois isolados pertenciam ao mesmo clone, mostraram resistência a todos os antimicrobianos inicialmente testados e eram positivos para o gene *bla*<sub>KPC</sub>. Os testes adicionais em CCBH6984 mostraram resistência a todos os antimicrobianos, exceto ceftazidima-avibactam, confirmando o perfil XDR. Os testes de sinergismo antimicrobiano não obtiveram sucesso. CCBH6984 pertencia ao sorotipo capsular K10 e ao ST855 (CC258). Vários genes de virulência e genes e mutações associadas à resistência antimicrobiana foram encontrados. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> estava inserido em um elemento genético não-Tn4401 transportado por um plasmídeo IncQ de 16.499 pb. Estes resultados alertam para o fortalecimento do monitoramento de bactérias XDR e PDR.



## Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to ceftazidime-avibactam isolated in Brazil



Caio Augusto Martins Aires <sup>a</sup>, Michael J. Rybak <sup>b</sup>, Juwon Yim <sup>b</sup>, Polyana Silva Pereira <sup>a</sup>, Cláudio M. Rocha-de-Souza <sup>a</sup>, Rodolpho Mattos Albano <sup>c</sup>, Valdelucia Oliveira Cavalcanti <sup>d</sup>, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef <sup>a</sup>, Marisa Zenaide Ribeiro Gomes <sup>a</sup>, Marise Dutra Asensi <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Anti-Infective Research Laboratory, Department of Pharmacy Practice, Wayne State University, Detroit, MI, USA

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bacteriologia, Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral (Lacen-PE), Pernambuco, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 April 2017

Received in revised form 5 July 2017

Accepted 21 August 2017

Available online 25 August 2017

#### Keywords:

*Klebsiella pneumoniae*

Extensively drug-resistant

XDR

KPC-2

Colistin resistance

### ABSTRACT

In this study, we describe the genetic features of an XDR KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate by using whole-genome sequencing, its clinical-epidemiological context and susceptibility against antimicrobial combinations. The isolate belongs to clonal complex 258 and harbors several acquired genes and mutations associated with antimicrobial resistance.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Over the last decade, multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacilli have become a major challenge due to the intractable infections caused by such pathogens (Karaiskos and Giamarellou, 2014; Rossolini et al., 2014). MDR isolates are defined as those which presented acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories, XDR isolates with acquired non-susceptibility to at least one agent in all but two or fewer antimicrobial categories and PDR isolates with acquired non-susceptibility to all agents in all antimicrobial categories (Magiorakos et al., 2012). This study describes the genetic features of an XDR-*Klebsiella pneumoniae* isolate using whole-genome sequencing (WGS), with its clinical-epidemiological context and susceptibility against antimicrobial combinations.

Two *K. pneumoniae* initially identified as showing a possible PDR profile were included in this study. The isolates were received by the Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH–Fiocruz) during 2010–2011 as part of the Bacterial Nosocomial Infection Resistance Surveillance network. Both isolates were collected from

the same patient, a 75-year-old man admitted to a hospital in northeast Brazil (Pernambuco State) in November 2010 due to pyelonephritis and nephrolithiasis. The patient was submitted to urostomy and treated with ciprofloxacin (400 mg/12 h). Three days after, he was found to be colonized by a carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strain (CCBH6984) by rectal swab culture. After discharge, this patient was readmitted 6 months later (May 2011) with bladder cancer and bone metastasis. During the hospitalization, he developed a urinary tract infection caused by another carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CCBH8353) and died 2 months later.

The strains (CCBH6984 and CCBH8353) were identified by the Vitek 2 (BioMérieux, France) and showed non-susceptibility to all antimicrobials tested. Carbapenemase production was confirmed by modified Carba-NP test (Campana et al., 2017). Investigation by multiplex PCR (Monteiro et al., 2012) detected the *bla*<sub>KPC</sub> gene in both isolates. PFGE (XbaI) analyses (Ribot et al., 2006) displayed indistinguishable band patterns.

Following the criteria to define MDR, XDR and PDR bacteria (Magiorakos et al., 2012), additional antimicrobial susceptibility tests (Table 1) were performed in CCBH6984 by using broth microdilution or Etest (BioMérieux) or disk diffusion (Oxoid, UK) methods according

\* Corresponding author. Tel.: +55-2125621636; fax: +55-2125621634.

E-mail address: [marise@ioc.fiocruz.br](mailto:marise@ioc.fiocruz.br) (M.D. Asensi).

**Table 1**  
Antimicrobial susceptibility and genetic determinants associated with the XDR phenotype of *Klebsiella pneumoniae* strain CCBH6984.

| Genetic determinants associated with resistance   | Antimicrobial category <sup>b</sup>   | Antimicrobial susceptibility test                  |                         |                         |      |
|---|---|--|-------------------------|-------------------------|------|
|   |   | Antimicrobial agent <sup>b</sup>                   | Disk diffusion          | MIC <sup>c</sup> (mg/L) |      |
| <i>aac(6′)-Iq</i> , <i>aac(3)IV</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph(3′)-Ia</i> , <i>aph(3′)-VII</i>       | Aminoglycosides   | Gentamicin   | NS                      | 32                      |      |
|   |   | Amikacin   | NS                      | 64                      |      |
|   |   | Tobramycin   | -                       | >64                     |      |
|   | Penicillins   | Netilmicin   | -                       | >64                     |      |
|   |   | Ampicillin   | NS                      | >256                    |      |
|   |   | Amoxicillin/Clavulanate                            | NS                      | -                       |      |
|   |   | Penicillins/β-lactamase inhibitors                 | Ampicillin/Sulbactam    | NS                      | -    |
|   |   | Antipseudomonal penicillins/β-lactamase inhibitors | Ticarcillin/Clavulanate | NS                      | -    |
|   |   |  | Piperacillin/Tazobactam | NS                      | -    |
|   |   | Anti-MRSA cephalosporins                           | Ceftaroline             | NS                      | -    |
|   | Monobactams   | Aztreonam  | NS                      | -                       |      |
|   | <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-11</sub></i> , <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> , OmpK36 insertion (ins140-141TYGSD <sup>a</sup> ) | Carbapenems  | Ertapenem               | NS                      | >64  |
|   |   |  | Imipenem                | NS                      | >32  |
| Meropenem   |   |  | NS                      | >64                     |      |
| 3rd and 4th generation cephalosporins   |   | Doripenem  | NS                      | -                       |      |
|   |   | Cefotaxime   | NS                      | >256                    |      |
|   |   | Ceftazidime  | NS                      | >256                    |      |
|   |   | Cefepime   | NS                      | >256                    |      |
|   |   | Cefoxitin  | NS                      | >256                    |      |
| Cephameycins  |   | Cefotetan  | -                       | >64                     |      |
|   |   | Cefalothin   | NS                      | >256                    |      |
| 1st and 2nd generation cephalosporins   |   | Cefazolin  | -                       | >64                     |      |
|   |   | Cefuroxime   | -                       | >256                    |      |
|   |   | Ciprofloxacin                                      | NS                      | >32                     |      |
| <i>oqxAB</i> , <i>qnrB19</i> , <i>CyrA</i> mutation (S831), <i>ParC</i> mutation (S801), <i>OqxR</i> mutation (V130A <sup>a</sup> ) | Fluoroquinolones  | Levofloxacin                                       | NS                      | 64                      |      |
|   | Folate-pathway Inhibitors   | Trimethoprim/Sulfamethoxazole                      | NS                      | >64                     |      |
|   |   | Phenicol   | Chloramphenicol         | NS                      | >256 |
| <i>chlA1</i>  | Phosphonic acids  | Fosfomicin   | -                       | >64                     |      |
|   |   | Tetracycline                                       | NS                      | >256                    |      |
| <i>fosA</i>   | Tetracyclines   | Doxycycline  | -                       | 64                      |      |
|   |   | Minocycline  | NS                      | -                       |      |
| <i>tet(A)</i>   | Glycylcyclines  | Tigecycline <sup>d</sup>                           | -                       | 8                       |      |
|   |   | Colistin   | -                       | 64                      |      |
| <i>tet(A)</i> , <i>OqxR</i> mutation (V130A <sup>a</sup> )  | Polymyxins  | Polymyxin B  | -                       | 128                     |      |
|   |   |  |                         |                         |      |

NS, non-susceptible; MIC, minimal inhibitory concentration.

<sup>a</sup> Deleterious mutations indicated by Provean.

<sup>b</sup> Antimicrobial categories and agents used to define multidrug-resistance, extensively drug-resistance and pandrug-resistance for Enterobacteriaceae according to Magiorakos et al. (2012).

<sup>c</sup> MIC was performed by Etest for ampicillin, cefalothin, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, cefuroxime, chloramphenicol, ciprofloxacin, imipenem, tetracycline, broth microdilution for amikacin, cefazolin, cefotetan, colistin, doxycycline, ertapenem, gentamicin, levofloxacin, meropenem, netilmicin, polymyxin B, sulfamethoxazole/trimethoprim, tigecycline, tobramycin and agar dilution for fosfomicin.

<sup>d</sup> Regarding the tigecycline resistance, the presence of *tet(X)* gene and deleterious mutations in *ramA*, *marA*, *soxS*, *ramR*, *marR*, *soxC*, *soxR*, *acrA*, *acrB*, *acrR*, *tolC*, *roB*, *rarA*, *oqxA*, *oqxB*, *oqxR*, *lon* and *rpsJ* genes were investigated.

to CLSI criteria (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016), except for tigecycline and polymyxins which EUCAST breakpoints were used (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2016) and for fosfomicin we used the agar dilution protocol published elsewhere (Falagas et al., 2008). CCBH6984 showed non-susceptibility to all antimicrobials (Table 1), except for ceftazidime-avibactam (MIC 0.5 mg/L), confirming the XDR profile. Ceftazidime-avibactam is a new drug with activity against ESBL, AmpC and KPC producers (Zhan et al., 2013), but remains unavailable in Brazil, which means that possible infections caused by such pathogen are untreatable by monotherapy with available antibiotics. Resistance to ceftazidime-avibactam has already been described in *K. pneumoniae* producing KPC-3 mutants (Shields et al., 2017), suggesting that despite the need for new antibiotics (Rossolini et al., 2014; Tängdén and Giske, 2015), strengthening of strategies to reduce XDR bacteria spread and the optimization of the available antimicrobial therapy remain as priorities (Rossolini et al., 2014).

To identify possible treatments, the potential for synergistic antimicrobial interactions was evaluated by time-kill curve analysis in CCBH6984. Time-kill studies were performed using a 24-well microwell plate containing cation-adjusted Muller-Hinton Broth (Difco, USA) as growth media. Each plate was inoculated with initial inoculums of  $\sim 1 \times 10^6$  cfu/mL, and combination of colistin at 32 mg/L (0.5×MIC) and meropenem at 49 mg/L (fCmax of meropenem 1 g) were evaluated against the strain. Daptomycin at 9.39 mg/L (fCmax of daptomycin 6 mg/kg) was added to

investigate the potential additional benefit compared to meropenem plus colistin alone. Broth samples were taken at 0, 4, 8 and 24 h, serially diluted in sterile normal saline, and plated on Tryptic Soy Agar (Difco) using a spiral platter. Plates were incubated for 24 h at 35 °C for colony enumeration. Time-kill curves were generated by plotting bacterial CFU/mL against each time point. Synergy was defined as a  $>2 \log_{10}$  cfu/mL reduction compared to the most active single agent of the combination at 24 h while achieving  $\geq 1 \log_{10}$  cfu/mL reduction from the initial inoculum. However, the tested combinations did not achieve synergistic activity (Fig. 1).

WGS of CCBH6984 was performed on a MiSeq platform (Illumina, USA). The genome was assembled using A5 assembly pipeline (Coil et al., 2015) and annotated on RAST v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org>). MLST and resistance genes were searched using the Center for Genomic Epidemiology platform ([www.genomicepidemiology.org](http://www.genomicepidemiology.org)). Virulence genes, plasmids and mutations in genes involved in antimicrobial resistance were investigated by manual curation with Geneious v.6.1.8 (Biomatters Ltd., New Zealand) and BLASTN tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The online platform ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr>) was assessed to identify insertion sequences (IS) and the Provean tool (<http://provean.jcvi.org/index.php>) was used to predict the alterations in the biological function of proteins using the genome of *K. pneumoniae* MGH78578 (GenBank: CP000647) as reference.

Genome analysis revealed that CCBH6984 (GenBank: MCNT00000000) belongs to ST855, already detected in Pernambuco State and Ecuador, respectively associated with KPC-2 and ESBL production (Nordberg et al.,

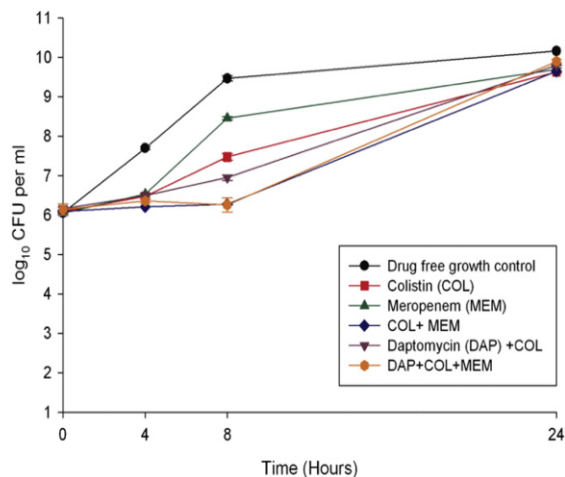


Fig. 1. Time-kill curve assay showing no synergistic effect in *Klebsiella pneumoniae* strain CCBH6984.

2013; Pereira et al., 2013). The ST855 is a member of the clonal complex 258 (CC258) which is closely associated with KPC and widespread in Brazil and worldwide (Pereira et al., 2013). Moreover, the expansion of XDR KPC-2-producing CC258 *K. pneumoniae* isolates has been already reported in Brazil (Andrade et al., 2014), which alerts for the screening of XDR strains and monitoring of its evolution.

Corroborating the XDR phenotype, several genes and mutations associated with antimicrobial resistance were found in CCBH6984 (Table 1), including insertions in chromosomal genes encoding OmpK36 and MgrB, related to carbapenem and polymyxin resistance, respectively. The global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae showing XDR phenotypes is one of the most worrying issues (Karaïskos and Giamarellou, 2014; Rossolini et al., 2014; Tängdén and Giske, 2015), particularly *K. pneumoniae* producing carbapenemases, which are usually associated with some clonal lineages of successful spreading and co-acquisition of non-β-lactam resistance genes (Tängdén and Giske, 2015).

Genes or deleterious mutations commonly associated with tigecycline resistance were absent. Nevertheless, the presence of *tet(A)*, previously associated with reduced susceptibility to tigecycline in *Salmonella enterica* (Akiyama et al., 2013), was observed. We also observed a mutation in OqxR (V130A), previously reported in *K. pneumoniae*, although its role in tigecycline resistance is not well-established (Velega et al., 2012). The complexity of tigecycline resistance mechanisms has been highlighted and probably other not yet identified mechanisms are involved (Pournaras et al., 2016).

Analysis by S1-PFGE (Barton et al., 1995) followed by Southern blotting (Sambrook et al., 2001) showed that *bla*<sub>KPC-2</sub> was located on a plasmid of ≈16 kb in CCBH6984. Contig analysis showed that this plasmid of 16,499 bp belongs to incompatibility group Q plasmid, an unusual plasmid type harboring *bla*<sub>KPC-2</sub>. This plasmid contained a mobilization system, the phosphotransferase *aph(3')-VII* and the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene carried by a non-Tn4401 element. The *bla*<sub>KPC-2</sub> was surrounded by a disrupted *ISKpn6* with the associated left IR (IRL) upstream and a *tnpR* gene downstream. This structure of 2,389 bp ( $\Delta$ ISKpn6 – *bla*<sub>KPC-2</sub> – *tnpR*) was very similar (99% coverage) to a region found in two KPC-2 harboring plasmids (pKP13d and pKP1194a) isolated from *K. pneumoniae* strains in Paraná, Southern Brazil (GenBank CP003997) (Ramos et al., 2014) and São Paulo, southeastern Brazil (GenBank KX756453) (Cerqueira et al., 2017), respectively.

CCBH6984 belongs to K10 capsular serotype and presented virulence genes such as *ureA* (urease), *ugE* and *wabG* (LPS synthesis), *fimH*, *kpn* and *mrkD* genes (adhesion), *entB* and *iutA* (siderophores), *ycfM* (outer membrane lipoprotein), *terW* (tellurite resistance). Most of the virulence factors found in CCBH6984 are common in clinical

*K. pneumoniae* isolates resistant or susceptible to carbapenems (Candan and Aksöz, 2015; Chiang et al., 2016), corroborating that carbapenem resistance and the presence of virulence genes are weakly correlated in *K. pneumoniae* (Candan and Aksöz, 2015).

This report reinforces the urgent problem of hospital-acquired infections caused by XDR-*K. pneumoniae* in Brazil. As a sentinel laboratory, LAPIH has identified only sporadic cases, while the current situation of the spread of XDR and PDR isolates remain underestimated. It is imperative that the monitoring of XDR bacteria should be strengthened, especially in colonized patients to prevent future infections. In addition, we highlight the need for new drug development and to search for effective therapeutic combinations against XDR and PDR pathogens.

#### Author disclosure statement

All authors contributed equally to this work and approved the final article. MJR has received support for research, consulting and speaker bureau activities from Allergan, Bayer, Cempra, Merck, The Medicine Company, Sunovion and Theravance Therapeutics.

#### Funding

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa – FAPERJ, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, PAPES/Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ) and had collaboration from Wayne State University.

#### References

- Akiyama T, Presedo J, Khan AA. The *tetA* gene decreases tigecycline sensitivity of *Salmonella enterica* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2013;42(2):133–40.
- Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini ALC. 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.
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995;226(2):235–40.
- Campana EH, Chuster SG, da Silva IR, Paschoal RP, Bonelli RR, Moreira BM, et al. Modified Carba NP test for the detection of carbapenemase production in gram-negative rods: optimized handling of multiple samples. *Braz J Microbiol* 2017;48(2):242–5.
- Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochim Pol* 2015;62(4):867–74.
- Cerqueira LT, Cunha MPV, Francisco GR, Bueno MFC, Araujo BF, Ribas RM, et al. IncX3 plasmid harbouring a non-Tn4401 genetic element (NTE KPC) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;89(2):164–7. [Internet] Available from: [http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893\(17\)30213-4/fulltext](http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893(17)30213-4/fulltext).
- Chiang T-T, Yang Y-S, Yeh K-M, Chiu S-K, Wang N-C, Lin T-Y, et al. Quantification and comparison of virulence and characteristics of different variants of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Taiwan and the United States. *J Microbiol Immunol Infect* 2016;49(1):83–90.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing—26th edition. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
- Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 2015;31(4):587–9.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Available at [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf), 2016.
- Falagas ME, Kanellopoulou MD, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G, Rafailidis PI, Skarmoutsou ND, et al. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant gram negative bacteria to fosfomicin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(6):439–43.
- Karaïskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother* 2014;15(10):1–20.
- 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.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(4):906–9.
- Nordberg V, Quizhpe Peralta A, Galindo T, Turlej-Rogacka A, Iversen A, Giske CG, et al. High proportion of intestinal colonization with successful epidemic clones of ESBL-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Ecuador. *PLoS One* 2013;8(10):e76597.

- Pereira PS, de Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APD, 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):312–6.
- Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. Current perspectives on tetracycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48(1):11–8.
- Ramos PIP, Picão RC, de Almeida LGP, Lima NCB, Girardello R, Vivan ACP, et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics* 2014;15(1):54.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom 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.
- Rosolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 2014;18:56–60.
- Sambrook J, MacCallum P, Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Shields RK, Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne *bla*<sub>KPC-3</sub> mutations during treatment of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(3):e02097–6.
- 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(5):501–12.
- Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(8):4450–8.
- Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PRS, et al. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination. *Drugs* 2013;73(2):159–77.

#### 4.4. Artigo 4 - Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring *bla*<sub>CTX-M-8</sub> in Brazil.

- **Objetivo:** Descrever a detecção prévia de um isolado de *K. pneumoniae* carregando *bla*<sub>OXA-370</sub> no Brasil.
- **Situação do Manuscrito:** publicado na *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Fator de Impacto da Revista: 2.401 (Qualis-Capes B1).
- **Referência:** Aires CAM, Rocha-de-Souza CM, Timm LN, Pereira PS, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring *bla*<sub>CTX-M-8</sub> in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Dec; 86(4): 434-436.

**Resumo:**  $\beta$ -lactamases do tipo OXA-48 são mundialmente relatadas em espécies de Enterobacteriaceae. Os primeiros relatos de OXA-48 no Brasil envolveram isolados de Enterobacteriaceae produtores da variante OXA-370 coletados em 2013 no Rio Grande do Sul (RS) e Rio de Janeiro (RJ). Neste estudo, apresentamos evidências que OXA-370 emergiu no Brasil desde 2012, pelo menos. Este estudo detectou uma cepa de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (CCBH10079) que portava o gene *bla*<sub>OXA-370</sub>. Este isolado foi coletado em maio de 2012 no RS, quase um ano antes das detecções seguintes. Análise plasmideal foi realizada por transformação, S1-PFGE e Southern blotting. PCR e sequenciamento foram utilizados para detectar os genes de  $\beta$ -lactamases; a susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada por Etest e a produção de carbapenemases por Blue-Carba teste. A tipagem molecular foi feita por MLST e PFGE (XbaI). CCBH10079 possuía três plasmídeos ( $\cong 57$ ,  $\cong 97$  e  $\cong 288$  kb) e seu transformante (TEC-*p10079*) possuía um plasmídeo de  $\cong 57$  kb, sendo este plasmídeo que albergava o gene *bla*<sub>OXA-370</sub>. Além de *bla*<sub>OXA-370</sub>, CCBH10079 também carregava *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> e *bla*<sub>CTX-M-8</sub> e TEC-*p10079* também apresentava *bla*<sub>CTX-M-8</sub>. CCBH10079 mostrou resistência aos carbapenêmicos enquanto TEC-*p10079* foi suscetível. Além disso, ambas as cepas não apresentaram outros genes ou atividade de carbapenemases. CCBH10079 pertencia ao ST17 e a tipagem por PFGE (XbaI) demonstrou similaridade aos isolados de *K. pneumoniae* ST16 do RJ. Este estudo mostrou que OXA-370 surgiu e está circulando no Brasil antes do que se acreditava. Observamos que o gene *bla*<sub>OXA-370</sub> está associado a *K. pneumoniae* pertencente ao complexo clonal 16-17.



## Note

## Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring *bla*<sub>CTX-M-8</sub> in Brazil

Caio Augusto Martins Aires<sup>a</sup>, Cláudio M. Rocha-de-Souza<sup>a</sup>, Loeci Natalina Timm<sup>b</sup>, Polyana Silva Pereira<sup>a</sup>, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>a</sup>, Marise Dutra Asensi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz — FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS IPB-LACEN-RS), Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 July 2016

Received in revised form 1 September 2016

Accepted 11 September 2016

Available online xxxx

## Keywords:

*Klebsiella pneumoniae*

OXA-370

Molecular typing

ST17

## ABSTRACT

We aimed to describe an early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. The isolate CCBH10079 belonged to ST17 and the *bla*<sub>OXA-370</sub> was located in a plasmid of ≈57 kb.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

The OXA-48-type class D β-lactamases are increasingly reported in Enterobacteriaceae species worldwide. Most of these enzymes hydrolyse penicillins at a high level and carbapenems at a low level, sparing broad-spectrum cephalosporins with few exceptions, and are not susceptible to older β-lactamase inhibitors (Poirel et al., 2012). However, not all OXA-48 variants possess significant activity against carbapenems. These variants differ by few amino acid substitutions or by amino acid deletions which results in modified β-lactam hydrolysis spectrum (Dortet et al., 2015). To date, 20 OXA-48-like variants have been identified and deposited in Beta-Lactamase Data Resources of NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>).

In 2014 occurred the first report of OXA-48-like in Brazil involving *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* isolates collected in 2013 between April and December from Rio Grande do Sul State (RS) in Southern Brazil (Pinto et al., 2014). Further study described an *E. hormaechei* producing an OXA-48 variant named OXA-370 and co-harboring *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub> from RS (Sampaio et al., 2014). Simultaneously, 24 OXA-370-producing isolates, including *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected between August 2013 and January 2014 were reported in Rio de Janeiro State (RJ), in southeastern Brazil. A total of 95% of these *K. pneumoniae* isolates represented a clonal spread of ST16 in 3 hospitals (Pereira et al., 2015).

Here, we present evidence that OXA-370-producing *K. pneumoniae* has been emerging in Brazil since at least 2012. Concerning this, the

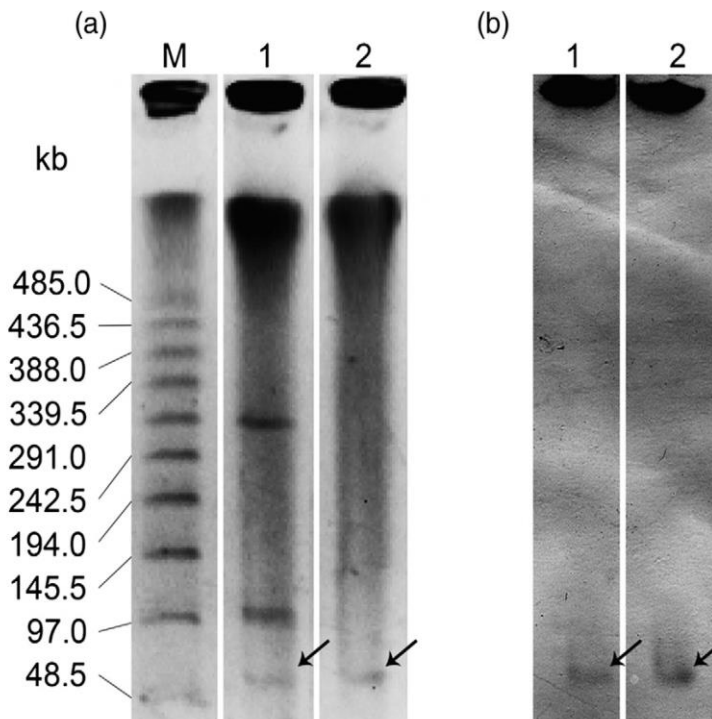
Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), located at Oswaldo Cruz Foundation–RJ, has conducted a retrospective study with 126 randomly selected isolates of approximately 850 *K. pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to carbapenems recovered from rectal swabs from Brazilian hospitals during 2007–2013. This study identified a carbapenem non-susceptible strain (CCBH10079) harboring *bla*<sub>OXA-370</sub> detected by PCR and sequencing. This isolate was collected in May 2012 from RS, almost one year earlier than the following detections (Pinto et al., 2014; Sampaio et al., 2014; Pereira et al., 2015).

Plasmidial DNA of CCBH10079 extracted by QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Germany) was transferred by electroporation into *Escherichia coli* Top10 (Life Technologies). Transformants were selected on Mueller Hinton agar containing ampicillin (100 μg/ml). The analysis by S1 nuclease PFGE revealed the presence of three plasmids of ≈57 kb, ≈97 kb and ≈288 kb in CCBH10079 and the transformant possessed a single plasmid of ≈57 kb. According to southern blot hybridization, both plasmids of ≈57 kb harbored *bla*<sub>OXA-370</sub> (*p10079*) (Fig. 1).

Besides *bla*<sub>OXA-370</sub>, CCBH10079 also carried *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-8</sub> β-lactamase genes, and the transformant (TEC-*p10079*) also carried *bla*<sub>CTX-M-8</sub>. These genes were detected by PCR followed by sequencing. Here, the *p10079* plasmid was non-typeable as plasmid incompatibility group (Carattoli et al., 2005) and had different size than those previously reported in RJ (Pereira et al., 2015). In addition, the *bla*<sub>OXA-370</sub> and *bla*<sub>CTX-M-8</sub> genes found in *p10079* in this study have also been detected in the plasmid of *E. hormaechei* from RS. However, this last plasmid belonging to IncF had a size of ≈150 kb and also contained *bla*<sub>TEM-1</sub> (Sampaio et al., 2014).

\* Corresponding author. Tel.: +55-2125621636; fax: +55-2125621634.  
E-mail address: [marise@ioc.fiocruz.br](mailto:marise@ioc.fiocruz.br) (M.D. Asensi).





**Fig. 1.** Plasmid analysis of the bacterial strains analyzed in this work. Legend: (a) Agarose gel showing S1 nuclease-treated DNA of bacterial strains separated by PFGE. Lanes: M, Lambda molecular weight marker (kb); 1, CCBH10079; 2, TEC-*p10079*; Black arrows indicates the plasmids of ≈57 kb. (b) Southern hybridization of the correspondent gel shown in Fig. 1(a) with the *bla*<sub>OXA48-like</sub> specific gene probe; Black arrows indicates the hybridized plasmids.

Apparently, the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene has high capacity of displacement among different genetic platforms and species. In addition, *bla*<sub>OXA-370</sub> was also found in *Aeromonas punctata* isolate from aquatic environment in RJ (de Araújo et al., 2016), which shows the capacity of *bla*<sub>OXA-370</sub> to disseminate in different environments.

Antimicrobial susceptibility of CCBH10079, TEC-*p10079* and *E. coli* TOP10 were assessed by Etest (Table 1). The CCBH10079 showed non-susceptibility to carbapenems while the TEC-*p10079* was susceptible to these antimicrobials. Furthermore, both strains showed no carbapenemase activity by Blue-Carba test (Pires et al., 2013) and no other carbapenemase genes (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>) were detected by PCR. These results suggest that OXA-370 alone is unable to cause carbapenem resistance. Consequently, the presence of other mechanisms associated with carbapenem resistance as porin loss or eflux pump overexpression in CCBH10079 should not be excluded. As previously reported, additional non-enzymatic resistance mechanisms as porin loss associated with OXA-48-like enzymes increases the MICs for carbapenems (Oueslati et al., 2014). In addition, the TEC-*p10079* MIC for ceftazidime was reduced in the presence of clavulanic acid,

suggesting the expression of CTX-M-8 plays a major role in increasing MICs for this cephalosporin as described (Sampaio et al., 2014).

Molecular typing by PFGE (XbaI) and MLST showed the CCBH10079 had similar band pattern with those clonal isolates of *K. pneumoniae* ST16 from RJ (Pereira et al., 2015) and belonged to ST17. Isolates belonging to ST16 and ST17 are single locus variants and are grouped at the same clonal complex (CC16–17). This finding shows the CC16–17 may have an association with the OXA-370 spread in two Brazilian States.

Thus, this study showed that OXA-370 has emerged and is circulating in Brazil long before that were believed. We observed the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene associated with *K. pneumoniae* belonging to the CC16–17 in different plasmids. We also highlight that further analysis must be performed in order to monitor the evolution of this β-lactamase in the country.

#### Author Disclosure Statement

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

**Table 1**  
Phenotypic and genetic features of the bacterial strains analyzed in this work.

| Strain <sup>a</sup>  | β-Lactamase genes  | Plasmids (kb)                | MIC (μg/mL) <sup>c</sup> |      |      |      |     |     |      |       |      |      |     |      |     |
|----------------------|--|------------------------------|--------------------------|------|------|------|-----|-----|------|-------|------|------|-----|------|-----|
|                      |  |                              | AMP                      | CEF  | CXM  | CTX  | CAZ | TZL | FEP  | ETP   | MEM  | IPM  | AMK | PMB  | TGC |
| CCBH10079            | <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> | ≈57 <sup>b</sup> , ≈97, ≈288 | >256                     | >256 | >256 | 96   | 12  | >4  | >256 | 8     | 2    | 2    | 3   | 0.5  | 1   |
| TEC- <i>p10079</i>   | <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>  | ≈57 <sup>b</sup>             | >256                     | >256 | >256 | 8    | 6   | 0.5 | 6    | 0.5   | 0.03 | 0.12 | 3   | 1    | 0.1 |
| <i>E. coli</i> TOP10 | -  | -                            | 4                        | 8    | 6    | 0.12 | 1.5 | 0.5 | 0.50 | 0.015 | 0.06 | 0.2  | 3   | 0.06 | 0.1 |

<sup>a</sup> CCBH10079, *K. pneumoniae* wild type isolate harboring *bla*<sub>OXA-370</sub>; TEC-*p10079*, transformant strain harboring plasmid *p10079* which contains *bla*<sub>OXA-370</sub> and *bla*<sub>CTX-M-8</sub>; *E. coli* TOP10, recipient strain.

<sup>b</sup> *p10079* = plasmid of ≈57 kb which contains *bla*<sub>OXA-370</sub> and *bla*<sub>CTX-M-8</sub>.

<sup>c</sup> MICs were assessed by Etest for AMP = ampicillin; CEF = cephalothin; CXM = cefuroxime; CTX = cefotaxime; CAZ = ceftazidime; TZL = ceftazidime/clavulanic acid; FEP = cefepime; ETP = ertapenem; MEM = meropenem; IPM = imipenem; AMK = amikacin; PMB = polymyxin B; TGC = tigecycline.

Please cite this article as: Aires CAM, et al, Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring *bla*<sub>CTX-M-8</sub> in Brazil..., Diagn Microbiol Infect Dis (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.007>

## Funding

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa – FAPERJ and Instituto Oswaldo Cruz – IOC – Fiocruz.

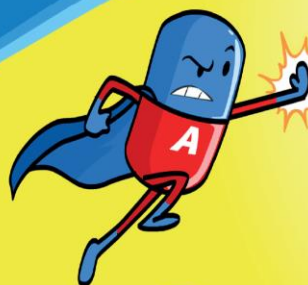
## References

- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63(3):219–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>.
- de Araújo CF, Silva DM, Carneiro MT, Ribeiro S, Fontana-Maurell M, Alvarez P, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio 2016;60:4380–4383. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02753-15.Address>.
- Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tandé D, Naas T, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48 type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase without significant carbapenemase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(7). <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05058-14>. [AAC.05058–14].
- Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2014;70(4):1059–1063.
- Pereira PS, Borghi M, de Araújo CFM, Aires CAM, Oliveira JCR, Asensi MD, et al. Clonal dissemination of OXA-370- producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04243-14>. [AAC.04243–14].
- Pinto FDM, Simas DM, Baldin CP, Limberger II, Cassol R, Antochewis LC, et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. *Clin Biomed Res* 2014;34:47–52. <http://dx.doi.org/10.1090/S0002-9947-1973-0322515-5>.
- Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013;51:4281–4283. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01634-13>.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1597–1606. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks121>.
- Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3566–3567. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02510-13>.

#### 4.5. Cartilha - Resistência bacteriana: o que você deve saber e como prevenir.

- **Objetivo:** Divulgação do tema resistência bacteriana para a população
- **Situação:** Impresso e divulgado online.
- **Referência:** Aires, Caio Augusto Martins. Resistência bacteriana aos antibióticos: o que você deve saber e como prevenir / Elaborado por Caio Augusto Martins Aires, Marise Dutra Asensi; colaboradores: Natália Maria Lanzarini, Bruno Gouveia Motta, Polyana Silva Pereira; programação gráfica e ilustrações: Walter Jr, Fátima Valadão; revisão técnica: Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, Cláudio Marcos Rocha-de- Souza. – Rio de Janeiro : IOC/Fiocruz, 2017.

# **RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS**



**O QUE  
VOCÊ DEVE  
SABER E COMO  
PREVENIR**

Elaborado por  
CAIO AUGUSTO MARTINS AIRES  
MARISE DUTRA ASENSI

Colaboradores  
NATÁLIA MARIA LANZARINI  
BRUNO GOUVEIA MOTTA  
POLYANA SILVA PEREIRA

Programação gráfica e ilustrações  
Walter Jr. (walterdesenho@gmail.com)  
Fátima Valadão  
Edson Paula

Revisão técnica:  
ANA PAULA D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF  
CLÁUDIO MARCOS ROCHA-DE-SOUZA

*É permitida a reprodução parcial ou total  
desta obra, desde que citada a fonte.*

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A298 Aires, Caio Augusto Martins  
Resistência bacteriana aos antibióticos: o que você deve saber e  
como prevenir / Elaborado por Caio Augusto Martins Aires, Marise Dutra  
Asensi; colaboradores: Natália Maria Lanzarini, Bruno Gouveia Motta,  
Polyana Silva Pereira; programação gráfica e ilustrações: Walter Jr,  
Fátima Valadão; revisão técnica: Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef,  
Cláudio Marcos Rocha-de-Souza. – Rio de Janeiro : IOC/Fiocruz, 2017.  
15 p. : il., mapas ; 20 cm.

1. Farmacorresistência bacteriana. 2. Antibacterianos. 3. Prevenção  
de doenças. I. Asensi, Marise Dutra. II. Lanzarini, Natália Maria. III. Motta,  
Bruno Gouveia. IV. Pereira, Polyana Silva. V. Walter Jr. VI. Valadão,  
Fátima. VII. Carvalho-Assef, Ana Paula D'Alincourt. VIII. Rocha-de-  
Souza, Cláudio Marcos. IX. Instituto Oswaldo Cruz. X. Título.

CDD 615.329

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| APRESENTAÇÃO.....                                | 4  |
| INTRODUÇÃO.....                                  | 5  |
| O QUE SÃO BACTÉRIAS?.....                        | 6  |
| O QUE SÃO ANTIBIÓTICOS?.....                     | 7  |
| O QUE É RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS?.....       | 8  |
| O QUE SÃO SUPERBACTÉRIAS?                        |    |
| COMO OCORRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS?..... | 9  |
| COMO SE TRANSMITEM BACTÉRIAS RESISTENTES?.....   | 10 |
| QUEM ESTÁ EM RISCO?.....                         | 11 |
| EXISTE TRATAMENTO?.....                          | 12 |
| EXISTE ALGUMA FORMA DE PREVENÇÃO?                |    |
| PROCEDIMENTOS PARA HIGIENE DAS MÃOS.....         | 13 |
| DICAS AO VISITAR PACIENTES EM HOSPITAIS.....     | 14 |
| USO CORRETO DE ANTIBIÓTICOS.....                 | 15 |

Caro cidadão,  
Esta cartilha foi desenvolvida para conscientizá-lo e orientá-lo sobre a resistência aos antibióticos, bem como instruí-lo acerca da utilização adequada de antibióticos e medidas simples para reduzir a propagação da resistência bacteriana. Nesta cartilha, você também encontrará informações e procedimentos básicos que devem ser seguidos por você, para correta higienização das mãos e visitas a pacientes internados.

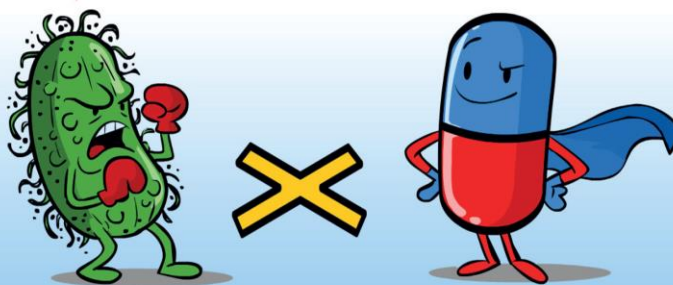
Aproveite!



## INTRODUÇÃO

Você sabia que a resistência aos antibióticos é um dos mais graves problemas de saúde pública mundial? Ela compromete o tratamento de doenças infecciosas, podendo afetar qualquer pessoa independente da idade e em qualquer país. Como consequência, torna as hospitalizações mais longas, maiores custos médicos e aumento da mortalidade. Embora a resistência aos antibióticos aconteça naturalmente, este processo é acelerado pelo uso inadequado de antibióticos.

Pra você ter uma ideia, o combate à resistência aos antibióticos é uma prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS). Como objetivo, a OMS pretende melhorar a conscientização e a compreensão da resistência aos antibióticos através de comunicação, educação e treinamentos efetivos.



5



## O QUE SÃO BACTÉRIAS?

As bactérias são organismos muito pequenos que, geralmente não podem ser vistos a olho nu, somente pelo microscópio, daí o termo micróbio ou micro-organismo. Esses organismos são compostos por uma única célula e, apesar de seu tamanho, elas se multiplicam em grande velocidade por divisão simples, onde uma única célula se divide em duas iguais. Elas podem ser encontradas em todos os lugares: há milhões no ar, na água, no solo e, inclusive, em nossos corpos. Sendo que algumas bactérias são capazes de provocar doenças e merecem nossa atenção.

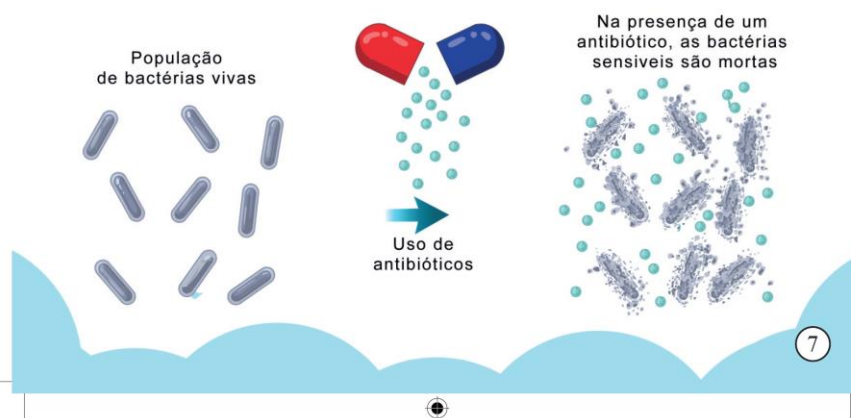
6



## O QUE SÃO ANTIBIÓTICOS?

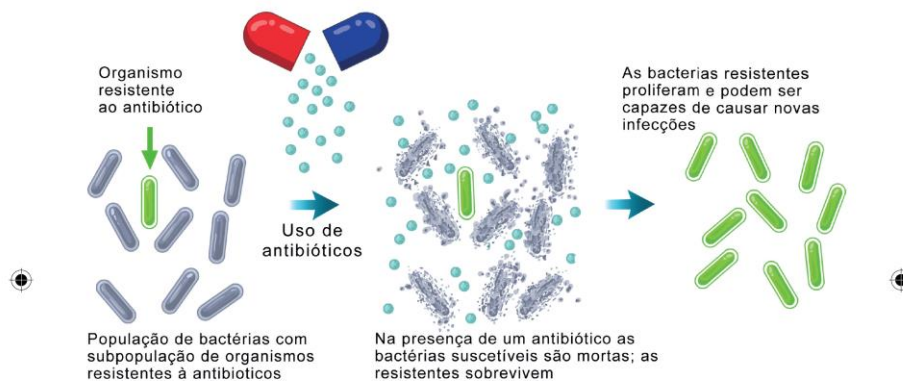
Os antibióticos são substâncias capazes de destruir bactérias ou inibir seu crescimento. Consequentemente, acabam controlando as doenças causadas por micro-organismos, sem causar prejuízos para o paciente. Além de serem utilizados no homem, os antibióticos podem ser usados na agricultura, veterinária e na promoção do crescimento de animais para consumo. Como regra geral, essas substâncias são utilizadas contra bactérias e não apresentam ação contra vírus.

Existem várias bactérias que infectam o homem, assim como existem vários antibióticos específicos para combater cada tipo de infecção. O seu médico vai escolher o melhor antibiótico para tratar a sua infecção bacteriana, bem como a maneira mais eficaz e segura de usá-lo.



## O QUE É RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS?

É a capacidade das bactérias de resistir à sua destruição por um antibiótico. Ou seja, essas bactérias não morrem durante o tratamento com antibióticos e se multiplicam cada vez mais, gerando outras bactérias que também são resistentes, enquanto as bactérias sensíveis são eliminadas.



## O QUE SÃO SUPERBACTÉRIAS?

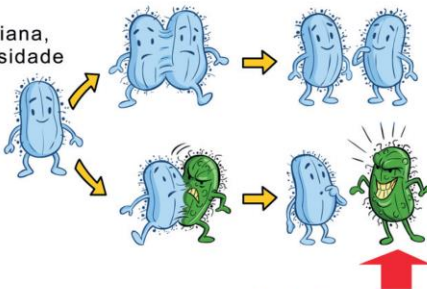
O termo "Superbactérias" é dado popularmente às bactérias multirresistentes, ou seja, àquelas bactérias resistentes a diversos tipos de antibióticos. Trata-se de um micro-organismo que, com o passar do tempo, adquiriu diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos. Assim, seu tratamento fica limitado a pouquíssimos antibióticos eficazes. Mas isso não significa que as Superbactérias possuem maior capacidade de causar doenças ou que essas doenças sejam mais graves.

## COMO OCORRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS?

O uso excessivo de antibióticos dentro dos hospitais, assim como o uso de antibióticos feito pela população, sem prescrição e acompanhamento de um médico, e também, a interrupção do tratamento antes do tempo prescrito podem acelerar o aparecimento de resistência bacteriana.

Existem duas formas de uma bactéria se tornar resistente. Uma é de forma aleatória, por alterações no material genético bacteriano. Outra é adquirindo um material genético externo, seja de outras bactérias ou até de vírus.

Durante a reprodução bacteriana, mutações podem gerar diversidade entre a população, permitindo a presença de bactérias mutantes que podem ser resistentes aos antibióticos.

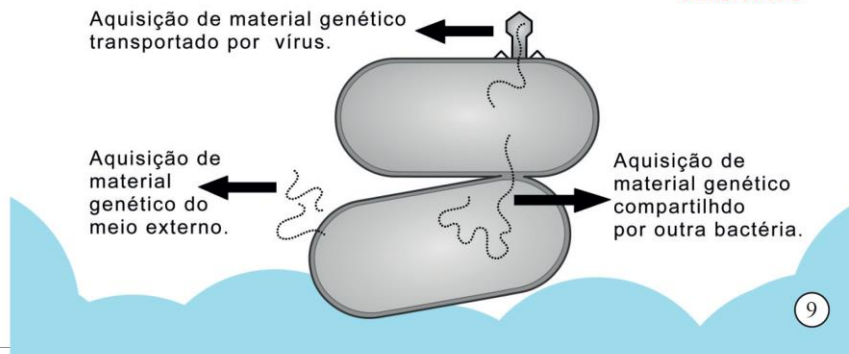


Bactéria mutante resistente aos antibióticos.

Aquisição de material genético transportado por vírus.

Aquisição de material genético do meio externo.

Aquisição de material genético compartilhado por outra bactéria.



9

### COMO SE TRANSMITEM BACTÉRIAS RESISTENTES?

A transmissão de micro-organismos resistentes ocorre principalmente pelo contato das mãos. Por exemplo, dentro de um hospital, se algum profissional tocar em um paciente já com a bactéria resistente e não higienizar adequadamente as mãos pode acabar transmitindo para outro paciente. No hospital, onde os antibióticos são excessivamente utilizados, a ocorrência de bactérias resistentes é muito alta. As bactérias resistentes podem ser encontradas nas camas dos pacientes, nas paredes e nos instrumentos, por isso é tão importante a limpeza completa do local, assim como a lavagem das mãos dos profissionais de saúde e visitantes.

O mesmo também ocorre em visitas a pacientes internados pois caso o visitante não lave as mãos adequadamente, existe a possibilidade de essas bactérias serem levadas para fora do hospital e se disseminarem em diferentes lugares, como transportes públicos, mercados, praias, parques, entre outros.



## QUEM ESTÁ EM RISCO?

A maioria das pessoas não irá desenvolver nenhuma infecção por bactérias resistentes. Porém, devemos nos preocupar mais com as pessoas que possuem a imunidade debilitada. Por exemplo, portadores de doenças crônicas, crianças e idosos, pessoas em uso de antibióticos ou submetidas a procedimentos invasivos (cirurgias, cateteres, sondas, ventilação mecânica, etc.). Nos hospitais, o risco de contrair um micro-organismo resistente é maior por diversas razões: o local é fechado, reúne pessoas que estão com a saúde debilitada e que utilizam antibióticos frequentemente. Ocasionalmente, as infecções por bactérias resistentes podem prolongar o tempo de internação, elevar os custos do tratamento e até causar a morte do paciente.



11

## EXISTE TRATAMENTO?

Apesar do risco, se um paciente contrair uma bactéria resistente não significa que ele irá morrer. Os antibióticos tradicionais não são capazes de tratar adequadamente o paciente, contudo existem (poucas) opções de antibióticos específicos e muito fortes que ainda podem ser utilizadas no tratamento. O grande problema é que estes medicamentos costumam gerar efeitos colaterais indesejados nos pacientes infectados. Também se utilizam combinações de antibióticos para aumentar as chances de cura, que podem apresentar resultados variáveis.

Nos últimos anos, poucos novos antibióticos estão sendo disponibilizados. Contudo, há sempre o risco de as bactérias tornarem-se resistentes a esses novos medicamentos.

## EXISTE ALGUMA FORMA DE PREVENÇÃO?

A principal medida para prevenção é a lavagem das mãos com água e sabão, que deve ser realizada frequentemente por todas as pessoas ao chegarem em casa, depois de usar o transporte público e, especialmente antes e após o contato com os pacientes no ambiente hospitalar, serviços de saúde como homecare, consultórios, ambulatórios, etc. A utilização do álcool a 70% (espuma, líquido ou em gel) também tem o mesmo objetivo e eficácia.

Como o uso de antibióticos aumenta a chance de ocorrer resistência nas bactérias, está cada vez mais claro que esses medicamentos devem ser consumidos somente em caso de necessidade com prescrição médica. E, nesse caso, é fundamental usar no período indicado pelo médico, no horário estabelecido, sem esquecer nenhuma dose.

## PROCEDIMENTOS PARA HIGIENE DAS MÃOS

As mãos são a principal via de transmissão de micro-organismos, portanto a higienização adequada é fundamental para prevenir essa transmissão. Assim, é importante que você:

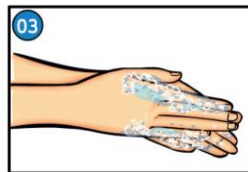
- Lave as mãos com água e sabão. Primeiro, esfregue as palmas das mãos, posteriormente o dorso das mãos, polegares, articulações, pontas dos dedos e punhos.



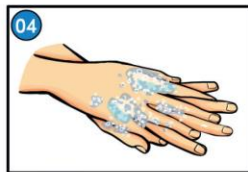
01  
Abrir a torneira e molhar as mãos, evitando encostar-se à pia



02  
Aplicar na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir toda a superfície das mãos (segur a quantidade recomendada pelo fabricante).



03  
Ensaboar as palmas das mãos, friccionando-as entre si



04  
Esfregar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda, entrelaçando os dedos, e vice-versa.



05  
Entrelaçar os dedos e friccionar os espaços interdigitais.



06  
Esfregar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos, com movimento de vai-e-vem, e vice-versa



07  
Esfregar o polegar direito com o auxílio da palma da mão esquerda, realizando movimento circular, e vice-versa



08  
Friccionar as polpas digitais e as unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fechada em concha, fazendo movimento circular, e vice-versa.



09  
Esfregar o punho esquerdo com o auxílio da palma da mão direita, realizando movimento circular, e vice-versa.

Enxaguar as mãos, retirando os resíduos de sabonete. Evitar contato direto das mãos ensaboadas com a torneira.



10



11

Secar as mãos com papel toalha descartável, iniciando pelas mãos e seguindo pelos punhos. No caso de torneiras com contato manual para fechamento, sempre utilizar papel toalha.

13

Fonte: ANVISA



## DICAS AO VISITAR PACIENTES EM HOSPITAIS

A presença da família e amigos na recuperação do paciente é muito importante, no entanto, algumas recomendações são necessárias para a segurança do paciente e visitante.

- Retire adornos (anéis, pulseiras e relógio) e lave as mãos com água e sabão ou álcool gel/espuma antes e depois da visita;
- Não sente, deite ou coloque os pés nos leitos dos pacientes, mesmo que esteja desocupado;
- Não coloque seus pertences no leito de nenhum paciente ou toque nos pertences de outro paciente. A visita deve se limitar ao seu paciente;
- Não toque em soros, sondas, cateteres ou medicamentos dos pacientes. Se necessário solicite ajuda da equipe de enfermagem;
- Respeite a indicação de restrição de visitas a paciente (seguindo as orientações afixadas na porta do quarto);
- Evite ir ao hospital caso esteja com alguma doença ou lesões abertas;
- Não traga alimentos para o paciente, sem a autorização do médico ou da nutricionista.

## USO CORRETO DE ANTIBIÓTICOS

- Não compre ou tome antibióticos sem a receita médica;
- Não tome antibióticos indicados por colegas, amigos, vizinhos ou parentes, mesmo quando indicados para outras pessoas para tratamento de sintomas semelhantes aos seus;
- Não insista com seu médico para lhe prescrever antibiótico quando não for necessário;
- Apenas o profissional médico saberá qual é o melhor antibiótico para o tratamento da sua infecção bacteriana;
- Respeite sempre a dose e o horário indicado na receita médica;
- Complete todo o tratamento com o antibiótico, mesmo se já estiver se sentindo melhor;
- Em caso de uma nova infecção, não utilize a sobra de antibióticos usados no tratamento de infecções anteriores.

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM INFECÇÃO HOSPITALAR**

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz  
Departamento de Bacteriologia  
Pavilhão Rocha Lima, 3º andar - Lab. Pesquisa em Infecção Hospitalar  
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, CEP: 21040360 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil  
Telefone: (21) 25621626  
Fax: (21) 25621609  
Homepage: <http://www.ioc.fiocruz.br>  
Email: [caio.aires@ioc.fiocruz.br](mailto:caio.aires@ioc.fiocruz.br)  
[marise@ioc.fiocruz.br](mailto:marise@ioc.fiocruz.br)

APOIO:



## 5. DISCUSSÃO

Atualmente a resistência bacteriana, é atualmente um dos maiores agravantes em saúde pública, principalmente em infecções hospitalares. Neste cenário, bactérias Gram-negativas multirresistentes têm apresentado destaque, incluindo *K. pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemases, com grande importância epidemiológica (NORDMANN et al., 2011). Dentre as carbapenemases destacam-se as do tipo KPC, NDM e OXA-48-like (NORDMANN & POIREL, 2014).

Neste contexto, para este estudo, foram selecionadas 126 amostras *K. pneumoniae* resistentes à pelo menos um carbapenêmico, oriundas de *swab* de vigilância de pacientes colonizados para caracterização fenotípica e molecular desta população. Dos 126 isolados deste estudo, 102 eram produtores de KPC e apenas um isolado produtor de OXA-370, mostrando alta prevalência da carbapenemases do tipo KPC no Brasil. Nossos resultados corroboram o estudo que indica que a produção de KPC é atualmente o mecanismo de resistência mais freqüente na *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos no Brasil (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

A maioria dos estudos que descrevem genótipos de KPC-KP no Brasil utiliza principalmente, isolados provenientes de amostras clínicas de pacientes infectados (ANDRADE et al., 2011; SEKI et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Há poucos relatos que avaliam os dados de KPC-KP colonizando pacientes no país (ANDRADE et al., 2011; MARTINS et al., 2015 ; ALMEIDA et al., 2012).

A alta prevalência de KPC nos isolados oriundos de colonização intestinal alerta para a possibilidade de pós-infecção dos pacientes colonizados. Vários estudos indicam que a colonização intestinal prévia por KPC-KP é um dos fatores de risco mais importantes associados à progressão para infecções hospitalares extraintestinais pelo mesmo patógeno (BASSETTI et al., 2017; PEREZ & DIAS, 2016). Além disso, os pacientes colonizados podem servir de reservatório para a disseminação do KPC-KP nos estabelecimentos de saúde (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

Os resultados indicaram que 89% dos isolados foram MDR, 3% extensivamente resistentes (XDR); 1% pan-resistente (PDR). Este fato é preocupante face ao desafio imposto pelas infecções intratáveis causadas por tais

agentes patogênicos (KARAIKOS & GIAMARELLOU, 2014; ROSSOLINI et al., 2014).

Observamos um aumento nas taxas de resistência à tigeciclina (12%) quando comparado a um estudo anterior (PEREIRA et al., 2013). Um nível elevado de resistência a diferentes classes antimicrobianas tem sido freqüentemente observado em isolados produtores de KPC em todo o mundo. A resistência à polimixina e à tigeciclina é muito preocupante, porque esses antimicrobianos têm sido a última opção para o tratamento de infecções graves causadas por organismos produtores de KPC (LEE et al., 2016).

O agrupamento obtido pela análise de PFGE foi consistente com os clones indicados pelo MLST, com exceção de clones de ST11 que foram agrupados em quatro pulsotipos (F, G, H e J), sendo este fenômeno já descrito em outros trabalhos (CUZON et al., 2010; CASTANHEIRA et al., 2012), mostrando a diversidade desse clone. Outros trabalhos já observaram perfis de PFGE diferentes em amostras provenientes dos mesmos ST. Em um estudo com 63 amostras de *K. pneumoniae*, observaram 56 perfis de PFGE e 39 STs (VIMONT et al., 2008).

Em relatos anteriores que consideraram isolados de pacientes infectados durante os anos 2006-09 (SEKI et al., 2011) e 2010 (PEREIRA et al., 2013) houve prevalência de ST11, ST340 e ST437 em várias regiões do Brasil, sendo estes STs pertencentes ao CC258. O mesmo resultado foi encontrado neste trabalho, o que significa que esses clones são de alto risco e provavelmente estão colonizando pacientes podendo causar infecções subseqüentes.

Neste estudo, o gene *bla*<sub>KPC</sub> está predominantemente associado à isoforma “b” do transposon Tn4401, porém em algumas amostras não foram detectados alguns elementos desta estrutura genética, o que sugere a participação de estruturas diferentes albergando o gene *bla*<sub>KPC</sub>. A perda de regiões deste elemento genético e a detecção de outras estruturas já foram descritas no Brasil (PEREIRA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013).

Em nosso estudo, observamos a produção de KPC associada à presença de ESBL e determinantes de resistência a aminoglicosídeos e quinolonas, essa associação tem sido descrita com frequência, no mundo todo, contribuindo assim

para o fenótipo MDR (CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2014; NORDMANN et al., 2011).

Os genes de virulência encontrados nos isolados neste estudo demonstram serem comuns em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (ANDRADE et al., 2014) e não associados ao perfil de resistência (CANDAN et al., 2015; CHIANG et al., 2016). Observamos três cepas, entre as amostras produtoras de KPC-2, mostrando o fenótipo HMV não associado ao gene *magA*, provavelmente, esta característica está associada aos genes *rmpA*, *rmpA2* (HSU et al., 2011), não pesquisados neste trabalho.

A polimixina tem sido amplamente utilizada para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas MDR. Como consequência, os relatos de isolados de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina (PRKP) aumentaram em todo o mundo, tornando-se uma grande preocupação de saúde pública (AH et al., 2014). Em nosso estudo, a resistência à polimixina foi relatada em 10 dos 126 isolados.

Os resultados desta tese indicaram a associação da resistência à polimixina com outros mecanismos de resistência como KPC e ESBL. Os dados da literatura indicam que as taxas de resistência à polimixina são maiores em isolados portadores de mecanismos de resistência a outras drogas (JONES et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

Os dados deste trabalho indicam pela primeira vez no Brasil, que a inativação do gene *mgrB* é o principal mecanismo que leva à resistência à polimixina em *K. pneumoniae*, confirmando os vários estudos ao redor do mundo (CANNATELLI et al., 2014; POIREL et al., 2015; OLAITAN et al., 2014).

A maioria dos isolados resistentes à polimixina pertencia ao complexo clonal CC258 e estavam associados à produção do KPC. Corroborando nossas descobertas, a expansão de isolados destes clones foi relatada anteriormente no Brasil em 2014 (ANDRADE et al., 2014). Os dados são preocupantes uma vez que os isolados produtores de KPC pertencentes ao CC258 estão disseminados com grande frequência em nosso país.

Em nosso estudo, não foi detectado a presença do gene plasmideal de resistência à polimixina *mcr*. Porém, estudos recentes realizados em nosso

laboratório relatam a presença desse gene em *K. pneumoniae*, com baixa prevalência (AIRES et al., 2017b).

Reportamos a presença de um isolado de *K. pneumoniae* com perfil XDR sem possibilidades de tratamento monoterápico. Esta cepa foi isolada em 2011, fato este preocupante, na medida em que podemos supor que isolados com esse perfil já estão circulando pelo país há bastante tempo.

Com opções terapêuticas limitadas disponíveis para tratamento de bactérias XDR e PDR, antibióticos combinados podem ser a única opção viável. Porém, os esquemas apresentam eficácia variada (JEAN et al., 2015). Neste trabalho, não obtivemos combinações viáveis para o tratamento dentre as poucas testadas. É possível que outras combinações alcançassem um efeito sinérgico.

No Brasil, a vigilância de bactérias resistentes geralmente é focada em fenótipos de resistência para drogas específicas, como por exemplo, para carbapenêmicos e polimixina. Como laboratório sentinela, o LAPIH identificou apenas casos esporádicos, portanto, a situação atual da disseminação de isolados XDR e PDR permanece indefinida.

A análise do WGS da amostra XDR demonstrou uma variedade de genes e mutações associadas à resistência. Essa ferramenta tem se destacada para pesquisa de mecanismos de resistência e monitoramento de patógenos ao longo do tempo e em regiões geográficas diferentes além de serem úteis para a investigação de surtos (DIDELLOT et al, 2012).

Dentre as 126 amostras do estudo, apenas uma foi positiva para a presença de OXA-48-like através da PCR. O sequenciamento do amplicon identificou o gene variante *bla*<sub>OXA-370</sub>.

Este estudo mostrou que OXA-370 surgiu e está circulando no Brasil muito antes que se acreditava. Esse achado é recorrente no Brasil, pois a maioria dos mecanismos de resistência à drogas que envolvem elementos genéticos móveis, principalmente enzimas  $\beta$ -lactamases, só são detectados de maneira tardia, favorecendo a sua disseminação. Podemos citar como exemplo as enzimas KPC e NDM. Magagnin e colaboradores (2017), recentemente afirmaram isto, ao

publicarem um estudo mostrando a disseminação do gene pelo país em diversas espécies (MAGAGNIN et al., 2017).

As oxacilinases (OXA), ou beta-lactamases de classe D, são enzimas que apresentam maior variabilidade em relação ao espectro de atividade contra os  $\beta$ -lactâmicos, variando desde um espectro de ação somente contra penicilinas à atividade contra carbapenemas. Apresentam baixa atividade hidrolítica contra os carbapenêmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam, e sulbactam (POIREL et al., 2010).

As enzimas do tipo OXA-48-like não possuem inibidores eficientes para utilização em testes fenotípicos e muitas amostras produtoras dessas enzimas não exibem resistência a cefalosporinas de amplo espectro ou apresentam decréscimo na susceptibilidade de carbapenêmicos. Nesse sentido, a sua detecção e reconhecimento podem ser um desafio (POIREL et al., 2012). A dificuldade de detecção, por parte dos laboratórios pode ser um dos principais motivos da baixa prevalência das OXA-48-like no Brasil. Em nosso trabalho, o isolado produtor, não foi capaz de produzir hidrólise do imipenem.

### **5.1. Cartilha como Estratégia de Educação em saúde no Combate à Resistência Bacteriana**

De maneira geral, o tema "resistência bacteriana" não é muito discutido no âmbito populacional e muitas vezes, as informações que chegam à população, principalmente pela perpetuadas pela mídia, são de cunho sensacionalista, levando a um sentimento de medo e incapacidade diante da problemática.

Diversas pesquisas indicam uma necessidade de estratégias de conscientização educacional sobre resistência aos antibióticos e uso de antimicrobianos (GUALANO et al., 2015; KANDELAKI et al., 2015; ASANTE et al., 2017; TOPOR et al., 2017; EL ZOWALATY et al., 2016). Segundo Barbosa (2014), uma possível estratégia de realização desses programas educativos, para a comunidade é a distribuição de panfletos que contemplem orientações sobre a importância do uso adequado de antibióticos. Em consonância, estratégias como a distribuição de folhetos contendo fotos de micro-organismos e fármacos, para



conscientizá-los sobre a diversidade de agentes infecciosos, de doenças e a especificidade das drogas (FERREIRA et al., 2012) e história em quadrinhos (DANDOLINI et al., 2011) foram adotadas para divulgação sobre resistência aos antibióticos e uso de antimicrobianos.

As cartilhas também apresentam bastante eficiência na divulgação de informação. Os materiais educativos impressos têm sido utilizados como ferramenta de educação em saúde para facilitar o conhecimento, esclarecer mitos e tabus relacionados aos diversos temas (OLIVEIRA, 2014; COSTA et al., 2013; BARROS et al., 2012).

Os fatos abordados corroboram a estratégia de educação em saúde adotada nesta tese. Na confecção de uma cartilha com objetivo de instruir e conscientizar a população sobre o tema da resistência bacteriana.

Uma pesquisa publicada em 2015 pela OMS forneceu um panorama global da consciência pública atual e comportamentos comuns relacionados aos antibióticos e sua resistência em vários países. Dentre os achados, o uso de antibióticos é maior nos países de baixa renda. O nível de conhecimento em torno do uso apropriado de antibióticos, incluindo como e quando usar os antibióticos é heterogêneo. Existem alguns equívocos sobre quais condições podem ser tratadas com antibióticos. Os níveis de conscientização sobre a questão da resistência aos antibióticos e os níveis de compreensão em torno da questão e como abordá-la também são confusos, indicando o reconhecimento do problema, porém, o não entendimento completo das causas e o que fazer (WHO, 2015a).

Outro estudo realizou uma revisão sistemática com artigos que abordam o conhecimento da população sobre antimicrobianos e resistência bacteriana em diversos países. Os achados revelaram que a maioria da população pensa que antibióticos são ativos contra vírus, grande parte interrompe o tratamento quando se sente melhor e, apesar da ciência da resistência bacteriana, não associavam este problema ao mau uso do antibiótico (GUALANO et al., 2015).

Alguns estudos revelaram altas taxas de auto-medicação pela população, ou seja, uso de antimicrobianos sem prescrição médica (KANDELAKI et al., 2015; TOPOR et al., 2017; EL ZOWALATY et al., 2016). Além disso, apontam taxas

elevadas de pessoas que concordaram que os antibióticos são eficazes contra vírus (KANDELAKI et al., 2015; MAZIŃSKA et al., 2017).

Diante do exposto, a cartilha desenvolvida aborda o tema contendo as informações corretas em relação aos equívocos encontrados nos estudos, ou seja, informando sobre uso apropriado de antibióticos, as características da resistência aos antibióticos, e como preveni-la.

Outro fato relacionado é o conhecimento sobre a resistência bacteriana e uso de antibióticos entre os profissionais de saúde. Estes profissionais seriam os que, de fato deveriam dominar este conhecimento e instruir a população de uma forma geral sobre este tema. Estudos apontam que a população considera os médicos, farmacêuticos, funcionários do hospital e enfermeiros fontes de informação confiáveis dentro do tema (KANDELAKI et al., 2015; MAZIŃSKA et al., 2017). Vale ressaltar que, apesar dos níveis de conhecimento sobre resistência bacteriana e uso de antibióticos serem bons ou limitados pela parte dos profissionais da área de saúde, existem lacunas no conhecimento e percepção de algumas práticas de prescrição de antibióticos (ASANTE et al., 2017; MOURA & GIR, 2007).

O fato de a cartilha desenvolvida ser voltada para o entendimento da população não impede que profissionais da saúde façam uso da mesma, tanto para preencher as lacunas no conhecimento, quanto para instrução da população. Alguns estudos mostram que é crescente o uso de cartilha educativa, com objetivo de auxiliar nas orientações, além de ser um recurso que também poderá ser utilizado na ausência do profissional de saúde (OLIVEIRA, 2014; COSTA et al., 2013; BARROS et al., 2012).

Todo material educativo pode ser definido como ferramenta pedagógica que possibilita a mediação no processo de comunicação e educativo entre os diferentes sujeitos da aprendizagem. A educação em saúde possibilita que informações importantes sejam passadas ao público alvo, tornando-os sujeitos de seus cuidados. Quando realizada através de materiais educativos impressos a educação em saúde se torna mais abrangente, possibilitando aos receptores terem a sua disposição um material com informações confiáveis (BRASIL, 2007). A cartilha desenvolvida nesta tese insere-se nesta perspectiva, uma vez que visa a participação da população na redução da propagação da resistência bacteriana

A cartilha “Resistência Bacteriana aos Antibióticos: O Que Você Deve Saber e Como Prevenir” foi confeccionada com orientações em forma de perguntas e respostas, contendo informações sobre a resistência bacteriana; informações sobre uso correto de antimicrobianos; e medidas preventivas como lavagem de mãos e cuidados ao visitar pacientes internados. O desenvolvimento do material seguiu algumas sugestões para o planejamento de materiais impressos eficazes para pessoas com baixo nível de escolaridade. São elas: Conteúdo, organização, layout/imagem gráfica, elementos visuais, inteligibilidade, compreensão e linguística (envolver o leitor, empregar a voz ativa e fazer perguntas para encorajar a aprendizagem do leitor) (BASTABLE, 2010).

Segundo Silva (2005), a educação em saúde deve ser aplicada em qualquer ambiente onde são executadas as atividades profissionais de cuidado, como enfermarias, consultórios, salas de aula, grupo terapêutico, unidades de saúde, salas de espera, dentre outros. Sugere-se que essas ações aconteçam em postos de saúde, por serem espaços onde se concentra grande número de usuários, muitas vezes, com pouca instrução sobre o uso adequado de antibióticos, seja pelo baixo nível de escolaridade ou pelo atendimento médico deficiente (BARBOSA, 2014). Estas referências pactuam com as perspectivas projetadas para a cartilha confeccionada nesta tese, que visa sua divulgação em locais relacionados à assistência à saúde.

## 6. CONCLUSÕES

- A maioria das amostras apresentou fenótipo MDR, mas a emergência das cepas XDR e PDR é bastante preocupante devido à limitação das opções de tratamento de amostras produtoras de carbapenemases.
- A detecção de genes adquiridos codificadores de  $\beta$ -lactamases, de resistência a aminoglicosídeos (EMAs e 16S rRNA metilases) e quinolonas (QnrA, QnrB, QnrS) observados através de PCR, demonstram a grande capacidade de aquisição e disseminação da resistência a múltiplas drogas de amostras de *K. pneumoniae*, levando em consideração o fato de servirem como reservatórios para a dispersão dos determinantes de resistência no ambiente hospitalar, uma vez que encontram-se colonizando o trato gastrointestinal de pacientes.
- Apesar da diversidade de clones carreadores do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> encontrada neste trabalho, houve prevalência de amostras do CC258 associadas ao gene no país.
- Na maioria das amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> sugere-se a participação estrutura Tn4401 isoforma b como disseminadora do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> em nosso país.
- Detectamos na grande maioria das amostras genes de virulência associados à adesão e à sobrevivência bacteriana, como produção de fimbrias e adesinas e transporte de sideróforos, tais características são comuns a cepas clínicas de *K. pneumoniae*, sem associação com a resistência bacteriana
- Nas amostras resistentes à polimixina B, confirmamos que as mutações no regulador *mgrB* é o principal mecanismo de resistência a esta classe de drogas.
- Este trabalho corrobora os achados crescentes de associação da resistência à polimixina B com amostras produtoras de carbapenemases pertencentes a clones de alto risco do CC258.

- O relato de uma cepa com perfil XDR sem opções terapêuticas, isolada em 2011, chama atenção para a problemática da resistência, reforçando que as medidas de prevenção, controle e vigilância da resistência bacteriana devem ser mais fortalecidas.
- A detecção de uma cepa carregando o gene *bla*<sub>OXA-370</sub> anterior ao primeiro relato da detecção de OXA-48-like no Brasil (PINTO et al., 2014), destaca a disseminação de mecanismos relevantes de resistência de forma silenciosa, alertando para um cenário preocupante, onde a detecção tardia de um mecanismo de resistência subestima o real panorama da resistência.
- A cartilha desenvolvida neste trabalho é uma metodologia simples e de amplo alcance que tem o potencial de promover a saúde através da educação em saúde na perspectiva da melhora da qualidade de vida, utilizando as informações como competência para práticas que reduzam a emergência e disseminação da resistência bacteriana.
- Por fim, concluímos que este estudo alerta para a presença de bactérias multirresistentes em nosso país carregando uma variedade de mecanismos associados à resistência, fato preocupante devido às limitações das opções de tratamento dessas amostras, porém, endossa o papel da população em geral, que uma vez instruída, tem grande responsabilidade no combate à resistência bacteriana.

## 7. REFERÊNCIAS

- ACHEAMPONG, D. O.; FEGLO, P. K. Empirical treatment of neonatal sepsis by *Klebsiella*: A Case study at Komfo Anokye Teaching Hospital (Kath), Ghana. **Advances in Applied Science Research**, v. 1, n. 1, p. 18–22, 2011.
- AH, Y. M.; KIM, A. J.; LEE, J. Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 1, p. 8-15, 2014.
- AIRES, C. A. et al. Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring blaCTX-M-8 in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 86, n. 4, p. 434-436, 2016a.
- AIRES, C. A. et al. mgrB Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 11, p. 6969-6972, 2016b.
- AIRES, C. A. et al. Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 4, 2017a.
- AIRES, C. A. M. et al. Emergence of the Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, 2017b.
- ALMEIDA, A. C. S., et al. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the blaKPC-2 gene in an Intensive Care Unit patient. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 40, n. 4, p. 374-376, 2012.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 260–271, 2010.
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of bla(KPC-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, Jul. 2011.
- ANDRADE, L. N. et 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2530–2535, 2014.
- ANDREWS, J. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. July 2001, p. 5–16, 2001.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência ano de 2014 e relatório de progresso. nº 11, Ano VI. 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 06 set. 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica (Manual-Módulo V). 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 09 set. 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2013 – 2015). Brasília, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 09 set. 2017.
- ARAÚJO, B. F. et al. High frequency of the combined presence of QRDR mutations and PMQR determinants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from nosocomial and community-acquired infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 1144–1150, 2017.
- ARDANUY, C. et al. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 7, p. 1636-40, 1998.
- ASANTE, K. P. et al. Knowledge of antibiotic resistance and antibiotic prescription practices among prescribers in the Brong Ahafo Region of Ghana; a cross-sectional study. **BMC Health Services Research**, v. 17, n. 1, p. 422, 2017.

BACHMAN, M. A. et al. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. **mBio**, v. 3, n. 6, p. 1–8, 2012.

BARBOSA, L. A.; LATINI, R. O. RESISTÊNCIA BACTERIANA DECORRENTE DO USO ABUSIVO DE ANTIBIÓTICOS : informações relevantes para elaboração de programas educativos voltados para profissionais da saúde e para a comunidade . Ricardo Oliveira Latini2. **Conferência de estudos Izabela Hendrix**, v. 1, p. 0–11, 2014.

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016.

BARROS E JL, et al. Gerontotecnologia educativa voltada ao idoso estomizado à luz da complexidade. **Rev Gaúcha Enferm.** v. 33, n.2, p. 95-101, 2012.

BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849–1851, 2016.

BASSETTI, M. et al. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

BASTABLE, S. B. Enfermeiro como educador, Princípios de Ensino – endizagem para a Prática de Enfermagem. 3ª ed. Artmed. Porto Alegre, 2010.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625–651, 2005.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. S1, p. S347–S357, 2009.

BERINGER P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. **Curr OpinPulm Med.**v. 7, n. 6, p. 434–40, 2001.

BILAVSKY, E.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. How to stem the tide of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*? : proactive versus reactive strategies. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 327–331, 2010.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014.

BLASCHKE, A. et al. Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens in a Children's Hospital: A five-Year Experience. **American journal of infection Control**. v. 37, n. 6, p. 435-441, 2010.

BORER, A. et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 5, p. 421–425, 2012.

BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3317–3324, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME. Plano Brasil Sem Miséria. [s.l.], p. 38, 2013.

BRASIL. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Avaliação da qualidade das ações de controle de infecção hospitalar em hospitais terciários. Brasília, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Caderno de educação popular e saúde. 1ª ed. Brasília, 2007.

BRASIL. Projeto de Lei do Senado Federal Nº 124, de 2004. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção, pelos serviços de saúde do País, de um Programa de Controle de Infecções na Assistência à Saúde, e dá outras providências, 2004.

BRAUN, G. et al. In-vivo emergence of polymyxin- B-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients with bloodstream infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 338–340, 2016.

BRISSE, S. et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. Description of *Klebsiella* quasipneumoniae sp. ., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella* quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. . and *Klebsiella* quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. ., and demonstration that *Klebsiella* singaporensis is a ior heterotypic synonym of *Klebsiella* variicola. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, n. Pt 9, p. 3146-52, 2014.

BUENO, M. F. C. et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397–2400, 2013.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 455–478, 2011.

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

CAG, Y. et al. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, p. 326–326, 2016.

CALFEE, D. P. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. **F1000Research**, v. 6, p. 1760, 2017.

CALFEE, D.; JENKINS, S. G. Use of Active Surveillance Cultures to Detect Asymptomatic Colonization With Carbapenem - Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Unit Patients • Use of Active Surveillance Cultures to Detect Asymptomatic Colonization With Carbapenem-Resistant Kle. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 10, p. 966–968, 2013.

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 1, p. 44–52, 2009.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. Integrons. **Annual Review of Genetics**, v.44, p.141-166. 2010.

CANDAN, E.D, AKSÖZ N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Biochim Pol.** v. 62, n. 4, p. 867–74, 2015.

CANNATELLI A, et al. COLGRIT Study Group.. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrob Agents Chemother** v. 58, n. 10, p. 5696 –5703, 2014.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARNEIRO, M. et al. New carbapenases in Brazil. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 2, p. 155–156, 2014.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. ALINCOURT 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, 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. 2475-6, 2014.

CASTANHEIRA, M. et al. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1668–1669, 2012.

CDC, Centers for Disease Control and prevention. Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/>>. Acesso em: 04 set. 2016.



CERGOLE-NOVELLA, M. C. et al. First Description of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> - and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> -Producing *Escherichia coli* Isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 3, p. 177–184, 2010.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens Resistant to Antibacterial Agents. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 4, p. 647–676, 2011.

CHERUVANKY, A. et al. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn 4401 Deletion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e00025–17, jun. 2017.

CHIANG T. et al. Quantification and comparison of virulence and characteristics of different variants of carbapenem-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Taiwan and the United States. **J Microbiol Immunol Infect.** v. 49, n. 1, p. 83–90, 2016.

CHOU, H. C. et al. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 3783–3792, 2004.

CHUNG, D. R. et al. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 481–486, 2012.

CLAUSELL A, et al. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. **J Phys Chem B**. v. 111 n. 3, p. 551–63, 2007.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). CLSI M100-S23. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23th informational supplement. Wayne, PA. 2013.

CONLAN, S.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Species-Level Analysis of DNA Sequence Data from the NIH Human Microbiome Project. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

CORBETT, K. D. et al. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 3, p. 545–561, 2005.

COSTA PB, et al. Development and validation of educational manual for the promotion of breastfeeding. **Rev Rene**. v. 14, n. 6, p. 1160-07, 2013.

COSTA, M. C.; PEREIRA, P. M.; BOLOTINHA, C., ET AL.. - Frequência e Susceptibilidade Bacteriana em Infecções Urinárias –dados de um laboratório de Lisboa. Parte II. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**. v. 1, n. 6, p. 87-103, 2009.

COSTA, M. M. M. Efeitos de um ciclo de melhoria da qualidade nacional aplicado à estruturação das ações de prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde em hospitais brasileiros. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. [Dissertação de Mestrado Profissional] Gestão da Qualidade em Serviços da Saúde. Natal - RN, 2016.

COUDEYRAS, S. et al. A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 10, p. 4633–4641, 2008.

COUTO RC, PEDROSA TMG, NOGUEIRA JM. Infecção hospitalar e outras complicações não infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.

CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349–56, set. 2010.

CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in bla KPC gene mobilization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5370–5373, 2011.

DALMOLIN, T.V. et al. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Volume 0, Issue 0, 2017

DANDOLINI, B. W. et al. Uso racional de antibióticos: uma experiência para educação em saúde com escolares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 5, p. 1323–1331, 2012.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections . R-Plasmid-Encoded Adhesive Factor in *Klebsiella pneumoniae* Strains Responsible for Human Nosocomial Infections. **Infection and**, v. 60, n. 1, p. 44–55, 1992.

DHANASEKARAN D, THAJUDDIN N, PANNEERSELVAM, A. Antimicrobials: Synthetic and Natural Compounds. 1<sup>a</sup> ed. CRC Press, 2015

DHILLON, R. H. P.; CLARK, J. ESBLs: A clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, n. 625170, 2012.

DI MARTINO, P. et al. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5 / SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections . A New Fimbrial Antigen Harbored by CAZ-5 / SHV-4-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Involved in Nosocomial Infections. **Infection and Immunity**. v. 64, n. 6, p. 2266–2273, 1996.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178-4182, 2005.

DIDELOT X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TE, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nature reviews Genetics**. v. 13, n. 9, p. 601-12, 2012.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 88–94, 2007.

DOI, Y; WACHINO, J; ARAKAWA Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. In: Watkins, RR & Bonomo RA. Antibiotic Resistance: Challenges and Opportunities. Infectious Disease Clinics. Philadelphia. Elsevier. Volume 30 , Issue 2. P 523–537, 2016.

DORMAN, M. J.; SHORT, F. L. Genome watch: *Klebsiella pneumoniae*: When a colonizer turns bad. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1, 2017.

DORTET, L. et al. Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48 type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase without significant carbapenemase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 05058–14, 2015.

DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 659–667, 2009.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 2010.

DRLICA, K. et al. Quinolones: Action and Resistance Updated. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 981–998, 2009.

DURANTE-MANGONI, E. et al. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 201–205, 2009.

DWORKIN, M.F.S., et al. The prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry.;3th ed. New York, USA. Springer; 2006.

EHRLICH G.D, POST J.C. The Time Is Now for Gene- and Genome-Based Bacterial Diagnostics: “You Say You Want a Revolution”. **JAMA**. v. 173, n. 15, p. 1405-1406, 2013.

EL-BADAWY, M. F. et al. Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, 2017.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.version 1.3, uary 2013. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)

FAVRE-BONTÉ, S. et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule expression is necessary for colonization of large intestines of streptomycin-treated mice. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6152–6156, 1999.

FERNANDEZ L, et al. The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 56, p. 6212–22, 2012.

FILIUS, P. M. G. et al. Colonization and resistance dynamics of gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2879–2886, 2005.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 272–288, 2004.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, 2012.

GARCIA, D. D. O. et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1790–1793, 2008.

GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 614–621, 2016.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 47, n. 3, p. 137–46, 2011.

GOERING, RICHARD V. “Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease.” **Infection, genetics and evolution.** v.10, n. 7, p. 866-875, 2010.

GOOTZ, T. D. et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1998–2004, 2009.

GORRIE, C. L. et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 2, p. 208–215, 2017.

GUALANO, M. R. et al. General population’s knowledge and attitudes about antibiotics: a systematic review and meta-analysis. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 24, no 1, p. 2–10, 2015.

GUPTA, N. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 1, p. 60–67, 2011.

HÆGGMAN, S. et al. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2400–2408, 2004.

HANSEN, D. S. et al. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 8, p. 3665-9, 2004.

HARRIS, C. R.; THORARENSEN, A. Advances in the discovery of novel antibacterial agents during the year 2002. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 16, p. 2213–2243, 2004.

HASDEMIR, U. O. et al. Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2701–2706, 2004.

HERMSEN ED, SULLIVAN CJ, ROTSCHAFER JC. POLYMYXINS: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. **Infectious disease clinics of North America**. v. 17, n. 3, p. 545-62, 2003.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 2010.

HOOPER, D. C. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. Supplement 1, p. S9–S15, 2001.

HORAN TC, ANDRUS M, DUDECK MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control**, v. 36, n. 5, p. 309-332, 2008.

HSIEH, P. F. et al. CadC Regulates cad and tdc Operons in Response to Gastrointestinal Stresses and Enhances Intestinal Colonization of *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 52–64, 2010.

HSU, C. R. et al. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3446–3457, 2011.

HUNT, J. J.; WANG, J. T.; CALLEGAN, M. C. Contribution of mucoviscosity-associated gene A (magA) to virulence in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, n. 9, p. 6860–6866, 2011.

JACOBY GA, STRAHILEVITZ J, HOOPER DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology spectrum**. v 2, n. 5, 2014.

JACOBY, G. A.; MILLS, D. M.; CHOW, N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3203–3206, 2004.

JEAN, S. S. et al. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. **Future Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 407-25, 2015.

JONES RN, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **Brazilian J Infect Dis** 17:672–681. 2013.

KANDELAKI, K.; LUNDBORG, C. S.; RONE, G. Antibiotic use and resistance: a cross-sectional study exploring knowledge and attitudes among school and institution personnel in Tbilisi, Republic of Georgia. **BMC Research Notes**, v. 8, n<sup>o</sup> 1, p. 495, 2015

KANG, C. I. et al. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. **J Korean Med Sci**, v. 21, n. 5, p. 816-22, 2006.

KARAIKOS I, GIAMARELLOU H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant gramnegative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. **Expert Opin Pharmacother**. v. 15, n. 10, p 1–20, 2014.

KELLY-SANTOS, A.; MONTEIRO, S. S.; RIBEIRO, A. P. G. Acervo de materiais educativos sobre hanseníase: um dispositivo da memória e das práticas comunicativas. **Interface - Comunicação Saúde Educação**, v.14, n.32, p. 37-51, 2010.

KITCHEL, B. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3365–3370, 2009.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DA, W.M., et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

KONG, K.-F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 1, p. 1–36, 2010.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486–1513, 2005.

KUMAR, V. et al. Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4267–4276, 2011.

LANDMAN D, GEORGESCU C, TIN DA, QUALE J. Polymyxins revisited. **Clin Micro-biol Rev**. v. 21, n. 3, p. 449–65, 2008.

LAROUCHE, A., ROY, P. H. Effect of attC structure on cassette excision by integron integrases. **Mobile DNA**, v. 2, n. 1, p. 3, 2011.

LASCOLS, C. et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta -lactamases: A snapshot of extended-spectrum beta -lactamases throughout the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1632–1639, 2012.

LAWLOR, M. S.; O’CONNOR, C.; MILLER, V. L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1463–1472, 2007.

LEAVITT, A. et al. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3002–3006, 2010.

LEE M. H. et al. *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: Sequence of ureD and demonstration that four accessory genes (ureD, ureE, ureF, and ureG) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4324–4330, 1992.

LEE, C. R. et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Front Microbiol**, v. 7, p. 895, 2016

LI, B. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014.

LI, X. Z. et al.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3-4, p. 197–214, 2007.

LIN, Y. C. et al. Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain. **BMC Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 50, 2011.

LIN, T.; LIN, L.; ZHANG, F. Review on Molecular Typing Methods of Pathogens. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 04, n. 03, p. 147–152, 2014.

LIU, Y. Y. 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, AND D F BROWN. “Detection of beta-lactamase-mediated resistance.” **The Journal of antimicrobial chemotherapy** v. 48, n. Suppl 1, p. 59-64, 2001.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **The Korean journal of internal medicine**, v. 27, n. 2, p. 128–42, 2012.

LIVERMORE, D. M.. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, p.283-294, 2012.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2017. Disponível em <http://www.bacterio.net/index.html>. Acesso em: 02 de Outubro de 2017.

LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 229–243, 2002.

MACCANNELL D. Bacterial strain typing. **Clin. Lab. Med.** v. 33, n. 3, p. 629-650, 2013.

MACFARLANE, S. Microbial Biofilm Communities in the Gastrointestinal Tract. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. September, p. S142–S143, 2008.

MAGAGNIN, C. M. et al. Dissemination of blaOXA-370 gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1907–1910, 2017.

MAGILL, S. S. et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chem Rev**, v. 105, n. 2, p. 477-98, 2005.

MARONCLE, N.; RICH, C.; FORESTIER, C. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 184–193, 2006.

MARRA, A. R. et al. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. **Int J Infect Dis**. v.10, n. 1, p 56-60, 2006.

MARRA, A. Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por *Klebsiella pneumoniae*. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) São Paulo, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 2002.

MARRA, A. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 1866-71, 2011

MARTIN, R. M. et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. 1–12, 2016.

MARTINEZ-MARTINEZ L, PASCUAL A, JACOBY GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**. v. 351, n. 9105, p. 797-9, 1998.

MARTINS, S.T. Análise de custos da internação de pacientes em Unidade de Terapia Intensiva com infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. [Dissertação de Mestrado] em Ciências da Saúde. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.

MARTINS, W. M. B. S. et al. Coproduction of KPC-2 and QnrB19 in *Klebsiella pneumoniae* ST340 isolate in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 4, p. 375–376, 2015.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565–591, 2015.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 608–620, 2006.

MAZIŃSKA, B. et al. Surveys of public knowledge and attitudes with regard to antibiotics in Poland: Did the European Antibiotic Awareness Day campaigns change attitudes? **PLoS ONE**, v. 12, n° 2, p. 1 18, 2017.

MAZZARIOL A, et al. AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. **Antimicrob Agents Chemother** v. 46, n. 12, p. 3984–3986, 2002.

MESA-LAGO, C. O sistema de saúde brasileiro: seu impacto na pobreza e na desigualdade. **Nueva Sociedad**. n 41 116 – 131 . 2007.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413–451, 2007.

MINARINI, L. Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros, 2008. Trabalho de conclusão de curso (Tese) - Universidade de São Paulo, 2008.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

MOURA, J. P. DE; GIR, E. Conhecimento dos profissionais de enfermagem referente à resistência bacteriana a múltiplas drogas \*. **Acta Paul Enferm**, v. 20, n. 3, p. 351–356, 2007.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

NAGASAKA, Y. et al. Genetic Profiles of Fluoroquinolone-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Among Cephalosporin-Resistant *K. pneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 224–233, 2015.

NETO, V. A., NICODEMO, A. C., VASCONCELLOS, H. Antibióticos na prática Médica. ed. 6. São Paulo, Sarvier. 2007.

NEVERS, P.; SAEDLER, H. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. **Nature**, v. 268, n. 5616, p. 109–115, 1977.

NICKEL, J. C. Management of urinary tract infections: historical perspective and current strategies: Part 2--Modern management. **J Urol**, v. 173, n. 1, p. 27-32, 2005.

NICOLETTI A.G. 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. 5159-64, 2015.

NIKOO, HR, et al. Systematic Review of Antimicrobial Resistance of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Iran: An Update, **Microbial Drug Resistance**. v.23, n. 6, p. 744-56, 2017.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321–331, 2002.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821–830, 2014.

OLAÏTAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. November, p. 643, 2014.

OLIVEIRA GARCIA, et al.. "Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and el variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 52, n. 5, p. 1790-1793, 2008.

OLIVEIRA I, R. D. E.; MARUYAMA I. I. S. infecção hospitalar: histórico e papel do estado1 Control of hospital infection: description and paper of the state Control de la infección del hospital: descripción. **Projetos.Extras.Ufg.Br**, v. 10, n. 3, p. 783, 2008.

OLIVEIRA S.C. et al. Development and validation of an educational booklet for healthy eating during pregnancy. **Rev Latino-Am Enfermagem** v. 22, n. 4, p. 611-20, 2014.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.

PADILLA, E. 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.

PAGÈS, J. M. [Bacterial porin and antibiotic susceptibility]. **Med Sci (Paris)**, v. 20, n. 3, p. 346-51, 2004.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2976–2981, 2012.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta -lactamase, a preeminent property of this class a beta -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 890–897, 2010.

PARSONS MB, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. **Foodborne Pathog Dis**. v. 4, n. 3, p. 285-92, 2007.

PARUSSOLO, L. et al. Polimixinas: Essenciais na era das bactérias multirresistentes, **Revista Biociências**, Taubaté..v. 20, n. 1, p. 1-11. 2014

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5 SUPPL., p. 20–28, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum beta-Lactamases : a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–268, 2009.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med**, v. 362, n. 19, p. 1804-13, 2010

PEREIRA, A. DOS S. et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido Comparison of different methods for detection of *Klebsiella pneumoniae* isolates producers of extended. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 301–308, 2003.

PEREIRA, P. S. et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4453–4456, 2015.

PEREIRA, P. S. et al. Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 580–582, 2015.

PEREIRA, P. S. 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.

PÉREZ-LOSADA M. et al.. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infect Genet Evol.** v. 16, p. 38-53, 2013.

PEREZ, L.R.R., DIAS CG. Emergence of Infections due to a Polymyxin B – Resistant KPC-2 Producing *Klebsiella pneumoniae* in Critically Ill Patients: What Is the Role of a Previous Colonization ? **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 37, n. 2, p. 240–1, 2016.

PINSETA, F.R. Síntese relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de uma fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière, 2010. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2010.

PINTO, F. D. M. et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 2014.

PITOUT, J. D. D. et al. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 52–59, 2005.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159–166, 2008.

PODSCHUN, R.; FISCHER, A; ULLMANN, U. Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis, and serotypes. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 1, p. 71–78, 2000.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

POIREL L, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother** v. 70, n. 1, p. 75–80, 2015.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POIREL, L. et al. Genetic Features of bla(NDM-1)-Positive *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.11, p.5403-5407, 2011.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597–1606, 2012.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20–51, 2005.

POTRON, A. et al. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 31, 2013.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RAETZ CR, REYNOLDS CM, TRENT MS, BISHOP RE. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. **Annu Rev Biochem**; v. 76, p. 295–329, 2007.



- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat**, v. 13, n. 6, p. 151-71, 2010.
- RANJBAR, R. et al. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **The new microbiologica**, v. 37, n. 1, p. 1–15, 2014.
- RAVAT, F. et al. Antibiotics and the burn patient. **Burns**, v. 37, n. 1, p. 16–26, 2011.
- REDGRAVE, L. S. et al. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 438–445, 2014.
- RIBEIRO VB. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **J Med Microbiol**. v. 62, n. (PART 11), p. 1721–7, 2013.
- RIBEIRO, P. C. S. et al. Phenotypic and molecular detection of the blaKPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 737, 2016.
- RICHTER, S. S.; MARCHAIM, D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 417–426, 2017.
- ROBICSEK A, et al. qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 50, n. 8, p. 2872-4c, 2006.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ JM, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **J Infect Chemother**. v. 17, n. 2, p. 149-82., 2011.
- ROSA T. P. MAGNAGO T.S.B.S. TAVARES J.P. et al. Perfil dos pacientes atendidos na sala de emergência do pronto socorro de um hospital universitário. **R. Enferm. UFSM**. v. 1, n. 1, p. 51-60, 2011.
- ROSE, H. D.; BABCOCK, J. B. Colonization of intensive care unit patients with gram-negative bacilli. v. 101, n. 6, p. 495–501, 1975.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.
- ROSSOLINI G.M. et al. Update on the antibiotic resistance crisis. **Curr Opin Pharmacol**. v. 18, p. 56–60, 2014.
- RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, reased accumulation and DNA gyrase protection. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 51, n. 5, p.1109-1117, 2003.
- RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.-L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 21, 2015.
- RUSSO, T. A. et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 6, p. 2356–2367, 2014.
- RUSSO, T. A. et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26734, 2011.
- SABAT, A. J. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **European communicable disease bulletin**, v. 18, n. 4, p. 20380, 2013.
- SAMPAIO, J. L. M. et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class d beta-lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3566–3567, 2014.
- SAMPAIO, J. L. M., Mecanismos de Ação dos Antibióticos. In NETO, A., NICODEMO, V., LOPES, A. C., VASCONCELOS, H. Antibióticos na Prática Médica. Sarvier, São Paulo, volume 1, p. 17-25. 2007.
- SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016.

SAMUELSEN, Ø. et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 654–658, 2009.

SANTOS, N. DE Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64–70, 2004.

SCHECHNER, V. et al. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Who is prone to become clinically infected? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 451–456, 2013.

SCHEMBRI, M. A. et al. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4626–4633, 2005.

SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 2, p. 274–7, 2011.

SELDEN, R. et al. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, n. 5, p. 657–664, 1971.

SHON, A.S.; BAJWA, R.P.; RUSSO T.A.. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, p.107–118, 2013.

SIEFERT, J. L. Defining the mobilome. Horizontal Gene Transfer: Genome in Flux. **Humana Press**, New York, p. 13-27, 2009.

SIEGEL, J. D. et al. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. **American Journal of Infection Control**, v. 35, n. 10 SUPPL. 2, 2007.

SILVA, J.L.L. Educação em saúde e promoção da saúde. **Informe-se em promoção da saúde**, n.1.p.03. 2005.

SILVA, R. F. A infecção hospitalar no contexto das políticas relativas à saúde em Santa Catarina. **Rev. Latino-am Enfermagem**. v.11, n. 1, p. 108-14, 2003.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512–530, 2006.

SIU, L. K. et al. Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3761-5, 2011.

SKIPPER, K. et al. DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 92, 2013.

STAHLHUT, S. G. et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 21, p. 6592–6601, 2009.

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4055–4065, 2008.

STRUVE, C.; FORESTIER, C.; KROGFELT, K. A. Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 167–176, 2003.

STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Critical Care**, v. 15, n. 5, p. 403–412, 2009.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254–267, 2014.

- TALÉNS-VISCONTI R, et al. Activity-bioavailability balance in oral drug development for a selected group of 6-fluoroquinolones. **J Pharm Sci.** v. 91, n. 11, p. 2452-64, 2002.
- TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos. Atheneu, São Paulo: 2ª edição. 2001.
- TENOVER FC, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 9, p. 2233-9, 1995.
- TENOVER F.C., ARBEIT R.D., GOERING R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies for bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp Epidemiol.** v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6 SUPPL. 1, 2006.
- THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711–721, 2005.
- TOLEMAN, M. A. et al. NIH Public Access. **Sciences-New York**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2011.
- TOLLENTINO, F. M. et al. High Prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>SHV-31</sub>, *bla*<sub>SHV-38</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 1, p. 7–16, 2011.
- TOPOR, G. et al. Awareness about antibiotic resistance in a self-medication user group from Eastern Romania: a pilot study. **PeerJ**, [s.l.], v. 5, p. e3803, 2017.
- TORTORA, G. J., FUNKE R. B., CASE C. L.. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- TRABULSI, L.R., ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- TSAI, S.-S. et al. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in community-acquired and nosocomial infections in diabetic patients. **Chang Gung medical journal**, v. 33, p. 532–539, 2010.
- VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 3, p. 430–450, 2003.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. **P & T: A peer-reviewed journal for formulary management (2015)**, v. 40, n. 5, p. 344–52, 2015.
- VILELA, Marinalda. Caracterização molecular de isolados resistentes a antimicrobianos que atuam na parede celular. 2009. Trabalho de conclusão de curso (Tese) - Universidade Federal de Pernambuco, 2009.
- VIMONT S, MNIF B, FEVRE C, BRISSE S. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of medical microbiology**. v. 57, n. (Pt 10), p. 1308-10, 2008.
- VINUÈ, L. et al. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 916–920, 2008.
- VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 27–39, 2013.
- WACHINO, J. I.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 133–148, 2012.
- WALSH, T. R. et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.306-25, 2005.
- WALSH, T. R. Clinically significant carbapenemases: an update. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 4, p. 367–371, 2008.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 470–482, 2007.
- WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for

Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, 2016.

WHO, World Health Organization. Health care-associated infections Fact Sheet. 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/gpsc/country\\_work/gpsc\\_ccisc\\_fact\\_sheet\\_en.pdf](http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2016.

WHO, World Health Organization. WHO Health, 2002. Disponível em: <[http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002\\_12/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/)>. Acesso em: 20 ago. 2017.

WHO. Global Report on Surveillance: Antimicrobial Resistance. World Health Organization, [s.l.], p. 1–7, 2014. ISBN: 978 92 4 156474 8, 2014

WHO. Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey. WHO Press, [s.l.], p. 1–51,. ISBN: 978 92 4 150981 7, 2015a

WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. WHO Press, [s.l.], p. 1–28,. ISBN: 978-92-4-150976-3, 2015b

WIENER-WELL, Y. et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 4, p. 344–349, 2010.

WOLDU, M. A. *Klebsiella pneumoniae* and Its Growing Concern in Healthcare Settings. **Clinical & Experimental Pharmacology**, v. 6, no 1, p. 1–7, 2016.

WRIGHT MS, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrob Agents Chemother**;59:536–43. 2015

XUE, G. et al. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Pediatric Patients in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2016.

YANG, J. et al. Diverse Phenotypic and Genotypic Characterization Among Clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates Carrying Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 3, p. 363–367, 2011.

YIGIT, H. et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing beta-Lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3881–3889, 2003.

YIN, W. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio*, v. 8, n. 3, p. 4–9, 2017.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla NDM-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.-L. et al. Association between *rpmA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, n. 10, p. 1351–1358, 2006.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 361–385, 2008.

ZAVASCKI AP, GOLDANI LZ, LI J, NATION RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**.v. 60, n. 6, p. 1206-15, 2007.

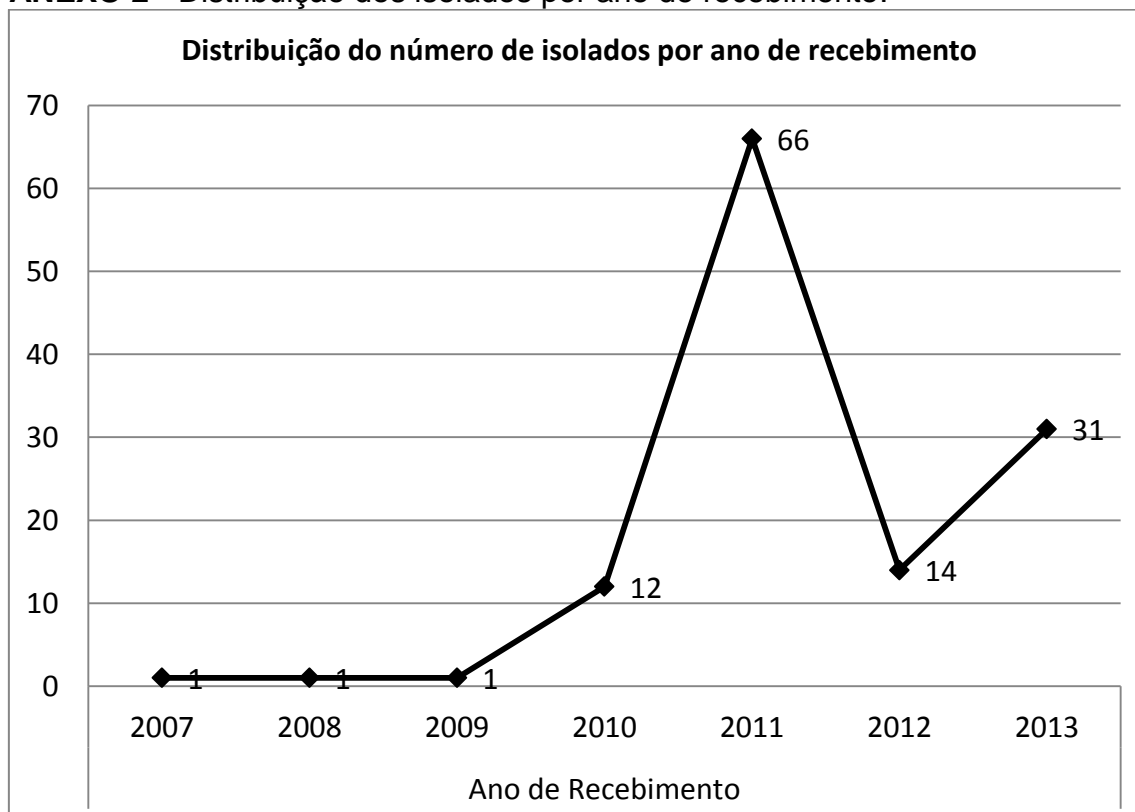
## 8. ANEXOS

**ANEXO 1** - Lista de artigos publicados pelo autor em revistas indexadas durante o período de Doutorado (dezembro de 2013 a novembro de 2017), em ordem crescente em relação à data da publicação. Estão sinalizadas em negrito as publicações relacionadas diretamente com as amostras incluídas nesta Tese de Doutorado.

- Artigo 01. Aires CAM, Araujo CFM, Nobre ML, Rusak LA, Assis UG, Montenegro-Lopez DC, Franco VC, Heringer M, Peres-Da-Silva A, Portilho MM, Pereira MEC, Soeiro MNC. Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve. Rev. Pan-Amazônica Saúde, 2015 Jun; 6(2): 73-81. (Qualis-Capes: B5).
- Artigo 02. Chagas TPG, Carvalho-Assef AP, Aires CAM, Bertocini R, Asensi MD. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. J Glob Antimicrob Resist, 2015 Jun; 3(2): 147-148. (Qualis-Capes: B2).
- Artigo 03. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CAM, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Aug; 59(8): 4453-4456. (Qualis-Capes: A1).
- Artigo 04. Aires CAM, Almeida ACS, Vilela MA, Morais-Junior MA, Morais MMC. Selection of KPC-2-producing *Providencia stuartii* during treatment for septicemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 Jan; 84(1): 95-96. (Qualis-Capes: B1).
- Artigo 05. **Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. *mgrB* mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal Ssurveillance swabs in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Oct; 60(11): 6969-6972. (Qualis-Capes: A1).**
- Artigo 06. **Aires CAM, Rocha-de-Souza CM, Timm LN, Pereira PS, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring *bla*<sub>CTX-M-8</sub> in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 Dec; 86(4): 434-436. (Qualis-Capes: B1).**
- Artigo 07. Gomes MZR, Lima EM, Pereira PS, Aires CAM, Menicalli MJS, Rocha-de-Souza CM, Albano RM, Yim J, Carvalho-Assef APD, Rybak MJ, Asensi MD. Clonal pan or extensively drug-resistant KPC-2-producing ST437 *Klebsiella pneumoniae* causing untreatable infections evidenced by in vitro synergy testing. Open Forum Infect Dis. 2016 Dec; 3 (Issue suppl\_1, 1): 2010. (Qualis-Capes: B4).

- Artigo 08. Aires CAM, Pereira PS, de Araújo CF, Chagas TP, Oliveira JC, Buonora SN, Albano RM, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing-NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Mar; 61(4): e01048-16. (Qualis-Capes: A1).
- Artigo 09. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 392 in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jun; 61(7): e00317-17. (Qualis-Capes: A1).
- Artigo 10. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2017 Aug; 50(2): 282-284. (Qualis-Capes: A2).
- Artigo 11. Aires CAM, Rybak MJ, Yim J, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Albano RM, Cavalcanti VO, Carvalho-Assef APD, Gomes MZR, Asensi MD. Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to Ceftazidime-Avibactam isolated in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 Dez; 89(4): xxx-xxx. (Qualis-Capes: B1).

**ANEXO 2 - Distribuição dos isolados por ano de recebimento.**

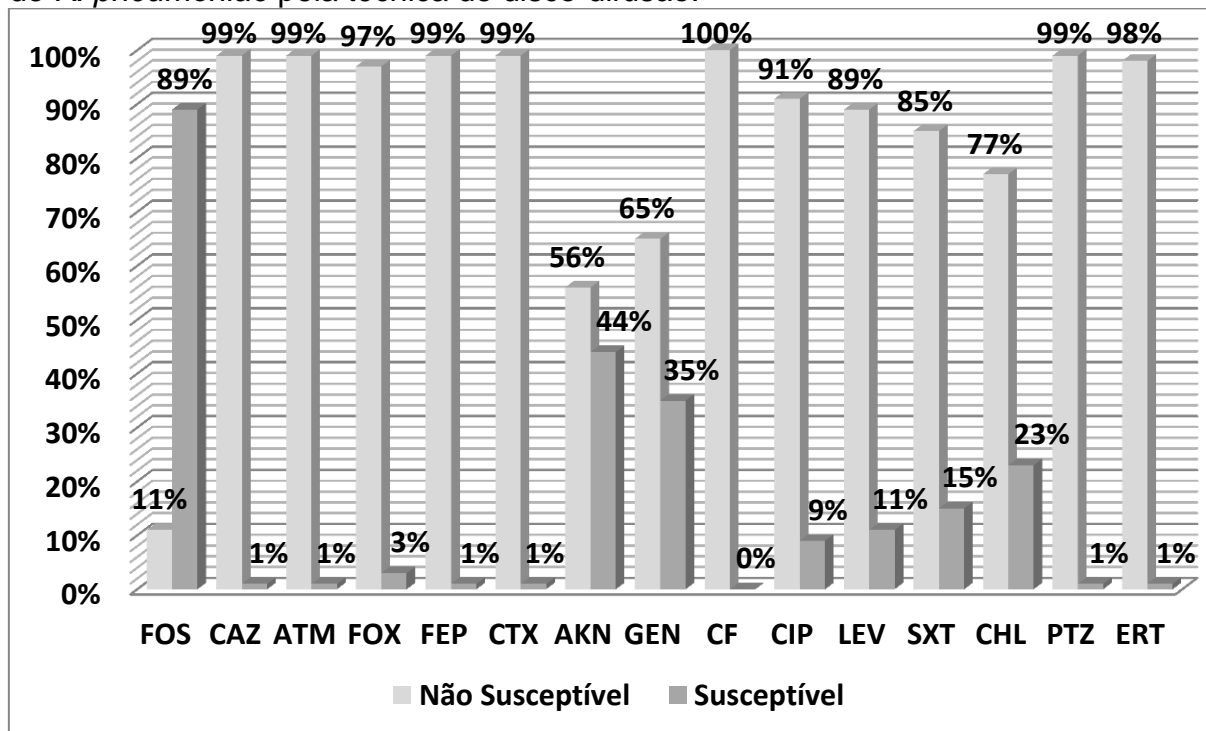


### ANEXO 3 - Distribuição dos isolados por estado.

| Estados | Isolados positivos para <i>bla</i> <sub>KPC</sub> | Isolados negativos para <i>bla</i> <sub>KPC</sub> | Isolados positivos para <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> | Total |
|---------|---|---|---|-------|
| DF      | 14  | 0   | 0   | 14    |
| ES      | 11  | 2   | 0   | 13    |
| GO      | 6   | 1   | 0   | 7     |
| MA      | 5   | 0   | 0   | 5     |
| MT      | 1   | 6   | 0   | 7     |
| MG      | 14  | 4   | 0   | 17    |
| PB      | 2   | 1   | 0   | 3     |
| PE      | 14  | 1   | 0   | 15    |
| RJ      | 12  | 3   | 0   | 15    |
| RS      | 10  | 5   | 1   | 15    |
| SC      | 14  | 1   | 0   | 15    |
| Total   | 102   | 24  |   | 126   |

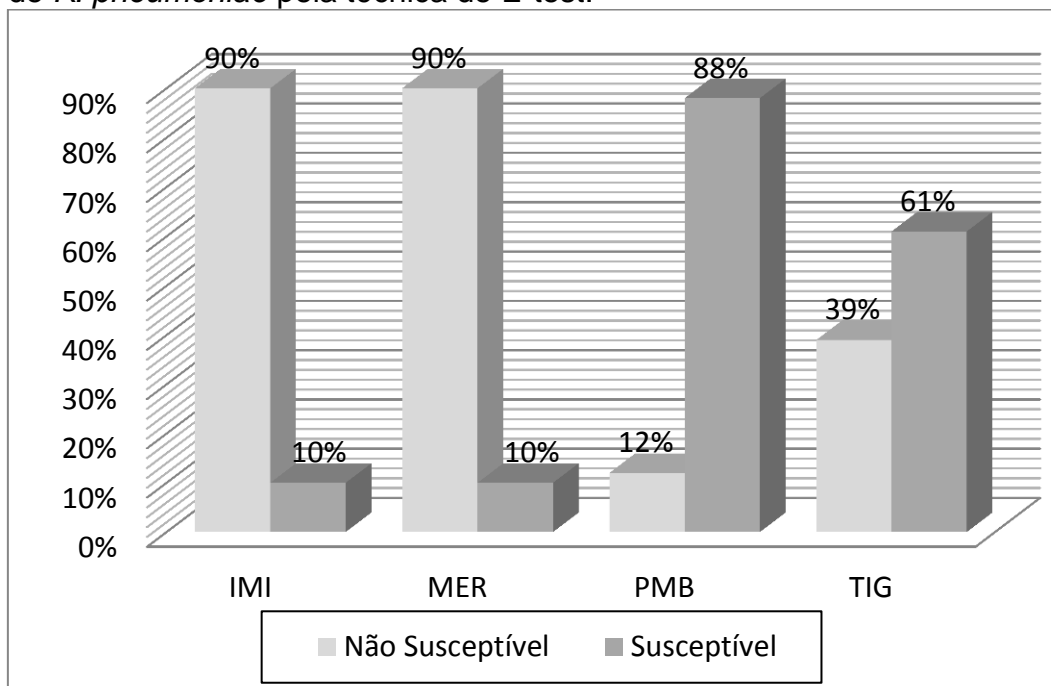
DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MA, Maranhão; MG, Minas Gerais; MT, Mato Grosso; PB, Paraíba; PE, Pernambuco; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina;

### ANEXO 4 - Percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados de *K. pneumoniae* pela técnica de disco-difusão.



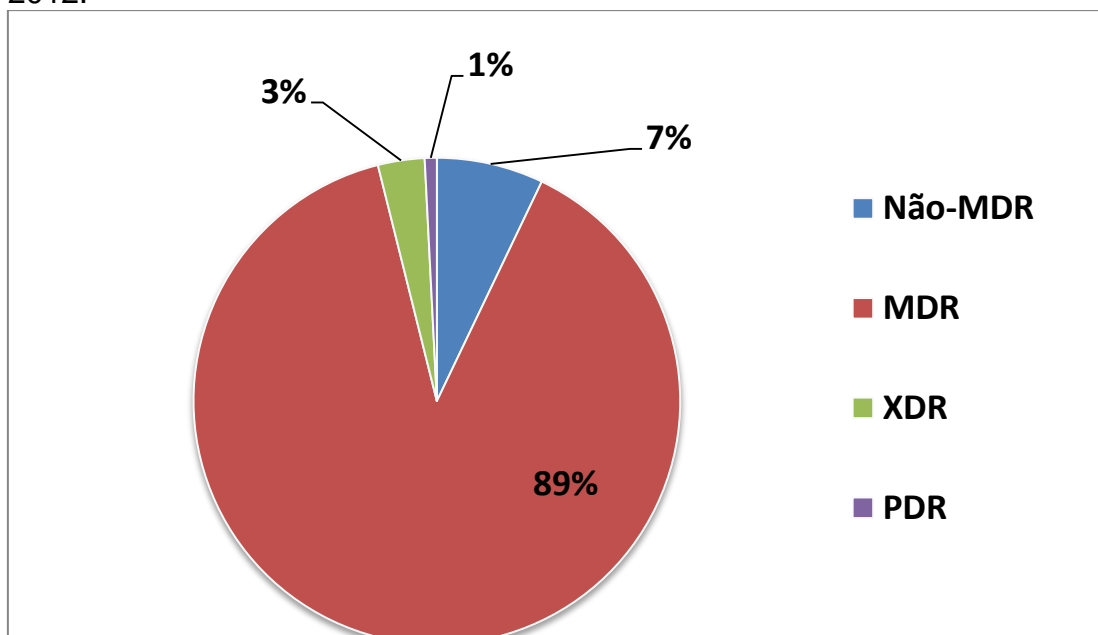
Fosfomicina-trometamol (FOS); ceftazidima (CAZ); aztreonam (ATM); cefoxitina (FOX); cefepime (FEP); cefotaxima (CTX); amicacina (AKN); gentamicina (GEN); cefalotina (CF); ciprofloxacina (CIP); levofloxacina (LEV); sulfamethoxazol-trimethoprim (SXT); cloranfenicol (CHL); piperacilina-tazobactam (PTZ); ertapenem (ETP).

**ANEXO 5** - Percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados de *K. pneumoniae* pela técnica de E-test.



Meropenem (MER); imipenem (IMI); polimixina B (PMB) e tigeciclina (TGC).

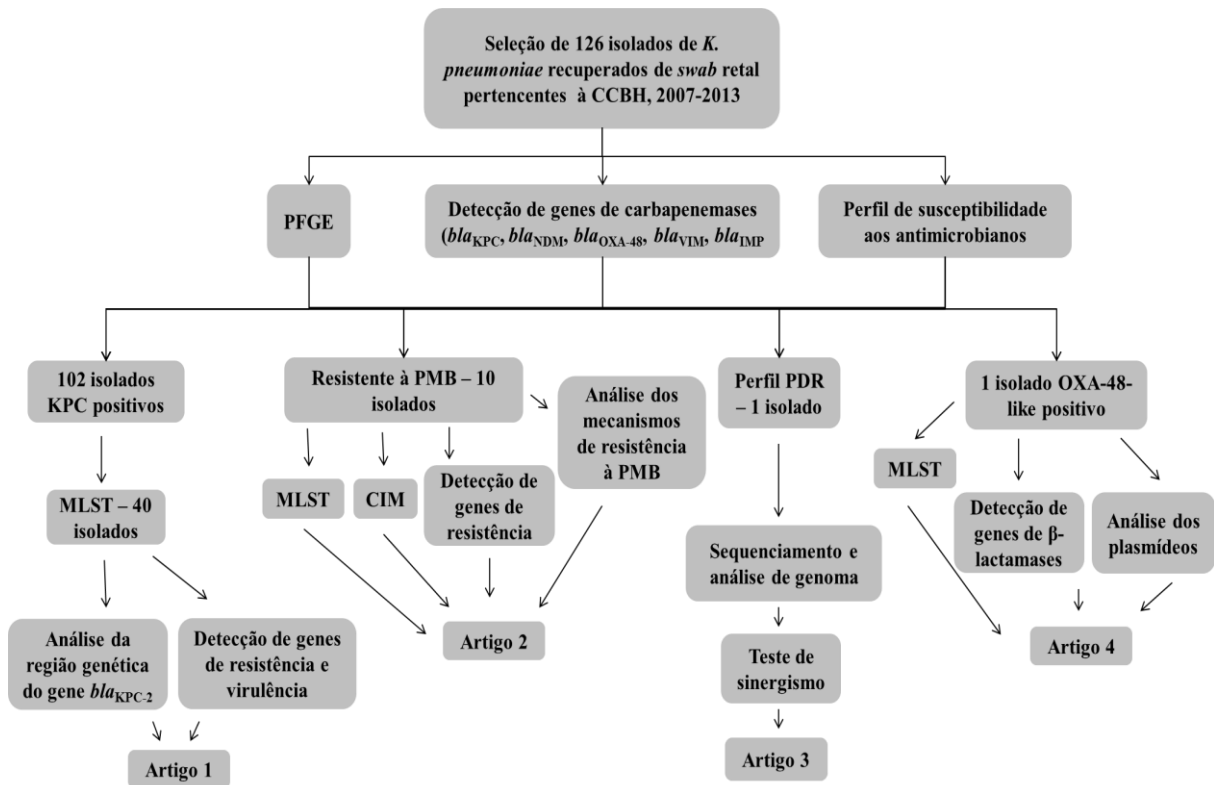
**ANEXO 6** – Classificação do perfil de resistência dos isolados segundo Magiorakos, 2012.



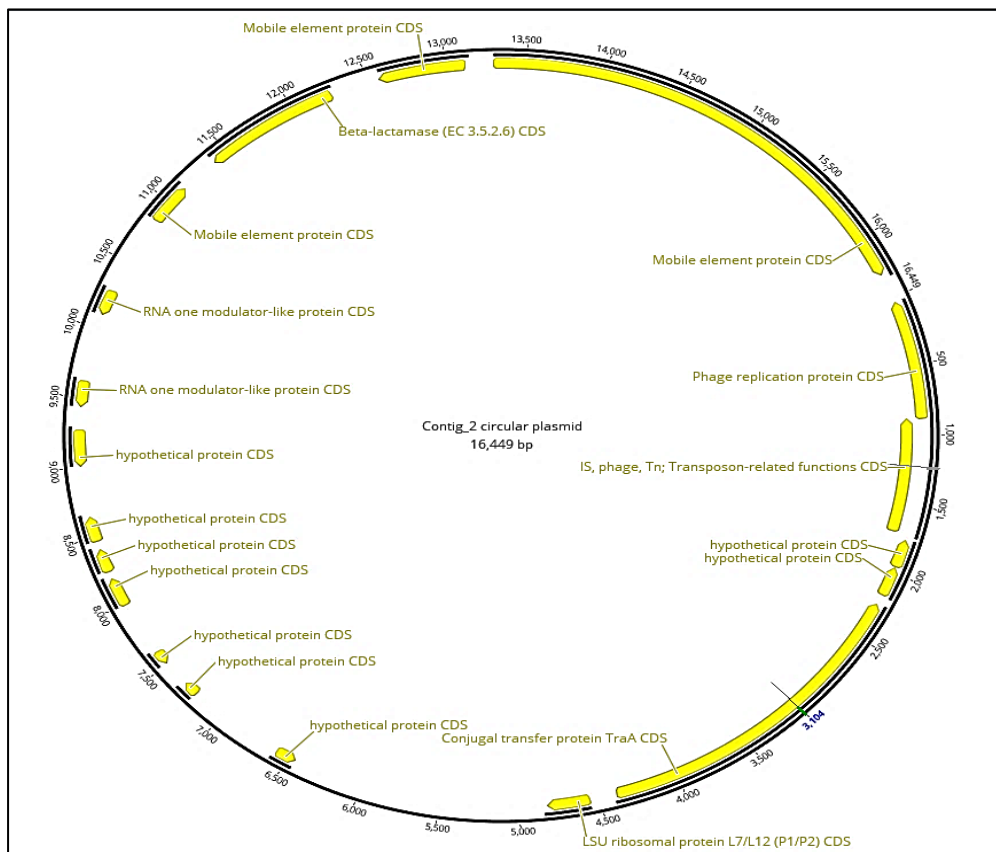
Multi-droga resistente (MDR); Extensivamente resistente (XDR); Pan-droga resistente (PDR).



## ANEXO 7 – Fluxograma das atividades laboratoriais.



## ANEXO 8 – Plasmídeo contendo o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> da amostra CCBH6984. Fonte: Geneious



**ANEXO 9 – Análise plasmídeoal das amostras representantes positivas para KPC.**

| Isolados (CCBH) | Plasmídeo contendo <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (kb) | Grupos de incompatibilidade detectados |
|-----------------|---|--|
| 5088            | 44  | N, FIIA                                |
| 5746            | 44  | N, A/C, FIIA                           |
| 5773            | 44  | N, A/C                                 |
| 6605            | 77  | N, A/C, FIIA                           |
| 6626            | 44  | N                                      |
| 6941            | -   | L/M, FIIA                              |
| 6985            | -   | FIIA                                   |
| 6996            | -   | FIIA                                   |
| 7051            | 127   | -                                      |
| 7054            | -   | L/M, FIIA                              |
| 7249            | 44  | N, A/C, FIIA                           |
| 7419            | 44  | N, A/C, FIIA                           |
| 7508            | -   | A/C                                    |
| 7521            | -   | L/M                                    |
| 7697            | -   | N                                      |
| 8192            | -   | L/M, FIIA                              |
| 8347            | -   | -                                      |
| 8351            | -   | -                                      |
| 8482            | -   | L/M                                    |
| 8494            | 77  | N, FIIA                                |
| 8543            | -   | FIIA                                   |
| 8909            | 46  | N, L/M                                 |
| 9024            | 46  | N, A/C                                 |
| 10156           | 46  | N, L/M                                 |
| 11555           | 46  | N, FIIA                                |
| 12024           | -   | N, FIIA                                |
| 12058           | -   | FIIA                                   |
| 12064           | -   | FIIA                                   |
| 12174           | 51  | N                                      |
| 13195           | -   | -                                      |
| 13198           | 46  | N, FIIA                                |
| 13205           | -   | -                                      |
| 13813           | 46  | N, FIIA                                |
| 13816           | 17 - 77   | N, L/M                                 |
| 14251           | -   | L/M                                    |
| 14323           | 71  | N, L/M                                 |
| 14406           | -   | FIIA                                   |
| 14408           | -   | L/M, FIIA                              |
| 14410           | -   | -                                      |
| 14465           | -   | -                                      |

**ANEXO 10 – Dendrograma das amostras representantes positivas para KPC.**

