

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENÉTICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE
***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AOS CARBAPENÊMICOS E A COLISTINA EM**
HOSPITAL TERCIÁRIO DE SALVADOR/BAHIA

VERÔNICA DE FRANÇA DINIZ ROCHA

Salvador – Bahia

2021

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENÉTICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE
***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AOS CARBAPENÊMICOS E A COLISTINA EM**
HOSPITAL TERCIÁRIO DE SALVADOR/BAHIA

VERÔNICA DE FRANÇA DINIZ ROCHA

Orientadora: Prof. Dra. Joice Neves Reis Pedreira

Coorientadora: Dra. Fabianna Marcia Maranhão Bahia

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Salvador – Bahia

2021

"AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENÉTICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AOS CARBAPENÊMICOS E A COLISTINA EM HOSPITAL TERCIÁRIO DE SALVADOR/BAHIA".

VERÔNICA DE FRANÇA DINIZ ROCHA

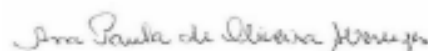
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de março de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Beatriz Meurer Moreira
Professora
UFRJ



Dra. Ana Paula de Oliveira Menezes
Professora Adjunta
UNEB



Dr. Adriano Queiroz Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

R672a Rocha, Verônica de França Diniz.
Avaliação da relação genética e perfil de sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae*
aos carbapenêmicos e a colistina em hospital terciário de Salvador./ Verônica de França
Diniz Rocha - 2021.
81 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Joice Neves Reis Pedreira, Laboratório de Patologia e
Biologia Molecular.

Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Polimixina. 3. Carbapenêmicos. 4. Colistina. I.
Título.

CDU 615.281.9

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES)-

Código de Financiamento 001

Dedicatória

Esta dissertação é fruto do trabalho de uma equipe que tentou de forma incansável evitar a infecção de dezenas de pessoas, especialmente a competente enfermeira e amiga Euclimeire Neves.

Ao senhor que conheci em Cuba que misteriosamente me orientou a seguir essa linha de pesquisa.

Aos meus pais, por chegarem até aqui comigo e me ensinado a ser resiliente.

Ao meu irmão Daniel pelo amor à ciência.

Aos meus filhos, Laura (3 anos) e Mateus (1 ano) que tornaram essa trajetória ainda mais memorável.

Aos meus eternos mestres da medicina, Professor Fernão e Michael Deveza.

Ao meu marido Lucas que acreditou e carregou comigo este projeto.

Ao meu maior exemplo de resistência e amor: Vó Anita.

A tia Marly que tornou possível o impossível.

Ao Ser superior.

ROCHA, Verônica de França Diniz. Avaliação da relação genética e perfil de sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae* aos carbapenêmicos e a colistina em hospital terciário de Salvador. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Bactérias gram negativas multirresistentes, tais como a *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e a colistina, representam um grande problema para os sistemas de saúde em todo o mundo e apresentam elevada letalidade. **OBJETIVO:** Avaliar a relação genética, perfil de sensibilidade antimicrobiana e mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e à colistina em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. **MÉTODO:** Série de casos de pacientes infectados/colonizados por cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e colistina (ColR-KPC) provenientes de um hospital terciário da cidade de Salvador, Bahia. No período de setembro de 2016 a janeiro de 2018 foram incluídos no estudo pacientes internados com idade igual ou superior a 18 anos. Utilizando questionário semiestruturado foram coletadas variáveis sociodemográficas e clínico-laboratoriais. Foram realizados testes fenotípicos e genotípicos em relação à resistência aos carbapenêmicos e colistina, e para verificar a disseminação dos isolados pelo hospital. **RESULTADO:** Foram identificadas 56 culturas de ColR-KPC pertencentes a 46 pacientes. Dados clínicos e demográficos foram obtidos de 31 pacientes. A mediana de idade foi 62, 67,7% eram homens (n=21/31), e mediana do escore de Charlson de 3. As principais comorbidades foram: hipertensão arterial sistêmica em 38,7% (n=14/31), diabetes 32,2% (n=10/31) e doença cerebrovascular em 25,8% (n=8/31). 90,6% (n=29/31) fez uso de ventilação mecânica e 93,7% (n=30/31) utilizou acesso venoso central. Dos 31 pacientes, 12 tiveram infecção por ColR-KPC e sete foram a óbito (58,4%). O uso prévio de polimixinas foi identificada em 32,2% (n=10/31) e de carbapenêmicos em 70,9% (n=22/31). Em relação aos 56 isolados, 67,8% (n=38/56) foram de swab retal, 8,9% (n=5/56) de hemoculturas, 7,1% (n=4/56) de ponta de cateter, 5,3% (n=3/56) secreção traqueal e 3,6% (n=2/56) urina. A CIM90 para colistina foi > 16 µg/ml, sendo que mais da metade dos isolados (55%) tiveram a CIM de 256 µg/ml. O gene *bla_{KPC}* foi detectado em 92,8% dos isolados (n=52/56), *bla_{NDM}* 16,0% (n=9/56) e *bla_{GES}* 1,7% (n=1/56). Os genes *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* não foram detectados. A co-expressão de gene de carbapenemase foi encontrada entre *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em 10,7%, (n=6/56), e *bla_{KPC}* e *bla_{GES}* em 1,7% (n=1/56). Alteração no gene *mcrB* foi detectado em 64,2% (n=36/56) e não-detecção em 8,9% (n=5/56). A pesquisa de *mcr-1* foi negativa em todas os 56 isolados. O perfil do PFGE evidenciou perfil monoclonal em 84,7% dos isolados em diversos setores do hospital, sendo o ST-11 (CC-258) o tipo de sequência mais frequente. **CONCLUSÃO:** Pacientes infectados com ColR-KPC apresentaram elevada letalidade. Apesar das medidas de controle de infecção hospitalar, a transmissão horizontal parece ter contribuído para a disseminação da ColR-KPC ST-11 pelos diversos setores do hospital. Alterações/não detecção do gene

mgrB foram encontradas em 73,1% dos isolados, sugerindo que seja o principal mecanismo relacionado com a resistência às polimixinas neste estudo.

Palavras-Chave: *Klebsiella pneumoniae*, Resistência a polimixina, Resistência a carbapenêmicos, Resistência a colistina.

ROCHA, Veronica de França Diniz. Evaluation of the genetic relationship and sensitivity profile of *Klebsiella pneumoniae* to carbapenems and colistin in a tertiary hospital in Salvador. 2021. 81 f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) – Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Multi-resistant gram negative bacteria, such as carbapenem and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* represent a major problem for health systems worldwide and have high lethality. **OBJECTIVE:** Evaluate the genetic relationship, antimicrobial sensitivity profile and the mechanisms of resistance to carbapenems and colistin in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **METHOD:** Series of cases of patients infected/colonized by *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and colistin (ColR-KPC) strains from a tertiary hospital in the city of Salvador, Bahia. From September 2016 to January 2018, patients aged 18 years or older hospitalized were included in the study. Using a semi-structured questionnaire, sociodemographic and clinical-laboratory variables were collected. Phenotypic and genotypic tests were performed in relation to resistance to carbapenems and colistin, and to verify the spread of isolates by the hospital. **RESULT:** 56 ColR-KPC cultures belonging to 46 patients were identified. Clinical and demographic data were obtained from 31 patients. The median age was 62, 67.7% were men (n=21/31), and the median Charlson score was 3. The main comorbidities were: systemic arterial hypertension in 38.7% (n=14/31), diabetes 32.2% (n=10/31) and cerebrovascular disease in 25.8% (n=8/31). 90.6% (n=29/31) used mechanical ventilation and 93.7% (n=30/31) used central venous catheter. Of the 31 patients, 12 had ColR-KPC infection and seven died (58.4%). Previous use of polymyxins was identified in 32.2% (n=10/31) and carbapenems in 70.9% (n=22/31). Regarding the 56 isolates, 67.8% (n=38/56) were from rectal swabs, 8.9% (n=5/56) from blood cultures, 7.1% (n=4/56) from tip of catheter, 5.3% (n=3/56) tracheal secretion and 3.6% (n=2/56) urine. The MIC₉₀ for colistin was > 16 µg/ml, with more than half of the isolates (55%) having a MIC of 256 µg/ml. The *bla*_{KPC} gene was detected in 92.8% of the isolates (n=52/56), *bla*_{NDM} 16.0% (n=9/56) and *bla*_{GES} 1.7% (n=1/56). The *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes were not detected. Carbapenemase gene co-expression was found between *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} in 10.7%, (n=6/56), and *bla*_{KPC} and *bla*_{GES} in 1.7% (n=1/56). Changes in the *mgrB* gene were detected in 64.2% (n=36/56) and non-detection in 8.9% (n=5/56). The *mcr-1* test was negative in all 56 isolates. The PFGE profile showed a monoclonal profile in 84.7% of the isolates in different sectors of the hospital, with ST-11 (CC-258) being the most frequent type of sequence. **CONCLUSION:** Patients infected with ColR-KPC had high lethality. Despite hospital infection control measures, horizontal transmission seems to have contributed to the dissemination of ColR-KPC ST-11 throughout the hospital. Alterations/non-detection of the *mgrB* gene were found in 73.1% of the isolates, suggesting that it is the main mechanism related to resistance to

polymyxins in this study. **Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Polymyxin resistance, Carbapenem resistance, Colistin resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Resumo dos principais mecanismos de resistência às polimixinas	26
Figura 2 Exemplo de uma placa de ensaio de microdiluição em caldo (BMD) para Polimixina	30
Figura 3 Resultado do teste da gota evidenciando cepa sensível a colistina/polimixina.....	31
Figura 4 Resultado do teste da gota evidenciando cepa resistente a colistina/polimixina.....	31
Figura 5 Diagrama de seleção das culturas de ColR-KPC para o estudo.....	39
Figura 6 Curva epidêmica de todos os pacientes do estudo e do caso índice identificados no HGRS, Salvador – Bahia (N=47)	40
Figura 7 Curva epidêmica dos isolados de ColR-KPC identificadas na UTI geral e em outros setores no HGRS, Salvador – Bahia (N=56)	46
Figura 8 Resultado do PCR para <i>mgrB</i> de algumas cepas selecionadas randomicamente.....	51
Figura 9 PFGE evidenciando perfil clonal de 56 isolados.....	52
Figura 10 Distribuição dos 31 pacientes e do caso índice conforme o tempo de internação hospitalar, o perfil de PFGE e o momento de detecção do primeiro isolado com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=24)	54
Figura 11 Distribuição temporal dos pacientes com ColR-KPC conforme o perfil do PFGE e pontos de intervenções realizados no HGRS, Salvador - Bahia (N=46)	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN	Bactérias gram negativas
BKC-1	Brazilian Klebsiella carbapenemase-1
BMD	Microdiluição em caldo
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CC258	Complexo Clonal 258
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais dos Estados Unidos
CoIR-KPC	<i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenêmicos e a colistina
CMS	Colistimetato
ERC	<i>Enterobacterales</i> resistente a carbapenêmicos
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
EUCAST	Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
GES	Guiana Extended-Spectrum
HGRS	Hospital Geral Roberto Santos
IAGG	Grupo de Coordenação Institucional de Resistência Antimicrobiana das Nações Unidas
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IS	Elemento de Inserção
KPC	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase

LPS	Lipopolissacarídeos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsátil
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
SPM	<i>São Paulo metallo-β-lactamase</i>
ST	Tipo de Sequência
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UAVC	Unidade de Acidente Vascular Cerebral
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIM	Metallo- β -lactamase codificada pelo integron Verona
XDR	Resistência extensiva aos antimicrobianos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes de carbapenemases	33
Tabela 2 Características demográficas e clínicas dos pacientes com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=31).....	41
Tabela 3 Procedimentos, sítio de infecção e desfecho clínico dos pacientes com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=31)	43
Tabela 4 Análise comparativa entre pacientes que infectaram e que colonizaram no HGRS, Salvador – Bahia (N=31).....	44
Tabela 5 Frequência de antibioticoterapia empírica empregada até a identificação da cultura com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=31).....	45
Tabela 6 Sítio da cultura com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=56).....	47
Tabela 7 Frequência de antibióticos sensíveis a <i>Klebsiella pneumoniae</i> do estudo no HGRS, Salvador – Bahia (N=56).....	47
Tabela 8 Caracterização genotípica das carbapenemases nas amostras de ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=56).....	49
Tabela 9 Genes de resistência a colistina e CIM para colistina das amostras de ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=56).....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
2.2	PRIMÁRIO	11
2.3	SECUNDÁRIO	11
3	REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	12
3.2	<i>K. PNEUMONIAE</i> E AS CARBAPENEMASES	13
3.3	CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE SEQUÊNCIA DAS CEPAS DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	16
3.4	<i>K. PNEUMONIAE</i> E INFECÇÕES RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE	17
3.5	TRATAMENTO DAS INFECÇÕES POR <i>K. PNEUMONIAE</i> RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS	18
3.5.1	Polimixinas	22
3.6	<i>K. PNEUMONIAE</i> RESISTENTES ÀS POLIMIXINAS	23
3.6.1	Avaliação da suscetibilidade microbiana	23
3.6.2	Resistência às polimixinas	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E AMOSTRA.....	27
4.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	28
4.2.1	Determinação da concentração mínima inibitória através do ensaio de microdiluição em caldo para Polimixina B e Colistina	28
4.2.2	Teste da gota (Drop-test)	30
4.2.2.1	<i>Preparo da solução da colistina</i>	30

4.2.2.2 Realização do teste da gota	30
4.2.3 Técnica PCR para detecção de genes de resistência aos carbapenêmicos.....	31
4.2.3.1 Extração de DNA total	31
4.2.4 Técnica PCR para detecção de genes <i>mcr-1</i>, avaliação do gene <i>mgrB</i> e relação genética dos isolados	33
4.2.4.1 Detecção gene <i>mcr-1</i>	33
4.2.4.2 Análise do gene <i>mgrB</i>	33
4.2.5 Determinação da relação genética entre os isolados estudados	33
4.2.5.1 Preparação dos blocos de agarose	34
4.2.5.2 Restrição do DNA bacteriano.....	35
4.2.6 A eletroforese em campo pulsátil (PFGE)	35
4.2.7 Tipificação por sequências de múltiplos <i>locus</i> (MLST- <i>multilocus sequence typing</i>)	36
4.3 PROPOSTA DE ANÁLISE	38
4.4 ASPECTOS ÉTICOS	38
5 RESULTADOS	38
5.1 CASO ÍNDICE	39
5.2 DESCRIÇÃO DOS PACIENTES DO ESTUDO.....	40
5.3 DESCRIÇÃO FENOTÍPICA, TOPOGRÁFICA E DISTRIBUIÇÃO PELOS SETORES DO HOSPITAL DOS ISOLADOS DE COLR-KPC	45
5.4 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE SENSILIDADE PELO MÉTODO BMD E TESTE DA GOTA NOS ISOLADOS DE COLR-KPC	48
5.5 DESCRIÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE COLR-KPC	48
5.6 INTERVENÇÕES DO SERVIÇO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR	55

6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Bactérias gram negativas (BGN) multirresistentes, tais como a *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, representam um grande problema para os sistemas de saúde em todo o mundo e apresentam elevada letalidade (CAPONE et al., 2013a). A resistência aos carbapenêmicos por *Enterobacterales* é geralmente mediada por enzimas do tipo carbapenemases que também conferem resistência à maioria das penicilinas e cefalosporinas (BRATU et al., 2005). Devido à ocorrência frequente de mais de um elemento genético que confere resistência aos antibióticos, cepas que produzem carbapenemases costumam apresentar resistência extensiva isto é, resistência a um ou mais antimicrobianos em quase todas as classes, exceto uma ou duas (MAGIORAKOS et al., 2012).

As polimixinas se tornaram alternativas terapêuticas para as infecções por *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos (ERC) e, com isso, o surgimento de resistência a esses antibióticos se tornou crescente (KARAIKOS et al., 2017; ROSSI GONÇALVES et al., 2016b). A resistência cromossômica e mediada por plasmídeo às polimixinas já foi descrita nas *Enterobacterales*, sendo responsáveis pela elevação da concentração inibitória mínima a diversos antibióticos. Sendo assim, os testes de suscetibilidade desempenham um papel primordial na orientação do tratamento antimicrobiano, pois os benefícios do tratamento precisam ser equilibrados com as possíveis toxicidades (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

Após alerta internacional em 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um comunicado de risco sobre um novo mecanismo de resistência às polimixinas em *Escherichia coli* mediado por um gene plasmidial, o *mcr-1* (LIU et al., 2016; “COMUNICADO DE RISCO N 01 2016 GVIMS GGTES ANVISA - Busca - Anvisa”). Já foi identificado a presença de resistência à polimixina mediada por plasmídeos em diferentes regiões do mundo (LIU et al., 2016; XAVIER et al., 2016a). Entretanto, a maioria das publicações sobre cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e a colistina (ColR-KPC) evidencia alterações em genes cromossômicos, principalmente as mutações relacionadas ao gene *mgrB*, sendo as principais responsáveis pelas resistências às polimixinas (VAN DUIN; DOI, 2015).

O conhecimento dos mecanismos de resistência das ColR-KPC contribui para o desenvolvimento de estratégias relacionadas ao controle da disseminação destas cepas, permitindo ainda avaliar o risco de transmissão da resistência entre espécies bacterianas. A escassez de trabalhos nacionais, principalmente no estado da Bahia, que caracterizem os mecanismos de resistência das ColR-KPC, associado a elevada letalidade das infecções, tornam este assunto de elevada relevância.

Apresento uma série de casos de pacientes infectados/colonizados por cepas de ColR-KPC provenientes de um hospital terciário da cidade de Salvador, Bahia, que descreve, dentre outros, as características clínicas dos pacientes acometidos, os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos e a colistina, assim como as medidas de controle de infecção hospitalar.

2 OBJETIVOS

2.1 PRIMÁRIO

Avaliar a relação genética, perfil de sensibilidade antimicrobiana e mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e à colistina em isolados de *Klebsiella pneumoniae* de um hospital público de Salvador, Bahia;

2.2 SECUNDÁRIOS

- Descrever as características clínicas dos pacientes com infecção e/ou colonização por cepas ColR-KPC em um hospital terciário de Salvador/Bahia;
- Determinar a letalidade entre os pacientes infectados por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e a colistina;
- Determinar a sensibilidade das cepas de *K. pneumoniae* a colistina utilizando a microdiluição em caldo e teste da gota;
- Determinar a frequência e os genes que codificam carbapenemases;
- Determinar a integridade do gene *mgrB* e a presença do gene *mcr-I*;
- Caracterizar o perfil clonal das cepas identificadas através da técnica de eletroforese campo pulsátil (PFGE) e, dessa forma, avaliar a transmissão cruzada;

- Realizar técnica MLST para determinar o tipo de sequência das cepas de *K. pneumoniae*;
- Descrever as medidas de controle de infecção por ColR-KPC adotadas na unidade hospitalar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A *Klebsiella* foi primeiramente descrita em 1882 por Carl Friedlander como uma bactéria identificada nos pulmões de pacientes que apresentavam pneumonia (FRIEDLAENDER, 1882). É encontrada no solo, nas plantas, nos animais e em superfícies aquáticas, assim como em dispositivos médicos e superfícies do ambiente hospitalar (DAO et al., 2014; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Coloniza a mucosa do trato gastrointestinal e da orofaringe podendo invadir tecidos e causar uma grande variedade de infecções, tais como: urinária, respiratórias, meningite, gastroenterite, abscesso hepático e endocardite (WEINSTEIN; GAYNES; EDWARDS, 2005; ROCK et al., 2014). É um dos microrganismos de grande preocupação para a saúde pública devido ao amplo espectro de doenças que pode causar, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, e pela frequente aquisição de mecanismos de resistência aos antibióticos (EFFAH et al., 2020).

A *K. pneumoniae* é uma BGN aeróbica, encapsulada, não-móvel, que fermenta a lactose e, em meio ágar, apresenta um fenótipo mucóide devido a cápsula de polissacarídeo ligada a membrana externa bacteriana (BAGLEY, 1985). Faz parte da família das *Enterobacteriaceae*, da ordem das *Enterobacterales*, das quais também se incluem outros patógenos, tais como: os gêneros de *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* e *Proteus* (TAGGAR et al., 2020).

Vários fatores de virulência da *K. pneumoniae* são utilizados para colonizar e se propagar em uma célula hospedeira, dentre eles: antígeno de superfície, particularmente o polissacarídeo capsular (Ex.: Antígeno K); sideróforos, responsáveis pela ligação ao ferro; e, variáveis de adesão responsáveis pela ligação às superfícies de células hospedeiras, como fimbrias tipo 1 e tipo 3, e as proteínas de adesão que não são do tipo

fímbrias (DONG et al., 2018). Fenótipos e genes de hiper mucoviscosidade, de síntese de lipopolissacarídeos (LPS) e de transporte, também contribuem para a virulência das cepas de *K. pneumoniae* (LIU et al., 2019). As fímbrias podem contribuir com a formação de biofilmes e na adesão das bactérias aos dispositivos médicos facilitando a infecção do trato urinário e pneumonia associada a dispositivos (PACZOSA; MECSAS, 2016; STAHLHUT et al., 2012).

3.2 *K. PNEUMONIAE* E AS CARBAPENEMASES

Em 2009, devido a aumento e disseminação de diversas bactérias multirresistentes pelo mundo a *Klebsiella pneumoniae*, juntamente com outros patógenos multirresistentes, tais como: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*, foram classificados como “ESKAPE”, que são os microrganismos mais frequentes das infecções relacionadas à assistência à saúde nos EUA, e que costumam efetivamente “escapar” dos tratamentos com antimicrobianos (BOUCHER et al., 2009). As opções terapêuticas para esses patógenos têm sido limitadas fazendo com que os médicos, muitas vezes, utilizem medicamentos mais antigos e previamente descartados, como as polimixinas, que são associadas a significativa toxicidade, além de apresentar limitações na literatura em relação à sua farmacocinética (FALAGAS; KASIAKOU, 2005).

Dois tipos principais de resistência aos antibióticos do tipo betalactâmicos e/ou carbapenêmicos estão presentes na *K. pneumoniae*: um mecanismo envolve a expressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) que tornam as bactérias resistentes a cefalosporinas e monobactâmicos e o outro, é a expressão de carbapenemases, tipicamente adquiridas por transferência horizontal de genes plasmidiais, que desencadeia resistência a praticamente todos os betalactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenêmicos (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015a). Os casos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos cuja investigação de carbapenemases é negativa, em geral, é devido a outros mecanismos de resistência menos frequentes nessa espécie, tais como mutações em porinas associadas a super expressão de bomba de efluxo, que pode estar associada ou não a produção de β -lactamases (DOUMITH et al., 2009; PULZOVA; NAVRATILOVA; COMOR, 2017).

As β -lactamases, incluindo as carbapenemases, são categorizadas empregando distintos critérios. A classificação proposta por Ambler (1980), baseia-se na estrutura molecular das enzimas e inclui todas as β -lactamases descritas em quatro classes: A, B, C e D. As classes A, C e D são compostas por enzimas com serina no sítio ativo, e a classe B, por enzimas com zinco e, por isso, essas últimas são caracterizadas como metalo- β -lactamases (AMBLER, 1980).

As carbapenemases da classe molecular A de maior importância são as *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) e Guiana Extended-Spectrum (GES), enquanto que as carbapenemases da classe B são as imipenemase (IMP), Verona imipenemase (VIM) e New Delhi metalo- β -lactamase (NDM). (BOGAERTS et al., 2010; NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008; TZOUVELEKIS et al., 2012b; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). As da classe D mais conhecidas em BGN são OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA 27, em especial, OXA-48. Independentemente do tipo de carbapenemase que expressam, os isolados das *Enterobacteriales*, incluindo a *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, podem ser genericamente denominados como ERC (AREND et al., 2015; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; POIREL et al., 2011).

A frequência dos diferentes tipos de carbapenemases em *Enterobacteriales* varia de acordo com a região geográfica (VAN DUIN; DOI, 2017; GRUNDMANN et al., 2016). Em 2014, as metalo- β -lactamases eram mais prevalentes na Ásia (especialmente no subcontinente indiano) e em alguns países europeus. Em contraste, carbapenemases do tipo D eram mais frequentes em países da Bacia do Mediterrâneo, especialmente a Turquia. Já nos EUA, Canadá, América Latina, China e países europeus como Itália e Grécia, a KPC foi a carbapenemase mais detectada (GRUNDMANN et al., 2016). O primeiro caso do mundo de *K. pneumoniae* produzindo carbapenemase foi identificado na Carolina do Norte em 1996, em que a carbapenemase era do tipo KPC-1 (YIGIT et al., 2001). Outras carbapenemases foram posteriormente identificadas pelo mundo em cepas de *K. pneumoniae*, tais como a NDM, IMP e a VIM (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015b).

As enzimas KPC são as carbapenemases mais prevalentes do Brasil e estão presentes no país, pelo menos, desde o ano de 2005. A primeira KPC, mais especificamente KPC-2, foi identificada retrospectivamente em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de hospitais de São Paulo e Florianópolis (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). Desde então, o gene *blaKPC* foi detectado em todo

o país, estando presente não apenas em *K. pneumoniae* mas também, em *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, entre outras enterobactérias (ZAVASCKI et al., 2009; D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; DA COSTA GUIMARÃES et al., 2013; AREND et al., 2015; ALMEIDA et al., 2014). Outras variantes da KPC, como a KPC-3 e KPC-30, já foram relatadas em *K. pneumoniae* no Brasil (KAZMIERCZAK et al., 2016) (MIGLIORINI et al., 2021).

Em relação aos casos de *K. pneumoniae* produtoras de OXA-48 no Brasil, as publicações ainda são escassas. Uma nova variante OXA-48 (OXA-370) foi descrita pela primeira vez em uma cepa de *Enterobacter hormaechei* isolada no Rio Grande do Sul, em 2013 (PEREIRA et al., 2015a). No Rio de Janeiro, também foi descrita a detecção de OXA-370 em três espécies de *Enterobacteriaceae* e a disseminação clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtora de OXA-370 em cinco hospitais do Rio de Janeiro (PEREIRA et al., 2015b).

Uma nova serina carbapenemase plasmídica da classe A, Brazilian *Klebsiella* carbapenemase-1 (BKC-1), foi detectada em três isolados clínicos de *K. Pneumoniae*, em 2008, provenientes de diferentes pacientes hospitalizados em São Paulo, Brasil. O BKC-1 hidrolisa penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017).

A primeira descrição da NDM no Brasil foi em *Providencia rettgeri* isolada de um paciente do Rio Grande do Sul, em 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Entretanto, um estudo retrospectivo no mesmo hospital detectou a presença de NDM, desde 2002. Em 2018, os dois primeiros casos clínicos de NDM das regiões norte e nordeste do Brasil foram descritos em isolados de *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii* de pacientes da cidade de Salvador (BARBERINO et al., 2018). Diversas publicações nacionais já demonstraram a detecção do *bla*_{NDM-1} em *K. pneumoniae* de diferentes cidades e estados, tais como: Londrina/Paraná, Recife/Pernambuco, Rio de Janeiro/Rio de Janeiro, Porto Alegre/Rio Grande do Sul e São Paulo/São Paulo (NAVA et al., 2019) (SCAVUZZI et al., 2019; AIRES et al., 2017a; RARO et al., 2020; MONTEIRO et al., 2019). Um estudo que avaliou 81 amostras coletadas entre outubro de 2012 e outubro de 2015 de diferentes regiões do Brasil demonstrou um aumento na detecção de *bla*_{NDM1} em *Enterobacterales*, sugerindo aumento da frequência dessa enzima no país (DA SILVA et al., 2019).

Em 2001, outro gene de resistência móvel pertencente à família das metalo- β -lactamases foi identificado primeiramente no território brasileiro, sendo denominado *São Paulo metallo- β -lactamase* (SPM) (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011). O gene *blas_{SPM-1}*, codificado por plasmídeo ou cromossomo, foi descrito em *P. aeruginosa* e, posteriormente, em *A. baumannii*, não sendo até o momento detectado em enterobactérias (TOLEMAN et al., 2002).

3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE SEQUÊNCIA DAS CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

As cepas de *K. pneumoniae* são normalmente classificadas, do ponto de vista molecular, por seus tipos de sequência (STs) que são definidos por suas sequências de nucleotídeos no locus 7 (*mdh*, *infB*, *tonB*, *gapA*, *phoE*, *pgi* e *rpoB*), e pelos STs intimamente relacionados chamados de complexos clonais (CHEN et al., 2014b).

A *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos pode pertencer a vários tipos de STs, o ST-11 pertencente ao complexo clonal (CC 258), por exemplo, tem sido detectado em diversas regiões do mundo (QI et al., 2011; SAVOV et al., 2018; HRABÁK et al., 2013). Um pequeno estudo que avaliou 10 cepas de *K. pneumoniae* de diferentes tipos de STs, sugeriu que a ST-11 pode apresentar vantagens em dias de sobrevivência em superfícies de PVC de unidades de terapia intensiva em comparação com *K. pneumoniae* que não são do ST-11. Essa possível característica, talvez possa contribuir para sua ampla disseminação (LIU et al., 2020).

Outro tipo de ST que se distribuiu em todo o mundo, o ST-258 que também pertence ao CC 258, costuma apresentar resistência a todos antibióticos betalactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (CHEN et al., 2014b; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015b). As carbapenemases encontradas em cepas ST-258 são codificadas pelos troposons Tn4401 (CHEN et al., 2014b). A análise genética da cepa ST-258 indica que esta cepa surgiu de um evento de recombinação entre uma cepa ST-11, que é um cepa membro do CC258, e uma cepa de *K. pneumoniae* pertencente ao ST-442 (CHEN et al., 2014a). A cepa ST-258, portanto, é um híbrido em que 20% de seu genoma é derivado do ST-442, enquanto 80% é do ST11 (CHEN et al., 2014b).

3.4 *K. PNEUMONIAE* E INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um dos eventos adversos mais frequentes associados à assistência à saúde e um grave problema de saúde pública, pois aumentam a morbidade, a mortalidade, o tempo de internação hospitalar e os custos (STORR et al., 2017; CLINKER et al., 2006). No Brasil, em UTIs de adultos, a pneumonia associada à ventilação mecânica é a infecção associada a dispositivos mais prevalente, seguido da infecção primária de corrente sanguínea e do trato urinário. (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019) A *K. pneumoniae* tem sido considerada um patógeno oportunista uma vez que normalmente causa infecções em pessoas hospitalizadas ou em indivíduos imunocomprometidos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

De acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº22 (Avaliação dos Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) do ano de 2019, a *K. pneumoniae* foi o segundo principal microrganismo causador das infecções primárias de corrente sanguínea relacionada a cateter venoso central nas UTIs de adultos no território brasileiro (os primeiros em notificação são os *Staphylococcus* coagulase negativos os quais também são relacionados a contaminação de coleta de hemoculturas), sendo 68,11% resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, 51,78% resistentes a carbapenêmicos e 12,27% resistentes a polimixinas. Em relação a infecção do trato urinário, a *K. pneumoniae* também foi o principal agente etiológico, sendo 66,75% resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, 42,69% resistentes a carbapenêmicos e 7,96% resistentes a polimixinas (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019). No estado da Bahia, a *K. pneumoniae* também é a principal responsável de infecções do trato urinário e de primária de corrente sanguínea relacionada a cateter nas unidades de terapia intensiva (UTI)s de adultos (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

Na Europa, estima-se que 8,9 milhões de episódios de IRAS ocorram anualmente. O número de pacientes com pelo menos uma IRAS foi estimado em 3,8 milhões por ano no período de 2016 a 2017. Em 2019, as 10 bactérias mais frequentes das IRAS foram:

E. coli (30,7%), *Staphylococcus aureus* (12,3%), *Klebsiella spp.* (11,4%), *Proteus spp.* (10,6%), *P. aeruginosa* (7,1%), *Enterococcus spp.* (4,8%), *Clostridium difficile* (4,4%), *Streptococcus spp.* (2,8%) *Enterobacter spp.* (2,1%) e estafilococos coagulase-negativos (1,9%) (SUETENS et al., 2018).

Nos Estados Unidos, a prevalência de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos relacionadas às IRAS é inferior à do Brasil, sendo 4,7% resistentes a carbapenêmicos em 2019. Apesar disso, a estimativa é de cerca de 1100 mortes relacionadas e 130 milhões de dólares de custos relacionados. Diferente do Brasil, nos últimos 8 anos, as infecções por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos nos Estados Unidos têm apresentado redução (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION., 2019).

Um estudo retrospectivo realizado em hospital terciário de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, avaliou o impacto das infecções em pacientes com sepse por ERC e não ERC. Dentre as ERC identificadas, 95,7% eram *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos. A mortalidade por ERC em 30 dias foi de 63,8%, sendo que no grupo de enterobactérias sensíveis a carbapenêmicos foi de 33,4% ($p < 0.01$). A mortalidade no grupo do ERC foi estatisticamente significativa entre os pacientes que apresentaram bacteremia por ERC no início da sepse ou choque séptico ($p < 0.01$) (SABINO et al., 2019). É importante ressaltar que no período desse estudo, o tratamento com ceftazidima-avibactam ainda não estava disponível, o que poderia ter reduzido a mortalidade no estudo já que, praticamente, todos as ERC eram produtores de KPC (SABINO et al., 2019).

Um estudo publicado em 2018, em que 38 pacientes foram tratados com ceftazidima-avibactam e 99 com colistina, a mortalidade hospitalar por todas as causas em 30 dias após o tratamento inicial foi de 9% versus 32%, (diferença de 23%; intervalo de confiança de 95%, 9% a 35%; $P = 0,001$). As infecções de corrente sanguínea ($n = 63$; 46%) e respiratórias ($n = 30$; 22%) foram as mais comuns (VAN DUIN et al., 2018). A ceftazidima-avibactam pode ser uma alternativa razoável à colistina no tratamento de infecções por ERC, entretanto ainda é um antibiótico de acesso limitado em nosso país, principalmente devido ao elevado custo.

3.5 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES POR *K. PNEUMONIAE* RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS

O Grupo de Coordenação Institucional de Resistência Antimicrobiana das Nações Unidas emitiu um relatório em 2019 referindo que bactérias multirresistentes poderão ser responsáveis pela morte de 10 milhões de pessoas por ano no mundo em 2050. Atualmente, pelo menos 700 mil pessoas morrem por ano no mundo devido a bactérias multirresistentes, incluindo 230 mil por tuberculose multirresistente. O tratamento de infecções respiratórias, urinárias, gastrointestinais, sexualmente transmissíveis, dentre outras, tem se tornado mais difíceis devido ao progressivo aumento de bactérias multirresistentes na comunidade e no ambiente hospitalar. Seres humanos, animais, alimentos e meio ambiente estão interconectados no contexto da resistência antimicrobiana através da cadeia alimentar, contato com o meio ambiente, ingestão de água, entre outros (IAGG, 2019).

Em relação ao tratamento de ERC, ensaios clínicos randomizados são escassos nesse tema já que a maioria dos estudos clínicos disponíveis são do tipo observacional (frequentemente estudos de coorte retrospectivos), séries de casos ou relatos. Além disso, muitos trabalhos apresentam limitações importantes com diversos vieses, dentre eles de seleção e de informação (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2018).

Devido a importantes diferenças na epidemiologia local, a escolha da terapia empírica contra bactérias multirresistentes não pode ser generalizada (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2018). Em muitos centros, o tratamento de BGN resistentes a carbapenênicos costuma ser realizado com uma combinação de terapia baseada em polimixinas (colistina ou polimixina B), aminoglicosídeos, tigeciclina e fosfomicina (formulação intravenosa) (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020)(TZOUVELEKIS et al., 2012c; DELGADO VALVERDE et al., 2013; MORRILL et al., 2015).

Uma revisão sistemática reuniu 34 estudos que descreviam o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenênicos e que continham informações sobre a concentração inibitória mínima (CIM) dos microorganismos assim como sobre os antibióticos utilizados. O total foi de 301 cepas incluídas, sendo 161 produtoras de KPC e 140 de metalo- β -lactamases, provenientes de 244 infecções de corrente sanguínea, 32 pneumonias, 8 infecções urinárias, 4 traqueobronquites, 3 infecções de ferida e 7 outras infecções. Os pacientes receberam 7 tipos de regimes terapêuticos, sendo avaliada terapia

combinada com ou sem carbapenêmico, assim como monoterapia com tigeciclina, polimixinas e aminoglicosídeo. A menor taxa de falha (8,3%) foi observada para pacientes que receberam terapia combinada, incluindo a combinação com carbapenêmico, mesmo a *K. pneumoniae* sendo resistente. Por outro lado, o tratamento com tigeciclina e colistina em monoterapia, resultou em taxas de falha comparáveis às observadas para pacientes que receberam terapia inadequada (TZOUVELEKIS et al., 2012c).

Em 2 estudos tipo coorte, altas taxas de mortalidade foram relatadas com o uso de tigeciclina em monoterapia no tratamento de infecções da corrente sanguínea devido a *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (TUMBARELLO et al., 2012). A diminuição da eficácia clínica da tigeciclina em infecções graves pode ser atribuída em parte ao perfil farmacocinético/farmacodinâmico do medicamento. Além disso, a tigeciclina apresenta atividade bacteriostática contra BGN, e atinge concentrações subótimas da droga em vários sítios anatômicos (TZOUVELEKIS et al., 2012a).

Os aminoglicosídeos (gentamicina e/ou ampicacina) têm sido utilizados para tratamento de infecções por ERC, a depender da sensibilidade local. Para tratamento de infecção do trato urinário os aminoglicosídeos têm sido utilizados em monoterapia com resposta clínica e microbiológica satisfatória (SATLIN et al., 2011). Em uma revisão de 20 estudos clínicos, a combinação de um aminoglicosídeo e um carbapenêmico teve a menor taxa de mortalidade (TZOUVELEKIS et al., 2014).

Em 2017, uma pesquisa realizada através de entrevista a especialistas de 115 hospitais da França, Grécia, Israel, Itália, Kosovo, Eslovênia, Espanha e Estados Unidos (sendo 86,8% de nível terciário e 89,1% universitários) para avaliar como é realizado o tratamento das *Enterobacteriales*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos. A terapia combinada era realizada em 99,1% dos centros, sendo a combinação de algum tipo de polimixina com carbapenêmico a mais utilizada. Outras combinações relatadas foram polimixinas com tigeciclina, aminoglicosídeos e fosfomicina (formulação intravenosa). A monoterapia, quando utilizada, era reservada para casos de infecção do trato urinário, com aminoglicosídeos ou polimixina E (colistina), enquanto a terapia combinada era principalmente prescrita nos casos de bacteremia, pneumonia e infecção de sistema nervoso central (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020).

Para melhorar a sobrevida, o tratamento combinado com 2 ou mais medicamentos com atividade “*in vitro*” contra *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, incluindo os próprios carbapenêmicos, parece ser mais eficaz do que a monoterapia com polimixinas, tigeciclina ou aminoglicosídeos (TUMBARELLO et al., 2012; DAIKOS et al., 2014). Os benefícios da terapia combinada incluem: aumentar a probabilidade de acerto da terapia antimicrobiana no início do tratamento, potenciais efeitos sinérgicos e maior controle sobre o surgimento de resistência ao longo do tratamento. No entanto, a terapia combinada pode elevar o risco de desenvolvimento de infecção por *Clostridium difficile*, de colonização ou infecção por outras bactérias multirresistentes e de efeitos adversos, como nefrotoxicidade (PETROSILLO et al., 2013; BERGEN et al., 2012).

Em alguns países, novas opções terapêuticas estão disponíveis para *K. pneumoniae* que produzem carbapenemases do tipo serina, dentre eles: ceftazidima-avibactam, que é ativa contra *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases das Classes A (KPC) e D (especialmente OXA-48-like), meropenem-vaborbactam e imipenem-relebactam que são ativos apenas contra cepas que produzem carbapenemases da Classe A (KARLOWSKY et al., 2019; CASTANHEIRA et al., 2017; HAIDAR et al., 2017; KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; 2020). No Brasil, dentre os antibióticos supracitados, apenas está disponível a ceftazidima-avibactam, entretanto o seu uso ainda é restrito no país a poucos centros, devido ao elevado custo e a necessidade de utilizar testes moleculares e/ou fenotípicos que identifiquem o tipo de carbapenemase antes do uso.

A ceftazidima-avibactam é uma cefalosporina de terceira geração associada a um inibidor de betalactamase, o avibactam, que é um diazabiciclooctano, um não betalactâmico que se liga de forma covalente e reversível a betalactamases e carbapenemases do tipo serina, KPC e OXA-48 (EHMANN et al., 2012). A ceftazidima-avibactam foi inicialmente aprovada para o tratamento de infecção do trato urinário e infecção intra-abdominal (associada ao metronidazol). De forma geral, o espectro de ação é contra BGN aeróbios, com ação limitada contra gram-positivos como *S. aureus* e *Streptococcus spp.*, e sem atividade contra enterococos (VAN DUIN; BONOMO, 2016). Uma limitação da ceftazidima-avibactam é o potencial para surgimento de resistência durante o tratamento, devido a mutações que podem reverter a sensibilidade aos carbapenêmicos, como por exemplo na *bla*_{KPC-3} (SHIELDS et al., 2017; MUELLER et al., 2019).

Em contrapartida, a combinação de aztreonam com avibactam pode restaurar a atividade contra isolados produtores de metalo- β -lactamases, porque o aztreonam não é hidrolisado pelas metalo- β -lactamases, e o avibactam inibe outras β -lactamases (ESBL, KPC e OXA-48) evitando que estas façam hidrólise do aztreonam. A combinação aztreonam-avibactam não está disponível atualmente, mas a combinação de ceftazidima-avibactam mais aztreonam tem sido utilizada com sucesso, em alguns relatos de casos, contra infecções por bactérias produtoras de metalo- β -lactamases (SHAW et al., 2018)(DAVIDO et al., 2017;FALCONE et al., 2021).

3.5.1 Polimixinas

A colistina (polimixina E) foi isolada em 1947, a partir de uma bactéria proveniente do solo denominada *Paenibacillus polymyxa subsp. Colistinus* (BENEDICT; LANGLYKKE, 1947). As polimixinas E (colistina) e B pertencem a classe das polimixinas, sendo um dos primeiros antibióticos desenvolvidos com atuação em bactérias gram negativas. Devido a toxicidade, especialmente a nefrotoxicidade, o seu uso foi abandonado na década de 70, ficando restrita ao uso oftalmológico e tópico. Entretanto, o surgimento de bactérias multirresistentes na década de 90, especialmente de *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa*, levaram a reintrodução das polimixinas devido à escassez de opções terapêuticas (LI et al., 2006).

O espectro de ação das polimixinas é limitado às bactérias gram-negativas, tais como algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Algumas espécies são naturalmente resistentes, tais como: *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* e *Vibrio cholerae*. Polimixinas não são ativas contra cocos gram-negativos (*Neisseria spp.*), gram-positivos, e bactérias anaeróbicas (FALAGAS, 2005).

As polimixinas são peptídeos catiônicos que possuem um heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídica acilada no terminal N por uma cauda de ácido graxo (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010). A toxicidade das polimixinas é atribuída ao segmento hidrofóbico da cauda de ácido graxo, o qual também é associado a

atividade antimicrobiana (GALLARDO-GODOY et al., 2016). A colistina e a polimixina B diferem, apenas, em um único aminoácido no anel peptídico, com uma fenilalanina na polimixina B e uma leucina na colistina. A polimixina B é administrada diretamente como antibiótico na forma ativa, e a colistina como pró-droga na forma inativa, o colistimetato (CMS).(NATION; VELKOV; LI, 2014). Apenas uma pequena fração de CMS é convertida em colistina e essa conversão é lenta, com concentrações máximas ocorrendo 7 horas após a administração (BERGEN et al., 2012).

As polimixinas atuam na membrana externa das bactérias gram-negativas a partir da interação com os grupos fosfatos de carga negativa da membrana lipídica. Os LPS são desestabilizados aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana com perda do material do citoplasma gerando morte celular. Além disso, a polimixina pode se ligar e neutralizar a molécula de LPS durante a lise celular (LI et al., 2005). Outro mecanismo de ação da polimixina é a inibição de enzimas respiratórias vitais da membrana interna bacteriana (DERIS et al., 2014).

Devido a melhor farmacocinética da polimixina B e sua menor nefrotoxicidade em relação à colistina, é recomendado que a polimixina B seja utilizada preferencialmente para tratamento das infecções exceto as urinárias, já que a polimixina B não apresenta excreção renal. A colistina necessita de ajuste para a função renal, diferente da polimixina B. As polimixinas não atravessam a barreira hematoencefálica, portanto precisam ser administradas intratecal em meningites por BGN resistentes a carbapenênicos. As duas polimixinas necessitam de dose de ataque, sendo a da colistina 300mg e a da polimixina B 20.000-25.000 UI/kg. A dose de manutenção da colistina é de 300 – 360 mg/dia, conforme o peso do paciente, e a da polimixina B 30.000 UI/kg/dia, ambas divididas 2 vezes ao dia (TSUJI et al., 2019).

3.6 *K. PNEUMONIAE* RESISTENTE AS POLIMIXINAS

3.6.1 Avaliação da suscetibilidade microbiana

De acordo com o Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI) dos EUA, as *Enterobacteriales* são consideradas intermediárias as polimixinas se a concentração inibitória mínima (CIM) for ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ e resistentes se ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. Os métodos sugeridos

pelo CLSI para avaliar a sensibilidade das polimixinas são as microdiluições em caldo e em teste de colistina em agar. A CIM obtida a partir da colistina pode prever a CIM da polimixina B e vice e versa. Tanto o método de disco de difusão quanto o gradiente de difusão, não devem ser utilizados para avaliar sensibilidade às polimixinas (CLSI, 2021). Os Comitês, Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) e o Brasileiro de Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (BRCAST), consideram as *Enterobacterales* suscetíveis as polimixinas, quando ≤ 2 mg/l e resistente se > 2 mg/l, sendo apenas aprovado o método de microdiluição em caldo para determinar esses parâmetros (EUCAST, 2021; BRCAST, 2021).

Apesar do teste microdiluição em caldo ser o padrão-ouro, conforme recomendação do CLSI e EUCAST, ele ainda é restrito a poucos centros de saúde do Brasil por ser um método laborioso, tanto na sua elaboração quanto na interpretação, dificultando a sua aplicação na maioria dos laboratórios de microbiologia, inclusive de hospitais terciários. São diversas as dificuldades para se avaliar o perfil de sensibilidade às polimixinas, pois métodos mais acessíveis e de fácil execução, tais como o disco de difusão, não são indicados devido à pouca difusão do antibiótico no ágar ao se utilizar disco. Outros métodos, como o E-test e o teste automatizado, podem subestimar os valores da CIM das polimixinas, o que dificulta em detectar a resistência das *Enterobacterales*, gerando elevada quantidade de resultados com falsa sensibiliza. Esses fenômenos podem ocorrer, dentre outros motivos, pelas propriedades catiônicas das polimixinas e a ocorrência do fenômeno da heterorresistência (LANDMAN; SALAMERA; QUALE, 2013; HINDLER; HUMPHRIES, 2013).

3.6.2 Resistência às polimixinas

Até 2015, todos mecanismos de resistência às polimixinas relatados eram mediados por cromossomos que controlam os sistemas de dois componentes relacionados com a biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS) dos BGN, tais como: *pmrAB*, *phoPQ* e *mgrB* (CANNATELLI et al., 2013). Em 2015, durante um projeto de vigilância sobre resistência microbiana em animais na China, foi detectado uma cepa de *E. coli* com resistência à polimixina mediada por plasmídeo *mcr-1* em porcos, galinhas e outros animais (LIU et al., 2016). No mesmo estudo, foi detectado em 3 de 420 amostras de *K.*

pneumoniae de seres humanos o plasmídeo *mcr-1*. Apesar do maior potencial de disseminação dos plasmídeos e a repercussão mundial após a detecção do plasmídeo *mcr-1*, até o momento, a alteração no gene cromossômial *mgrB* ainda é a principal causa de resistência a colistina em *K. pneumoniae* (YANG et al., 2020; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; CHENG et al., 2015; POIREL et al., 2015).

Em 2016, no Brasil, foi relatado o primeiro caso de resistência às polimixinas por *mcr-1* em uma cepa de *E. coli* (FERNANDES et al., 2016). Outro caso, também no Brasil, de detecção do *mcr-1* foi em *K. pneumoniae*, ocorreu na cidade de São Paulo, em uma paciente hospitalizada que era também colonizada por *E. coli* com *mcr-1* (PERDIGÃO NETO et al., 2019). Uma coorte retrospectiva de pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas em São Paulo/Brasil identificou a presença do gene *mcr-1* em duas cepas de *K. pneumoniae*, sendo a primeira de 2011 e a outra de 2015 (HIGASHINO et al., 2019a).

Até o momento, vários outros genes *mcr* foram identificados, incluindo *mcr-2*, -3, -4, -5, -6 e -7, que compartilham 81%, 32,5%, 34%, 36,1%, 83% e 35% de semelhança na sequência de aminoácidos com *mcr-1*, respectivamente (XAVIER et al., 2016b; NANG; LI; VELKOV, 2019; CARATTOLI et al., 2017; YANG et al., 2018).

A resistência às polimixinas ocorre através de vários mecanismos: (1) os mediados por cromossomos, principalmente através de alterações intrínsecas nos dois componentes relacionados com a formação do LPS, dentre eles o sistema regulatório *PhoPQ* e *PmrAB* e seus reguladores *mgrB*; e (2) os mediados por plasmídeo, que envolvem genes *mcr* que modificam LPS (AH; KIM; LEE, 2014). As alterações nos cromossomos podem também envolver os genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* que também participam da biossíntese do LPS (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017).

Modificações estruturais do LPS bacteriano são as principais formas de resistência às polimixinas em BGN. Essas modificações incluem a adição de 4-amino-4-desoxi-l-arabinose ou fosfoetanolamina, após mutações cromossômicas em genes que codificam os sistemas dos dois componentes, *PhoPQ* e *PmrA/B*, ou no *mgrB*, um regulador negativo de *PhoPQ* (BARON et al., 2016a) (Figura 1).

A inativação do gene *mgrB* pode ocorrer através de numerosas mutações, tais como, deleção e inserção. O *mgrB* é o regulador do feedback negativo da *PhoPQ* e, a sua inativação, resulta na ativação constitutiva do *PhoPQ* que posteriormente ativa

diretamente o operon *arnBCADTEF*, levando à adição de grupos catiônicos no LPS, reduzindo a afinidade às polimixinas (POIREL et al., 2015) (Figura 1). O gene *mcr-1* também causa modificações na estrutura do LPS ao codificar a PEtN que se liga aos grupos fosfatos do lipídeo A do LPS (BARON et al., 2016a; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Portanto, toda mutação que adiciona grupos catiônicos ao lipídeo A tornam-o menos aniônico e, conseqüentemente, com menor afinidade às polimixinas que são substâncias catiônicas (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

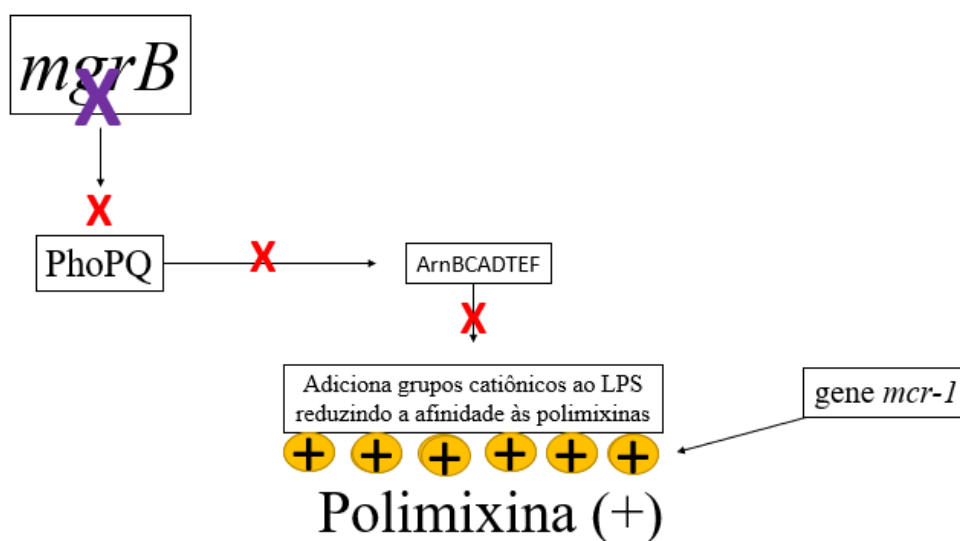


Figura 1 Resumo dos principais mecanismos de resistência à polimixina

O *mcrB* é uma proteína reguladora e a sua inativação implica em hiperexpressão do PhoPQ que adiciona grupos catiônicos ao LPS, através da ativação do operon *arnBCADTEF*, reduzindo a afinidade das polimixinas. A presença do *mcr-1* modifica o lipídeo A do LPS.

Fonte: Adaptado de *S. Baron et al* (BARON et al., 2016b).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E AMOSTRA

Este é um estudo retrospectivo de série de casos de pacientes provenientes do Hospital Geral Roberto Santos (HGRS), infectados/colonizados por ColR-KPC no período de setembro de 2016 a fevereiro de 2018, identificados através de culturas (swab de vigilância, secreção traqueal, hemocultura, urocultura, ponta de cateter, entre outros), que foram solicitadas pela equipe assistente do paciente, conforme demanda clínica ou estabelecidas por rotinas de vigilância do serviço de controle de infecção hospitalar da unidade. O armazenamento das amostras foi iniciado quando se detectou pela primeira vez, em setembro de 2016, o surgimento dessas cepas ColR-KPC em culturas do HGRS.

O HGRS apresenta cerca de 650 leitos para internação, sendo aproximadamente 100 leitos de terapia intensiva, 20 destes pertencentes a UTI geral de adultos. A unidade atende à população da macrorregional de saúde de Salvador, sendo o maior hospital público da Bahia, apresentando diversos serviços e especialidades de referência do estado, tais como: hemodiálise, neurocirurgia, neurologia, cirurgia geral e neonatologia. Em setembro de 2016, foi identificado o primeiro caso de ColR-KPC na UTI geral do HGRS pelo serviço de controle de infecção hospitalar.

Todas as cepas bacterianas identificadas como ColR-KPC no laboratório de microbiologia do HGRS, pelo método automatizado do aparelho Vitek[®]2, foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) no período supracitado, a fim de serem armazenadas para análise posterior. O HGRS não disponibilizava do método de microdiluição em caldo, padrão-ouro para avaliar a sensibilidade às polimixinas. O perfil de sensibilidade dos antibióticos, exceto da polimixina, foi realizado pelo método automatizado do aparelho Vitek[®]2, utilizando os pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST (BRCAST, 2021).

Os pacientes incluídos no estudo foram todos aqueles com idade igual ou superior a 18 anos, internados no HGRS que apresentaram infecção ou colonização por ColR-KPC. Não foram incluídas no trabalho cepas de ColR-KPC, enviadas ao laboratório de

microbiologia da Faculdade de Farmácia da UFBA, que pertenciam a pacientes não identificados.

Foi realizada a revisão dos prontuários utilizando questionário semiestruturado que abordava as variáveis sociodemográficas (sexo e idade); fatores de riscos para infecção/colonização (comorbidades, procedimentos invasivos e uso de antibióticos); dados clínico-laboratoriais (tipo de amostra de ColR-KPC, data da cultura, presença de sepse, desfecho de óbito ou cura em 30 dias), relacionados ao período de internação hospitalar e ao setor de aquisição da ColR-KPC. As comorbidades dos pacientes foram avaliadas pelo escore de Charlson.

Os pacientes foram considerados como infectados, quando apresentavam sinais e sintomas de infecção relacionados ao sítio da cultura, até 3 dias antes ou 3 dias depois da data da coleta da cultura. As culturas foram consideradas de colonização, quando os pacientes não apresentavam sinais e sintomas clínicos de infecção no período que o exame foi coletado. Culturas de swab foram consideradas como colonização. Todas as amostras foram coletadas, conforme avaliação da equipe assistente e do controle de infecção do hospital, sem nenhuma interferência do estudo.

Em relação ao óbito em até 30 dias, foram considerados como relacionados com a infecção pela ColR-KPC, os casos de pacientes infectados que evoluíram para óbito mantendo sinais e sintomas da infecção e que outras patologias não foram identificadas.

Foram avaliados os documentos do serviço de controle de infecção hospitalar do HGRS, tais como comunicações internas e reuniões, a fim de descrever as ações de investigação e de controle da disseminação dos casos identificados de ColR-KPC.

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima através do ensaio de microdiluição em caldo (BMD) para Polimixina B e Colistina

Seguindo o protocolo do CLSI, a colistina foi diluída em solvente água. A solução foi filtrada utilizando filtro Millipore (0,22 μm) e distribuída em criotubos individuais pré-identificados com a concentração da solução.

Os isolados bacterianos e os controles foram retirados do freezer -70°C para o primeiro cultivo. As placas foram incubadas a 37°C por 16-24h. A partir das placas de primeiro repique, foi feito um segundo repique em ágar TSA, sendo estas incubadas a 37°C por 16-24h. O controle positivo foi a cepa *Escherichia coli* MCR1 e o negativo, a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Foi realizado o preparo dos inóculos: uma suspensão bacteriana a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina a 0,85% para cada isolado; $33\mu\text{l}$ das suspensões foram diluídos em $4967\mu\text{L}$ de caldo MH (1×10^5 UFC/mL) e $50\mu\text{l}$ dessas novas suspensões bacterianas foram transferidas para as placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U. O experimento foi realizado em duplicata, de maneira que para cada isolado foram utilizadas 2 fileiras de poços.

As soluções dos antibióticos foram preparadas com as seguintes concentrações de colistina em μml : 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125. Posteriormente, $50\mu\text{l}$ de cada uma das soluções com o antimicrobiano, foram distribuídas nas placas de maneira que a suspensão bacteriana e a solução com o antimicrobiano sofressem uma diluição na proporção de 1:2. Posteriormente as placas de microdiluição foram incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20h. Foram consideradas como CIM a diluição correspondente ao primeiro poço, onde não houve crescimento bacteriano, ou seja, onde não houve turvação no meio de cultura ou formação de botão. Conforme os critérios estabelecidos pelo EUCAST/BRCAS, foi considerado sensível quando ocorreu inibição do crescimento bacteriano em concentrações ≤ 2 mg/L e resistente se > 2 mg/dl (Figura 2)(EUCAST, 2021)(BRCAS, 2021).

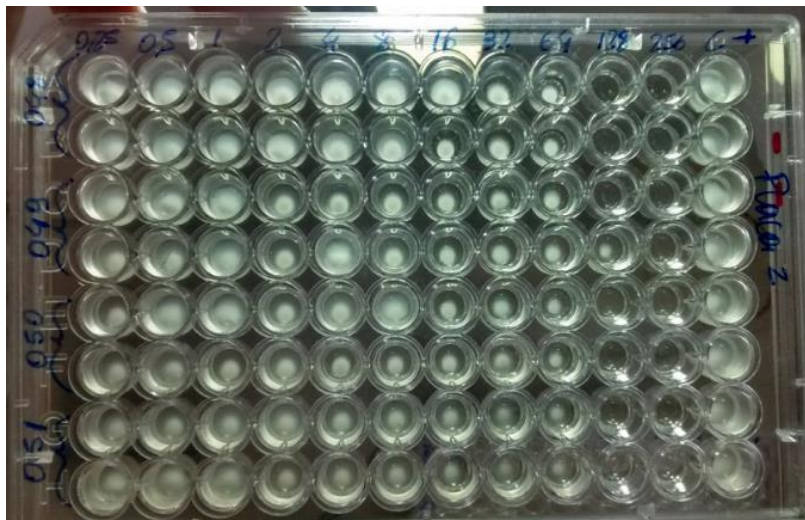


Figura 2 Exemplo de uma placa de ensaio de microdiluição em caldo (BMD) para Polimixina

4.2.2 Teste da gota (Drop-test)

4.2.2.1 *Preparo da solução de polimixina*

Uma solução de colistina foi preparada com a adição de 8 discos, contendo 10 μ g de colistina (OXOID) a um tubo contendo 5mL de caldo Muller Hinton Cátion, ajustado (DIFCO)(concentração final 16 μ g/mL), incubado em estufa bacteriológica por 18-24h a 35° \pm 2° C e armazenado à 4°C por até 12 meses.

4.2.2.2 *Realização do teste da gota*

O inóculo bacteriano foi preparado com salina estéril a 0,5 na McFarland e semeado por confluência em placa contendo Ágar Muller Hinton (DIFCO). Uma alíquota de 10 μ L da solução de colistina foi adicionada no centro da placa, e a placa foi incubada por 18-24h a 35 \pm 2 °C em estufa bacteriológica.

A ausência de crescimento bacteriano no local, onde foi aplicado a gota de polimixina, determina o resultado como sensível a polimixina (Figura 3). A presença de

qualquer crescimento bacteriano no interior da gota, confere o resultado como resistente a colistina(JOUY et al., 2017) (Figura 4).

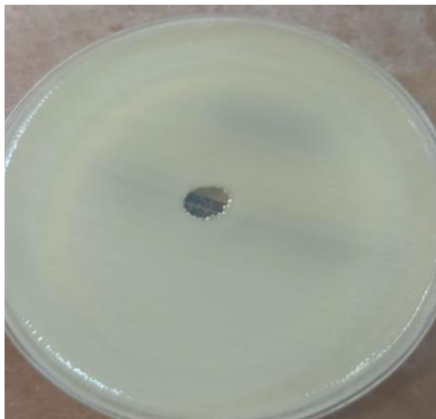


Figura 3 Resultado do teste da gota evidenciando cepa sensível a colistina.



Figura 4 Resultado do teste da gota evidenciando cepa resistente a colistina.

4.2.3 Técnica PCR para detecção de genes de resistência aos carbapenêmicos

4.2.3.1 *Extração de DNA total*

A bactéria foi repicada em ágar TSA e incubada durante 16 – 18h, à 35 – 37°C. Cinco colônias (ou uma alça calibrada de 1µl) da bactéria foram suspensas em 100 µl de

água milliQ e incubadas em banho-maria por 95°C por 10 minutos (para rompimento das células). Posteriormente centrifugadas à 12000 rpm por 2 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo e armazenado à -20°C até o uso.

4.2.3.2 Reações de PCR

Para detecção do *bla*NDM0,6 μ L dos primers de NDM_MP-F (5'GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC-3') e de NDM_MP-R (5'-GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT-3') foram adicionados a 2 μ LDNA, 12,5 μ L de Master Mix (PROMEGA) e 9,3 μ L de água ultra pura. A amplificação foi realizada 1x a 94°C por 10 min; 25x a 95°C por 1min; 57,5°C por 1min; 72°C por 1min, e; 1x a 72°C por 7min. A eletroforese foi realizada a 100v por 1 hora em agarose a 2% em TAE 1X e marcador 100 bp.

Os genes *bla*KPC, *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*OXA-48-LIKE e *bla*GES foram investigados através de duas reações de PCR multiplex, utilizando 0,25 μ L de cada um dos Primers listados na Tabela 1.

Tabela 1 Iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes de carbapenemases

Genes	Primer	Sequência	Amplicon (bp)
<i>bla</i> GES	GES F	AGT CGG CTA GAC CGG AAA G	399
	GES R	TTT GTC CGT GCT CAG GAT	
<i>bla</i> OXA-48-like	OXA-48 F	GCTTGATCGCCCTCGATT	281
	OXA-48 R	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	
<i>bla</i> VIM	VIM F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390
	VIM R	CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>bla</i> KPC	KPC F	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC	538
	KPC R	ACGACGGCATAGTCATTTGC	
<i>bla</i> IMP	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	233
	IMP-R2	GGTTTAAYAAAACAACCACC	

4.2.4 Técnica de PCR para detecção dos genes *mcr-1*, avaliação do gene *mgrB* e relação genética entre os isolados

4.2.4.1 Detecção do gene *mcr-1*

A análise molecular para avaliar a presença do gene *mcr-1* foi realizada por meio de PCR, onde o DNA bacteriano foi obtido por meio de extração por fervura a 100°C, e submetido à detecção em uma reação composta por PCR Master Mix, primers (*mcr-1-qF2* 5'-TGGCGTTCAGCAGTCATTAT-3' e *mcr-1-qR2* 5'-AGCTTACCCACCGAGTAGAT-3'), H₂O Ultrapura e DNA bacteriano. As condições de termociclagem utilizadas foram: 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1min; 60°C por 1min e 72°C por 1min, acrescidas de um passo de extensão final a 72°C por 10 min. O resultado foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% a 80V por 1h e revelados em transiluminador.

4.2.4.2 Análise do gene *mgrB*

A avaliação da integridade do gene *mgrB* foi realizada após amplificação do mesmo por PCR com os iniciadores 5'-AAGGCGTTCATTCTACCACC-3' 5'-TTAAGAAGGCCGTGCTATCC-3'. Inicialmente foi feita uma desnaturação à 94°C por 5 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 90s, 72°C por 60s, com uma extensão a 72°C por 10min. A eletroforese foi realizada a 100v por 1 hora em agarose a 2% em TAE 1X e marcador 100 bp.

4.2.5 Determinação da relação genética entre os isolados estudados

A avaliação da relação genética entre os isolados de *K. pneumoniae* foi realizada pela técnica de eletroforese de campo pulsado (do inglês, Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE), brevemente descrita nos tópicos abaixo.

4.2.5.1 Preparação dos blocos de agarose

Os isolados foram repicados em ágar BHI (Himedia) e incubados em estufa a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 20 horas para isolamento do crescimento em colônias. Em seguida, uma colônia de cada isolado foi inoculada em 10 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (Himedia) e incubada a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, sob agitação de 180 rpm durante 20 horas. As culturas foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 15 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento de células foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e transferido para novos tubos de microcentrífuga. As suspensões de células bacterianas de cada isolado foram centrifugadas a $13000 \times g$ durante 30 segundos e o sobrenadante desprezado. O pellet foi novamente ressuspensionado em um volume (1:1) de solução salina calculado de acordo com massa do pellet, correspondente à diferença entre o peso do microtubo, contendo o sedimento celular (em mg) e o peso do mesmo microtubo vazio. As suspensões de células bacterianas foram vigorosamente homogeneizadas em vórtice e uma alíquota de 10 μL dessa suspensão foi transferida para um novo microtubo, contendo 300 μL do tampão TEN (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM). Nessa suspensão foram adicionados 340 μL de agarose 2% de baixo ponto de fusão a uma temperatura de 58°C , estabilizada em banho-maria, e homogeneizados com auxílio de pipeta. Essa suspensão foi transferida para os moldes para confecção dos blocos de agarose (plugs) contendo as células bacterianas e deixados até sua completa solidificação a 5°C por 20 minutos. Após solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para placas para cultura de células (24 poços), contendo 2 mL de tampão EC (Tris 6 mM pH 6,5; NaCl 1 M; EDTA 0,01 M, Brij 58 0,5%, Sarcosil 0,5% e Deoxiglicolato 0,2%), acrescido de 200 μL de lisozima (10 mg/mL) e incubados a 37°C por 18 horas. Após este período, o EC foi aspirado e os plugs lavados duas vezes com 2 mL de CHEF-TE (Tris 0,1 M pH 7,5; EDTA 0,1 M), com intervalo de 30 minutos entre as lavagens. Após a lavagem, os plugs foram submergidos em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4 M pH 9,3 e Sarcosil 10%), adicionados de 100 μL de proteinase K (20 mg/mL) (Fluka – Sigma-Aldrich) e incubados a 50°C por 12 horas. Após incubação, a solução ES foi desprezada e os plugs lavados 4 vezes com CHEFTE, com intervalo de uma hora entre cada lavagem. Os plugs foram armazenados a 5°C em CHEF-TE até a etapa de clivagem do DNA com as endonucleases específica.

4.2.5.2 *Restrição do DNA bacteriano*

Para a etapa de restrição do DNA com endonucleases, os blocos de agarose contendo o material genético dos isolados foram reduzidos a aproximadamente 1/3 do tamanho original, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e transferidos para placas de microtitulação (96 poços), contendo 200 µL de tampão (Tris 0,6 M pH 8,0; MgCl₂ 0,02 M). Os blocos foram lavados 4 vezes com intervalo de uma hora entre cada lavagem à temperatura ambiente. Após as lavagens, o tampão foi substituído por 50 µL do tampão da enzima de restrição (CutSmart®) (New England Biolabs) e os blocos incubados a temperatura ambiente por uma hora. O tampão CutSmart® foi removido e substituído por uma nova alíquota do mesmo tampão contendo a enzima de restrição. Foram utilizadas 10 U/plug de *Xba*I (New England Biolabs) para *K. pneumoniae* e incubados em banho-maria a 37°C por 3h.

4.2.6 A eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

Após a clivagem enzimática, a eletroforese foi realizada por 18 horas, com tempo inicial de 1 segundo e final de 40 segundos em gel de agarose (BIORAD) 2% em solução 0,5x TBE (Tris 0,089 M; Ác. Bórico 0,089 M; EDTA 0,002 M), sob refrigeração e corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio por 30 minutos e descorados em água destilada por 20 minutos e fotografados sob luz UV.

O grau de similaridade entre os isolados da mesma espécie foi determinado pelo software Gel ComparII (Applied Maths, Belgium). Os padrões foram normalizados tomando como referência o marcador de peso molecular (PFGE Lambda Marker, New England Biolabs, Germany). Dendogramas foram construídos para visualizar as relações genéticas entre os isolados, utilizando o coeficiente de DICE com tolerância de 1,5. Os critérios estabelecidos por TENOVER et al. (1995) foram considerados para determinar os clusters.

4.2.7 Tipificação por sequências de múltiplos locus (MLST- *multilocus sequence typing*)

Na presente metodologia, 7 genes conservados (*housekeeping*) de *K. pneumoniae* (*gapA*, *rpoB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* e *tonB*), que codificam moléculas estruturais e/ou essenciais à atividade metabólica das células bacterianas, foram amplificados e posteriormente sequenciados. A extração de DNA foi realizada a partir de uma colônia bacteriana cultivada em TSA por 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C. A colônia foi ressuspensa em 100 µL de água MilliQ estéril em tubos de microcentrífuga de 1,5mL, os quais foram posteriormente incubados em banho-maria a 95°C por 10 min, e subsequentemente centrifugados a 12000 rpm por 2 min. O sobrenadante contendo o material genético foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Para amplificação foram utilizados primers e condições de amplificação específicas, listadas no protocolo disponível no endereço eletrônico <http://www.pasteur.fr/mlst/>. Para cada reação foi utilizado 0,5 µL de cada um dos primers a uma concentração de 10 pmol, 2,5 µL de Tampão de PCR 10x (Invitrogen), 2,25 µL de MgCl₂ (Invitrogen) na concentração 50 mM para amplificação do gene *tonB* e 25 mM para amplificação dos demais genes, 0,5 µL do *mix* de DNTPs (Invitrogen) 10 mM, 0,5 µL de Taq Polimerase (Invitrogen), 2 µL do DNA alvo e água livre de nucleases para um volume final de 25 µL. As reações foram executadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Cerca de 5 µL dos produtos obtidos foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, com tampão TBE 1x, à 100v e 100A por 60 min. O marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Scientific) foi adicionado no primeiro e último poço. Posteriormente o gel foi corado com solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Invitrogen) por 30 min e descorado em TBE 1x por 30 min. A visualização dos fragmentos amplificados e captura da imagem foi realizada no fotodocumentador GEL DOC XR (Bio-rad).

Caso a eletroforese revelasse a presença de uma única banda, sem a presença de múltiplos fragmentos e excesso de dímeros de *primers*, o produto amplificado restante seguiria para o processo de purificação com o Kit ExoSAP-IT (Affymetrix, EUA). Posteriormente os produtos purificados foram quantificados por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® Thermo Fisher Scientific). Um volume de 2 µL do DNA purificado foi submetido ao aparelho NanoDrop, que realiza a leitura da absorbância, fornece a concentração em ng/mL e a razão de pureza. Após a quantificação, os produtos purificados foram enviados à plataforma de sequenciamento do IGM – Fiocruz, a qual

utiliza o método de Sanger (SANGER *et al.*, 1997), para realizar as reações de sequenciamento de DNA em equipamento automático modelo ABI 3500*xl*.

Para cada reação de sequenciamento foi utilizado 2,0 µL de primer a uma concentração de 2 pmol, 1,5 µL de Tampão para sequenciamento 5x (Applied Biosystems), 1 µL de Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems) e água livre de nucleases para um volume final de 10 µL. Uma vez preparada, a referida mistura de reação foi adicionada aos poços das placas de PCR, que já continham, previamente, o DNA-molde pipetado em seu interior. As placas foram submetidas a spin de 3600 rpm e, posteriormente, seladas e levadas, ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), programado nas seguintes condições: 1 ciclo de 1 minuto a 96 °C, 35 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C. Após o término da reação, o conteúdo das placas foi submetido a purificação, que foi executada mediante a utilização de etanol e isopropanol ou etanol e EDTA.

Utilizando o protocolo de etanol e isopropanol, executou-se o procedimento a seguir: 40 µL de isopropanol 65 % adicionado em cada poço, a placa foi selada, agitada moderadamente e, posteriormente, incubada à temperatura ambiente por 15-30 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3600 rpm e, após este processo, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o *break* da centrífuga foi diminuído até o valor 5, e invertida a placa sobre papel absorvente e submetida a um spin a 200 rpm. Em seguida, 200 µL de etanol 70% foram adicionados em cada poço, selada a placa e centrifugada a 3600 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, diminuído o *break* da centrífuga até valor 5, e invertida a placa sobre papel absorvente e submetida a um spin a 200 rpm. A placa foi secada, em ambiente protegido da luz, por 30 minutos à temperatura ambiente ou 10 minutos a 37 °C.

Uma vez realizada a etapa de purificação, as amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação, imediatamente antes de serem colocadas no sequenciador. Na referida etapa, o conteúdo presente nos poços da placa foi ressuspensionado em 10 µL de formamida e, em seguida, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95 °C no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) e, posteriormente, submetidas a um choque térmico por 2 minutos em gelo ou freezer a -20 °C. Após as referidas etapas, a placa foi inserida no sequenciador ABI 3500*xl* e os eletroferogramas gerados submetidos a posterior análise em *softwares* específicos. As sequências consenso geradas foram submetidas ao banco de dados disponível em <http://bigsdbs.pasteur.fr/> o qual fornece

números alélicos cujas combinações entre os sete genes originam tipos de sequência (STs).

4.3 PROPOSTA DE ANÁLISE

O programa Epi-info v.3.5.1 (CDC/USA) foi utilizado para análise dos dados e realizado as análises descritivas, tais como: frequência, medidas de tendência central e percentil.

Com base em critérios, clínicos e laboratoriais, os episódios com isolamento de cepas resistentes a colistina, foram estratificados em dois grupos para análises comparativas: episódios de infecção e de colonização. Na construção de tabelas, para as variáveis categóricas (tais como: sexo, uso de polimixina e resultados de testes moleculares), foram determinadas frequências absolutas e relativas. Para as variáveis não categóricas (exemplo: idade, escore de Charlson), foi calculada a mediana e intervalos interquartílicos. Testes de probabilidade estatística foram utilizados para avaliar a significância estatística entre os grupos. O qui-quadrado de Mantel-Haenszel ou Teste exato de Fisher foi utilizado para avaliação da significância estatística dos achados entre as variáveis categóricas; os testes de Mantel-Haenszel foram utilizados para a comparação entre as variáveis contínuas. Para análises univariadas, os achados foram considerados de significância estatística, quando o valor de p foi $< 0,05$.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Geral Roberto Santos (CAAE: 79256117.2.0000.5028) em 22/03/2018. Foram garantidos privacidade, confidencialidade e sigilo das informações coletadas nos prontuários. Participantes que evoluíram para óbito ou que não foi possível o contato por telefone, tiveram a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5 RESULTADOS

De setembro/2016 a fevereiro/2018 foram identificadas 62 culturas positivas para ColR-KPC pelo método automatizado (Vitek 2®) do hospital provenientes de 52 pacientes, sendo as cepas enviadas e armazenadas no laboratório de microbiologia da

Faculdade de Farmácia da UFBA. Entretanto, duas culturas foram excluídas por serem cepas sensíveis a colistina pelo método de microdiluição em caldo realizado (BMD) na UFBA, três cepas por não terem sido adequadamente identificadas e uma por não ter sido encontrada no momento da análise. A cepa extraviada correspondia a primeira cepa, ou seja, o caso índice do estudo. As 56 cepas restantes que foram analisadas pertenciam a 46 pacientes, pois alguns tiveram mais de um isolado de ColR-KPC durante o período de internação. Dos 46 pacientes incluídos no estudo, apenas de 31 foi possível obter dados clínicos, laboratoriais e demográficos completos a partir da coleta de dados do prontuário, pois em muitos casos os documentos estavam perdidos ou incompletos (Figura 5).

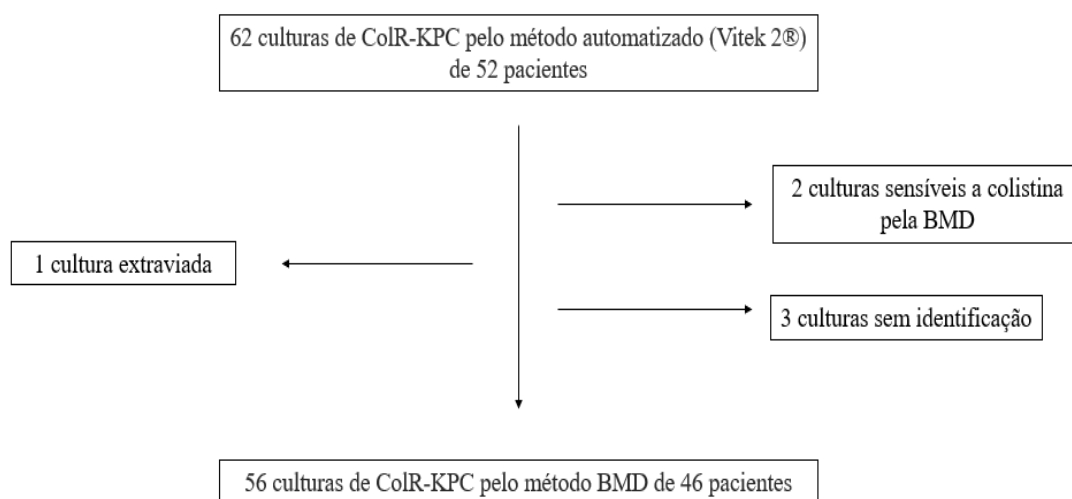


Figura 5 Diagrama de seleção das culturas de ColR-KPC para o estudo

5.1 CASO ÍNDICE

Em setembro/2016 foi identificada uma paciente com cultura de ponta de cateter evidenciando ColR-KPC na UTI geral do HGRS. A paciente tinha 45 anos e havia sido internada por rebaixamento do nível de consciência. Foi submetida a intubação orotraqueal, ventilação mecânica e cateter venoso central. Fez uso de carbapenêmicos por 16 dias, polimixina por 16 dias e vancomicina por 17 dias antes da identificação da ColR-KPC. Após a identificação dessa cepa, diversas medidas para investigação de novos casos foram iniciadas pelo serviço de controle de infecção hospitalar da unidade.

5.2 DESCRIÇÃO DOS PACIENTES DO ESTUDO

Dos 46 pacientes incluídos no estudo, apenas 31 tiveram prontuários completos, sendo possível somente avaliar os dados demográficos, clínico e laboratoriais desses 31 participantes. Dos pacientes com informações completas, 67,7% (n=21/31) eram do sexo masculino, com a mediana da idade de 62 anos, sendo a menor idade de 20 e a maior de 86 anos. A mediana do escore de Charlson foi 3. As principais comorbidades foram: 38,7% (n=12/31) hipertensão arterial sistêmica, 32,2% (n=10/31) diabetes e 25,8% (n=8/31) doença cerebrovascular. Nenhum paciente apresentou HIV/SIDA ou demência. (Figura 6) (Tabela 2)

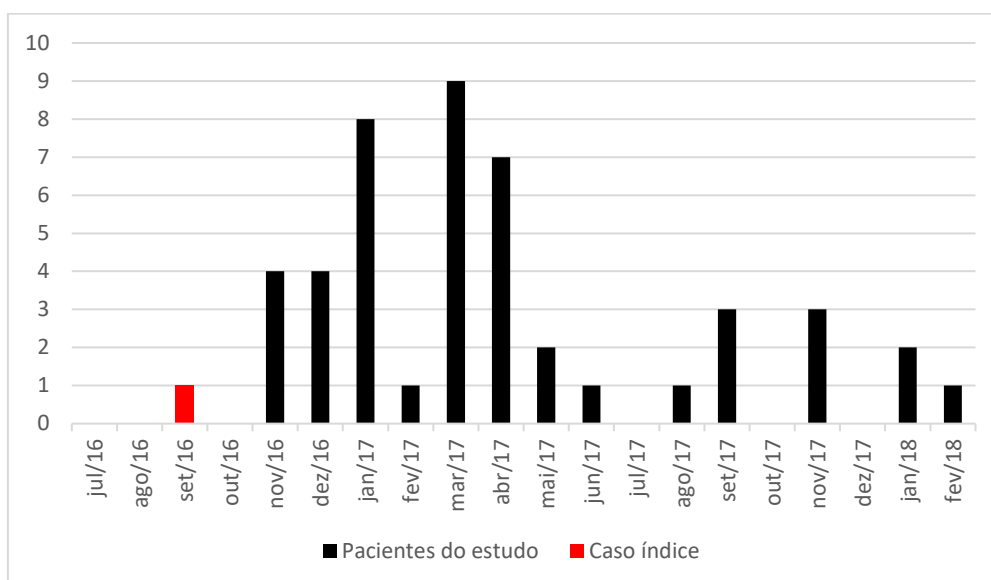


Figura 6 Curva epidêmica de todos os pacientes do estudo e do caso índice identificados no HGRS, Salvador – Bahia (N=47)

Distribuição de todos os pacientes do estudo e do caso índice que motivou o início da investigação. Pacientes que tiveram mais de um caso de infecção e/ou de colonização, foram apenas contabilizados uma única vez, no momento da primeira identificação da ColR-KPC.

Tabela 2 Características demográficas e clínicas dos pacientes com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=31)

Características	N (%)
Sexo	
Homem	21 (67,7%)
Mulher	10 (32,3%)
Idade (anos)	
Mediana de idade (IQ)	62
Mínima	20
Máxima	86
Escore de Charlson	
Mediana	3
Comorbidades	
Hipertensão arterial sistêmica	12 (38,7%)
Diabetes	10 (32,2%)
Doença cerebrovascular	8 (25,8%)
Insuficiência cardíaca congestiva	2 (6,4%)
Tumor maligno	2 (6,4%)
Doença crônica do fígado	2 (6,4%)
Doença pulmonar crônica	1 (3,2%)
Doença fígado moderado a severa	1 (3,2%)
Infarto agudo do miocárdio	1 (3,2%)
Neoplasias hematológicas	1 (3,2%)
Total pacientes	31 (100%)

Em relação aos 31 pacientes que tiveram os prontuários avaliados, de um total de 46 pacientes do estudo, a maioria (90,3%) foi submetida a ventilação mecânica e 93,5% (n=29/31) a acesso venoso central. 58% (n=18/31) necessitaram de alguma cirurgia ou apresentaram cateterismo vesical durante a internação. Ainda sobre os 31 pacientes, 38,7% (n=12/31) tiveram infecção e 61,3% (n=19/31) colonização pela ColR-KPC. As infecções registradas em ordem decrescente de frequência foram: infecção do sítio cirúrgico, pneumonia, infecção primária de corrente sanguínea e infecção do trato urinário. (Tabela 3)

As cirurgias que evoluíram com infecção foram: laparotomia devido a abdômen agudo obstrutivo por hérnia inguinal encarcerada, ressecção de neoplasia retroperitoneal,

apendicectomia, ressecção de má-formação venosa cerebral e duas amputações de membro por obstrução arterial. Todas as pneumonias foram associadas ao uso da ventilação mecânica. As duas infecções primárias de corrente sanguínea foram associadas a acesso venoso central e a infecção do trato urinário ao cateterismo vesical.

Em relação ao desfecho, a letalidade dos pacientes infectados no estudo pela ColR-KPC foi de 58,4% (n=7/31), dentre os 31 pacientes que tiveram o prontuário avaliado. As infecções que foram associadas aos óbitos dos pacientes foram: 2 de sítio cirúrgico, 2 de infecções de corrente sanguínea associada à cateter venoso central, 2 de pneumonias e 1 de infecção do trato urinário. Uma das infecções cirúrgicas foi uma laparotomia em um paciente com apendicite aos 31 anos (paciente 28). (Tabela 3)

Tabela 3 Procedimentos, sítio de infecção e desfecho clínico dos pacientes com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=31)

Procedimentos, tipo de infecção e desfecho	Pacientes N (%)
Procedimentos	
Cateter venoso central	29 (93,5%)
Ventilação mecânica	28 (90,3%)
Intubação orotraqueal	26 (83,8%)
Cateter vesical	18 (58,0%)
Cirurgia	18 (58,0%)
Cateter de pressão arterial média	17 (54,8%)
Sonda nasoenteral	26 (46,4%)
Cateter venoso periférico	13 (41,9%)
Derivação ventricular	6 (19,3%)
Pacientes colonizados	19 (61,3%)
Pacientes infectados	12 (38,7%)
Sítio da infecção	
Infecção de sítio cirúrgico	5 (41,6%)
Pneumonia	4 (33,4%)
Infecção primária de corrente sanguínea	2 (16,7%)
Infecção trato urinário	1 (8,3%)
Desfecho infectados (n=12)	
Óbito por ColR-KPC	7 (58,4%)
Curado	3 (25%)
Óbito por outra causa	1 (8,3%)
Transferido/não se sabe/outro diagnóstico	1 (8,3%)
Total de pacientes	31 (100%)

Não foi encontrado nenhuma associação estatística em relação a sexo, idade, tipo de carbapenemase, alteração no *mgrB*, uso de polimixina prévio, escore de Charlson ou cirurgia prévia entre os pacientes infectados e colonizados. Três (25%) dos 12 pacientes infectados tiveram colonização prévia a infecção. (Tabela 4)

Tabela 4 Análise comparativa entre pacientes que infectaram e que colonizaram no HGRS, Salvador – Bahia (N=31)

Características	Infecção (n=12) (%)	Colonização (n= 19) (%)	Valor-p
Sexo (n= 31)			
Masculino	7 (58,3)	14 (73,7)	0,31*
Idade ¹ (n= 31)	56,5 (30-75)	62 (51-70)	0,61+
<i>bla</i> _{KPC}	11 (91,7)	18 (94,7)	0,63*
<i>bla</i> _{NDM}	1 (8,3)	3 (15,8)	0,49*
Gene <i>mgrB</i>	1 (20,0)	4 (21,1)	0,34*
Gene <i>mgrB</i> mutado	8 (66,7)	13 (68,4)	0,61*
Ausência gene <i>mgrB</i>	3 (25,0)	2 (10,5)	0,28*
Uso prévio polimixina	5 (41,7)	5 (26,3)	0,31*
Cirurgia prévia	9 (75,0)	10 (52,6)	0,19*
Escore de Charlson	3 (1-4)	4 (2-6)	0,21+

¹ Median, interquartile range
* Exact Fisher test
+Mann-Whitey/Wilconxon test

Em relação aos 31 pacientes que tiveram prontuários avaliados, 70,9% (n=22/31) fizeram uso de carbapenêmicos até a data de coleta da cultura com ColR-KPC, com uma média de uso de 13,2 dias. 32,2% (n=10/31) dos pacientes fez uso de polimixina, com uma média de 15,1 dias de uso. (Tabela 5)

Tabela 5 Frequência de uso prévio de antibioticoterapia empírica empregada previamente à identificação da cultura com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=31)

Antibiótico	Pacientes N (%)	Dias*
Carbapenêmico	22 (70,9%)	13,2
Piperacilina/tazobactam	17 (54,8%)	7,5
Glicopeptídeo	14 (45,1%)	10,3
Polimixina	10 (32,2%)	15,1
Aminoglicosídeo	7 (22,5%)	8,7
Ampicilina/sulbactam	7 (22,5%)	12,1
Metronidazol	8 (25,8%)	6,3
Quinolona	6 (19,3%)	8,7
Clindamicina	2 (6,4%)	6,0
Tigeciclina	2 (6,4%)	7,5
Total	31 (100%)	

* Média de dias de uso do antibiótico até o dia da coleta da cultura com ColR-KPC

5.3 DESCRIÇÃO FENOTÍPICA, TOPOGRÁFICA E DISTRIBUIÇÃO PELOS SETORES DO HOSPITAL DOS ISOLADOS DE COLR-KPC

No total foram 56 isolados de ColR-KPC de 46 pacientes incluídos no estudo. 76,7% (n=43/56) dos 56 isolados foram identificados em 34 pacientes internados no setor da UTI geral, e os demais isolados (23,2%, n=13/56) em outros 12 pacientes internados em setores diversos do hospital. Os outros setores foram: local não identificado por falta de dados (8,9%, n=5), UTI da emergência (5,3%, n=3), sala de emergência (1,7%, n=2), UTI neurológica (1,7%, n=1), Unidade AVC (1,7%, n=1) e enfermaria de clínica médica (1,7%, n=1). Todos os isolados foram identificados em pacientes internados há mais de 48h. (Figura 7)

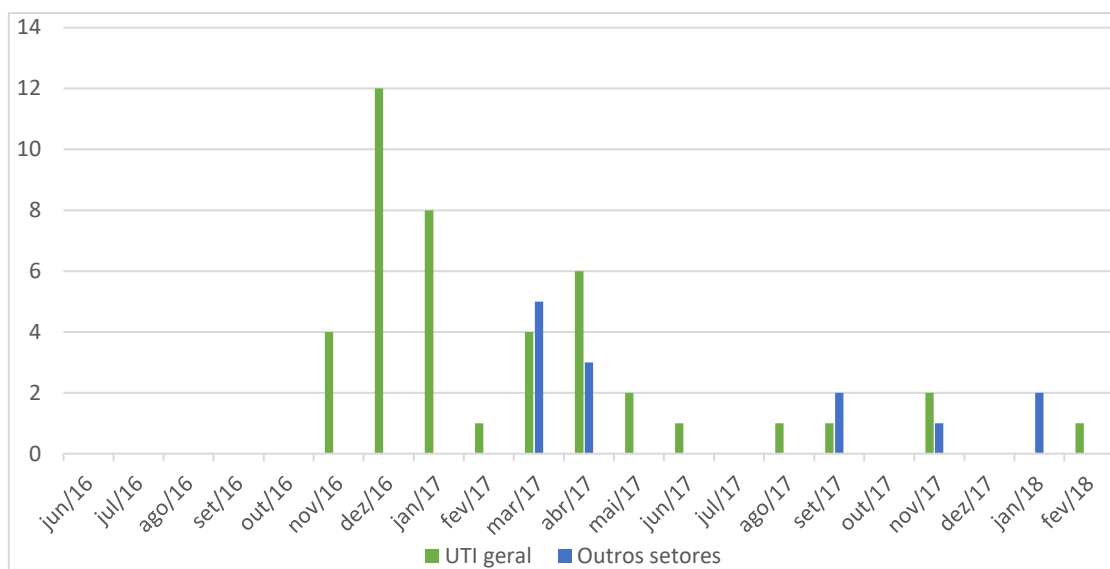


Figura 7 Curva epidêmica dos isolados de ColR-KPC identificadas na UTI geral e em outros setores no HGRS, Salvador – Bahia (N=56)

A curva epidêmica de todos os isolados de ColR-KPC evidencia o início da detecção dos casos na UTI geral e, posteriormente, em outros setores.

Dentre as 56 cepas de ColR-KPC, 67,8% (67,8%, n=38) das culturas eram de swab retal de vigilância, que eram coletados na rotina semanal das unidades de terapia intensiva ou na admissão dos pacientes nos diversos setores do Hospital, por orientação do serviço de controle de infecção hospitalar. Dentre as culturas clínicas, a mais prevalente foi a hemocultura em 8,9% (n=5) dos isolados. Duas hemoculturas foram relacionadas a infecção primária de corrente sanguínea relacionada a cateter, 1 a infecção do sítio cirúrgico e nas outras 2 restantes não foi encontrado o prontuário completo do paciente. Todas as culturas de ponta de cateter (7,1%, n=4) foram consideradas colonização pois os pacientes não tinham sinais de infecção e as hemoculturas destes não evidenciaram crescimento bacteriano. Uma urocultura foi associada a infecção do trato urinário e a outra não havia dados suficientes sobre o paciente. As 3 culturas de secreção traqueal foram associadas à pneumonia. (Tabela 6)

Tabela 6 Sítio da cultura com ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=56)

Sítio da cultura	Amostras N (%)
Swab retal	38 (67,8%)
Hemocultura	5 (8,9%)
Ponta de cateter	4 (7,1%)
Secreção/líquido intraoperatória	4 (7,1%)
Secreção traqueal	3 (5,3%)
Urocultura	2 (3,6%)
Total	56 (100%)

Além da resistência aos carbapenêmicos e a colistina, 91,1% (n=5/56) dos isolados foram resistentes a gentamicina. A amicacina foi o antibiótico com melhor perfil apresentando resistência, em apenas, 3,6% (n=2/56) dos isolados. Em relação a tigeciclina, 51,8% (n=14/27) das cepas eram resistentes a esse antibiótico. (Tabela 7)

Tabela 7 Frequência de *Klebsiella pneumoniae* com resistência aos antibióticos pela técnica do Vitek[®]2 no HGRS, Salvador – Bahia (N=56)

Classe de antibiótico	Cepas resistentes N (%)	Amostras avaliadas N (%)
Amicacina	2 (3,6%)	56 (100%)
Tigeciclina	14 (51,8%)	27 (48,2%)
Ertapenem	23 (88,4%)	26 (46,4%)
Gentamicina	5 (91,1%)	56 (100%)
Meropenem	53 (94,6%)	56 (100%)
Piperacilina/tazobactam	46 (95,8%)	48 (85,7%)
Imipenem	51 (96,2%)	53 (94,6%)
Cefepime	52 (98,1%)	53 (94,6%)
Ciprofloxacino	54 (98,1%)	55 (98,2%)
Ceftriaxone	52 (98,1%)	53 (94,6%)
Colistina*	55 (98,2%)	56 (100%)
Ampicilina/sulbactam	50 (100%)	50 (89,2%)
Cefuroxima-axetil	43 (100%)	43 (76,7%)
Total		56 (100%)

*A colistina foi testada com a técnica BMD

5.4 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO BMD E TESTE DA GOTA NOS ISOLADOS DE COLR-KPC

A CIM90 pelo método BMD, ou seja, a concentração que inibiu 90% das cepas foi $> 16 \mu\text{g/ml}$, sendo que mais da metade dos isolados (55%) tiveram a CIM de $256 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 9). Em relação a sensibilidade a colistina, o teste da gota apresentou resultado semelhante a BMD em todas as amostras, exceto em uma (do paciente 41) em que o teste da gota identificou como resistente e a BMD como sensível. Nesta cepa, a BMD evidenciou CIM para colistina de $2,0 \mu\text{g/mL}$, ou seja, no limite superior de sensibilidade. O PCR desta cepa não detectou a presença do gene *mgrB*, o que costuma ser relacionado a resistência a esse antibiótico. O padrão do PFGE da cepa desse paciente 41, conforme evidenciado na figura 9, foi o BA22 não detectado em nenhum outro paciente e os dados de prontuário eram incompletos, não possibilitando avaliar a história do paciente. As cepas dos pacientes 41, 43 e 44 apresentaram sensibilidade ao meropenem, embora tenha sido detectado com PCR o gene *bla_{KPC}* em todas (Tabela 7, 8 e 9).

5.5 DESCRIÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE COLR-KPC

A carbapenemase do tipo KPC foi prevalente em 92,8% ($n=52/56$) dos isolados, sendo também detectada NDM 16,0% ($n=9/56$), GES 1,7% ($n=1/56$) e em uma cepa nenhum gene foi detectado. A pesquisa de *bla_{OXA-48}* foi negativa em todas as amostras. A co-expressão de gene de carbapenemase foi encontrada entre *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em 10,7% ($n=6/56$), e *bla_{KPC}* e *bla_{GES}* 1,7% ($n= 1/56$). A pesquisa de outras Metalo- β -Lactamases como a VIM e IMP foram negativas (Tabela 8).

Tabela 8 Caracterização genotípica das carbapenemases nas amostras de ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=56)

Gene de carbapenemase	Amostras N (%)
KPC	52 (92,8%)
NDM	9 (16,0%)
OXA-48	0 (0%)
IMP	0 (0%)
VIM	0 (0%)
GES	1 (1,7%)
Nenhum gene detectado	1 (1,7%)
KPC e NDM	6 (10,7%)
KPC e GES	1 (1,7%)
Total	56 (100%)

Em relação ao mecanismo de resistência a colistina, o PCR para o gene *mgrB* foi realizado em todas as amostras, sendo detectado o gene com mutação em 64,2% (n=39/56), o gene sem alteração em 21,4% (n=12/56) e em 8,9% (n=5/56) o gene não foi detectado (Figura 7). A pesquisa de *mcr-1* foi negativa em todas as 56 amostras (Tabela 9).

Tabela 9 Genes de resistência a colistina e CIM para colistina das amostras de ColR-KPC no HGRS, Salvador – Bahia (N=56)

Gene de resistência e CIM	Amostras N (%)
Gene de resistência a colistina	
Gene <i>mgrB</i> com alteração detectada no PCR	39 (64,2%)
Gene <i>mgrB</i> inalterado	12 (21,4%)
Não detecção do gene <i>mgrB</i>	5 (8,9%)
CIM* da colistina pela microdiluição em caldo	
≥ 256 µg/mL	31 (55,3%)
128 µg/mL	2 (3,6%)
64 µg/mL	2 (3,6%)
32 µg/mL	11 (19,6%)
16 µg/mL	7 (12,5%)
4 µg/mL	1 (1,8%)
2 µg/mL	1 (1,8%)
Não realizado	1 (1,8%)
Total	56 (100%)

CIM: concentração inibitória mínima

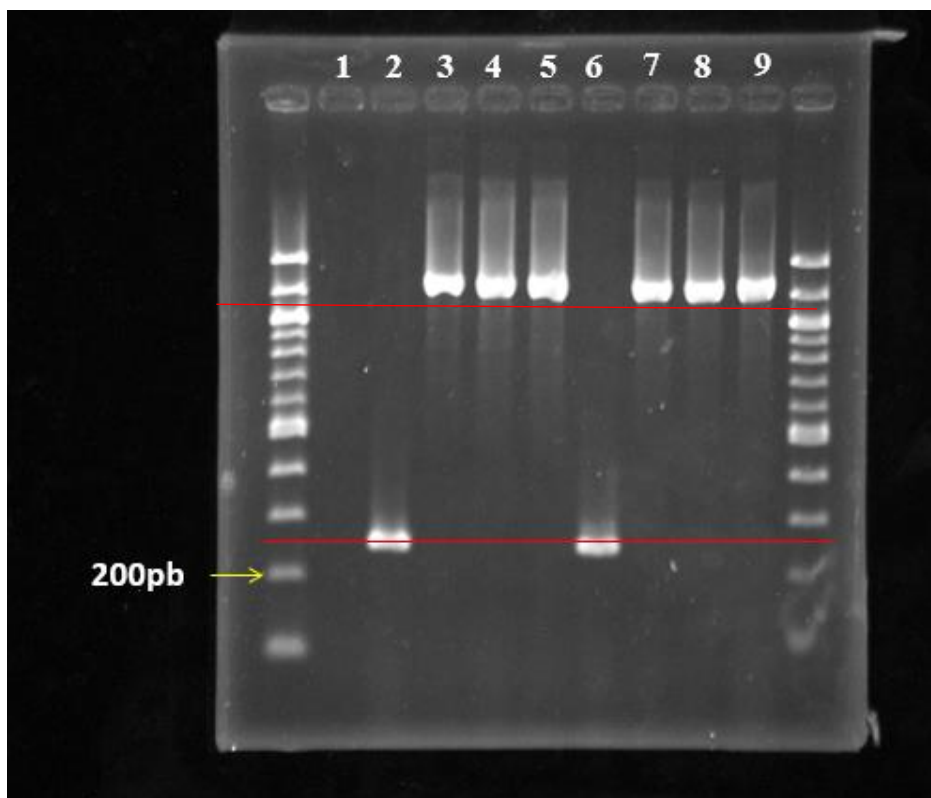


Figura 8 Resultado do PCR para *mgrB* de algumas das cepas que foram avaliadas. O fragmento menor, (253 pb) indicado pela linha inferior, corresponde ao gene íntegro (normal) com 47 aminoácidos. O fragmento maior (1110 pb), indicado pela linha vermelha superior evidencia alteração do gene *mgrB*.

As amostras submetidas a eletroforese neste gel são:

1 – CN; 2 – 11 *mgrB*; 3 – 24 *mgrB_mut*; 4 – 25 *mgrB_mut*; 5 – 26 *mgrB_mut*; 6 – 27 *mgrB*; 7 – 28 *mgrB_mut*; 8 – 29 *mgrB_mut*; 9 – 30 *mgrB_mut*.

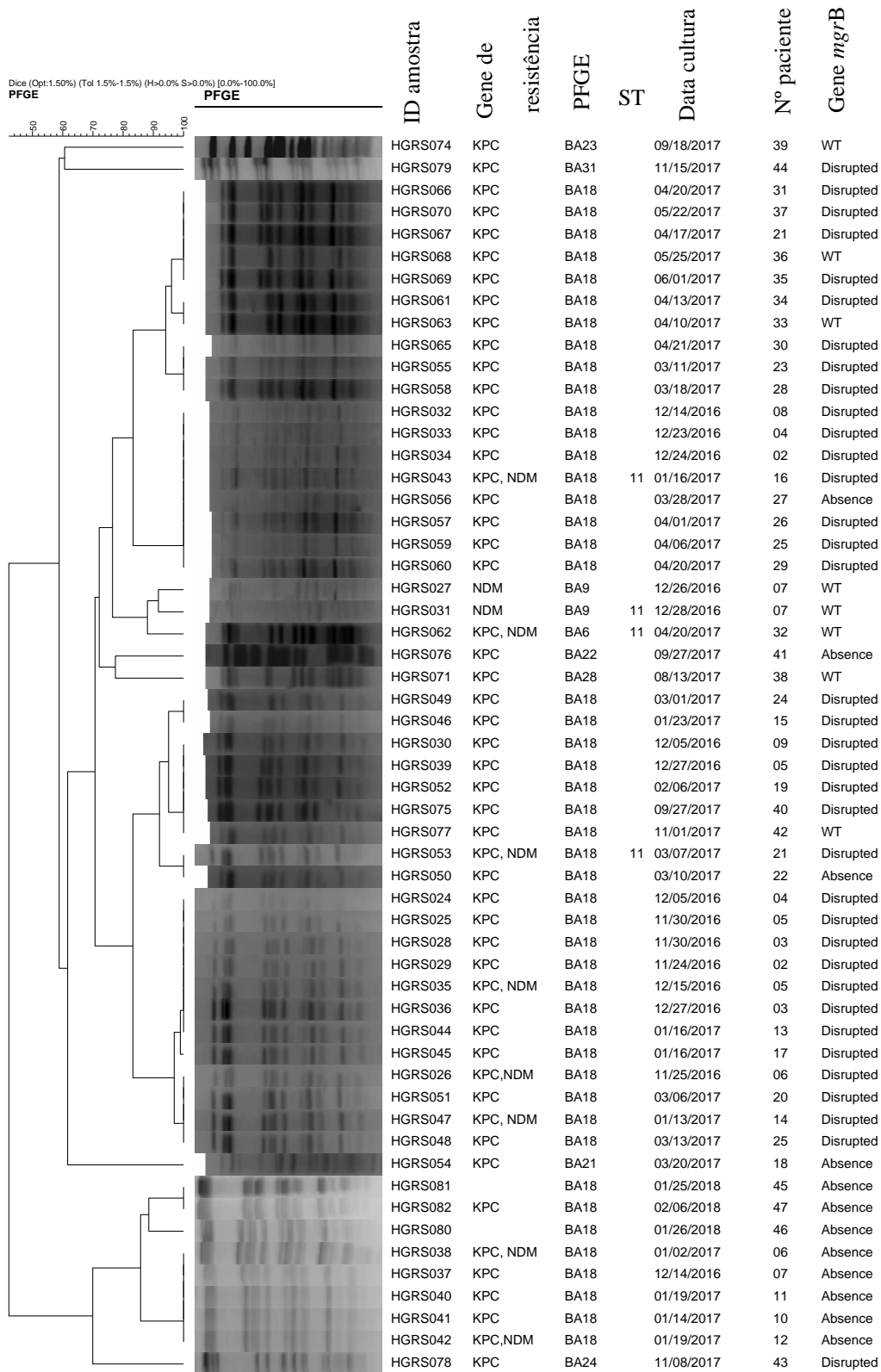


Figura 9 Perfil de PFGE por restrição com *Xba*I de *Klebsiella pneumoniae* isolados em Salvador, Bahia (n=56).

A técnica de PFGE foi aplicada para análise do perfil clonal dos 56 isolados sendo detectado 9 perfis de PFGE. O perfil de PFGE BA18 foi encontrado em 47 isolados. O perfil de PFGE BA9 foi detectado em 2 isolados do mesmo paciente e outros 7 perfis de PFGE (BA23, BA31, BA6, BA22, BA28, BA21 e BA24) foram detectados em apenas 1 cepa cada.

Utilizando o perfil de PFGE para avaliar pacientes que tiveram desfecho de óbito, dos 7 pacientes que apresentaram infecção e evoluíram para óbito, os isolados de 6 pacientes pertenciam ao PFGE BA18 e de 1 ao BA21. Avaliando os prontuários dos 8 pacientes de cujos os 9 isolados não pertenciam ao PFGE BA18, de 6 não foi possível encontrar o prontuário, e de 2 que foi possível avaliar, BA09 e BA21, ambos estavam internados na UTI geral quando a cultura com ColR-KPC foi coletada e haviam feito uso de polimixina previamente. O isolado BA21 foi detectado apenas 4 dias após a internação do paciente na UTI geral/hospital, mas havia relato de internação nos últimos 6 meses em UTI do mesmo hospital. Já o paciente do BA09 apresentou detecção após 45 dias de internação na UTI.

Avaliando os prontuários dos 7 pacientes, dos quais foi possível ter acesso ao prontuário e, que foram colonizados/infectados pelo perfil de PFGE BA18 em setores diferentes da UTI geral, foi possível identificar que 85,71% (n=6/7) realizou procedimento cirúrgico antes da identificação da cultura de ColR-KPC e a mesma proporção não utilizou polimixina previamente a cultura. Os setores onde esses pacientes tiveram a identificação dessa cepa foram: 4 na UTI da emergência e os outros 3 na UAVC, sala de emergência e clínica médica. O único paciente que não realizou procedimento cirúrgico foi o que esteve internado no UAVC, o qual não fez uso prévio de polimixinas. Nenhum desses pacientes apresentou relato de internação prévia em outras UTI nos últimos 6 meses. (Figuras 9 e 10)

O paciente 24, o único do PFGE BA28 identificado fora da UTI geral, não foi submetido a procedimento cirúrgico, foi internado no setor da UAVC devido a acidente vascular isquêmico cerebral e diagnosticado com pneumonia por ColR-KPC neste setor 11 dias após a internação. Os documentos do SCIH referiram que intervenções foram realizadas no setor da UAVC, após a detecção deste caso: isolamento do paciente na coorte geográfica de ColR-KPC, swab retal de todos os pacientes da UAVC semanalmente por 4 semanas e limpeza terminal de todo o setor de forma supervisionada

pela equipe do SCIH. Não foi detectado nenhum outro caso de ColR-KPC no setor, nem o local de cruzamento entre esses pacientes.

A técnica de MLST foi realizada em 4 cepas (duas do grupo BA18, uma do grupo BA09 e BA08) sendo identificado ST 11 em todas (Figura 9). Apesar de não ser objetivo do trabalho, após a verificação dos dados, foi optado por realizar o sequenciamento do isolado do paciente 28, por pertencer ao maior grupo do PFGE e ter alteração do PCR do gene *mgrB*. O sequenciamento evidenciou o gene *bla_{KPC-2}*, ST-11 (complexo clonal 258) e inserção do elemento IS903B na posição do gene *mgrB*, além de mutação (R256G) no *prmB*.

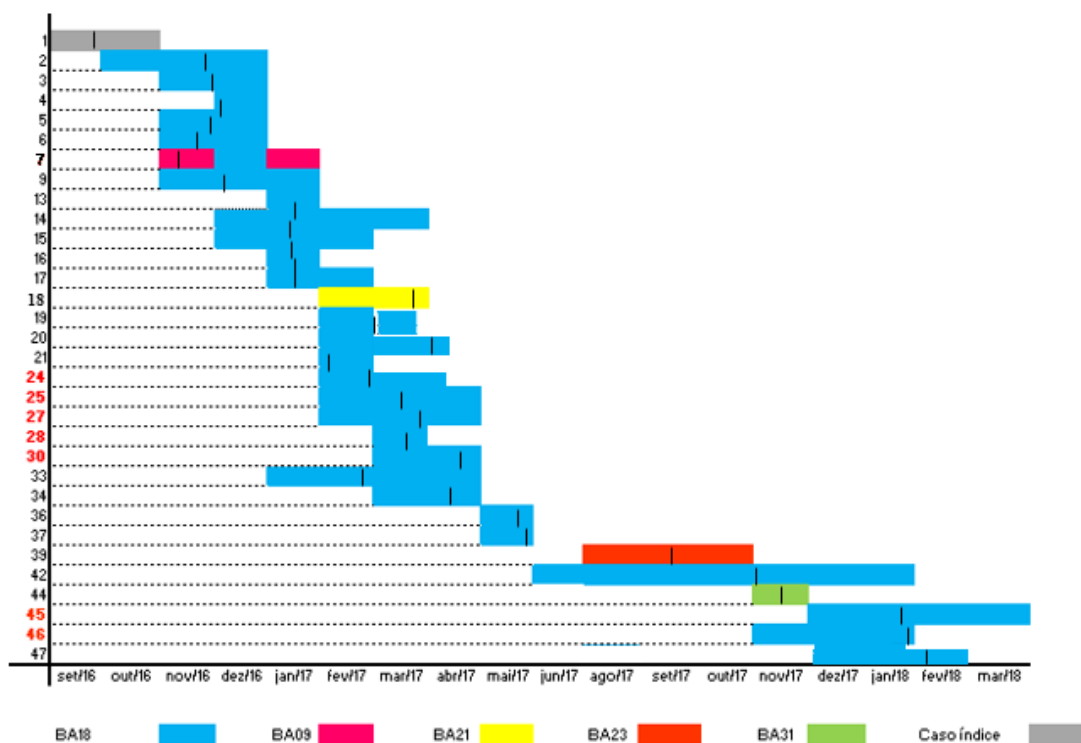


Figura 10 Distribuição dos 31 pacientes e do caso índice conforme o tempo de internação hospitalar, o perfil de PFGE e o momento de detecção do primeiro isolado com ColR-KPC no HGRS, Salvador-Bahia (n=32)

Os 31 pacientes que tiveram prontuários avaliados e o caso índice foram colocados no eixo Y do gráfico. Os números em preto do eixo Y sinalizam os pacientes que foram internados na UTI geral e em vermelho pacientes de outros setores do hospital (24: UAVC; 25: emergência; 27: enfermaria de clínica médica; 28: UTI emergência; 30: UTI emergência; 45: UTI emergência e 46: UTI: neurológica). O período de internação foi

colocado de forma mensal no eixo X. Os traços ao longo da barra indicam o momento de identificação da ColR-KPC. A cor das barras indica o perfil do PFGE.

5.6 INTERVENÇÕES DO SERVIÇO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR

Diversas intervenções foram realizadas pela equipe do SCIH no setor da UTI geral, objetivando reduzir a ocorrência de novos casos: substituição das cortinas por biombos higienizáveis para separar os leitos, treinamento da equipe de higienização do hospital e intensificação da limpeza do setor de forma supervisionada pelo SCIH, investigação dos casos de colonização semanalmente com swab retal, separação de técnicos de enfermagem do setor para pacientes colonizados/infectados por bactérias multirresistentes e não colonizados, reestruturação da unidade com pintura da parede e retirada de dispositivos enferrujados ou danificados que dificultam a higienização, maior disponibilidade de álcool gel, retirada de adornos pelos profissionais de saúde e treinamento de higienização das mãos, entre outros.

O hospital não disponibilizava de cortinas extras para substituir as cortinas em uso para higienização, sendo detectado pelo SCIH que ficavam por semanas sem serem retiradas. Considerando que as cortinas nos leitos não possibilitam higienização adequada, foi optado pela retirada delas e substituição por biombos que pudessem ser higienizados diariamente. O momento de cada intervenção é especificado na Figura 12.

No período, o SCIH, observando o surgimento de casos de ColR-KPC fora da UTI geral e em pacientes cirúrgicos, realizou uma visita técnica no centro cirúrgico sendo observado não conformidades, tais como: estofados das mesas cirúrgicas danificados e higiene do ambiente inadequada. Uma higiene terminal de todo o centro cirúrgico supervisionada pela equipe do SCIH e manutenção dos estofados das mesas foram realizados.

A retirada de todos os colchões danificados do hospital e a criação da coorte geográfica de todos os casos de ColR-KPC na semi-intensiva foram medidas que impactaram muito no número de pacientes internados na UTI geral. No período, uma grande quantidade de colchões danificados com muita sujidade na espuma foi descartada,

entretanto, não havia quantidade suficiente para reposição, fato que tornou muitos leitos de diversos setores do hospital indisponíveis.(Figura 11)

Todos os pacientes da UTI geral recebiam alta apenas para a semi-intensiva, entretanto, devido ao elevado tempo de permanência no hospital desses pacientes, muitos não conseguiam receber alta da UTI geral para a semi-intensiva, pois não havia leitos disponíveis para a demanda dos casos. Essa medida impactou de forma progressiva no número de leitos disponíveis da UTI geral, se tornando crítico no mês de fevereiro, o que pode ter impactado na redução de novos casos detectados de ColR-KPC, já que poucos pacientes conseguiam internar no setor. O fato foi resolvido após a criação de mais uma coorte geográfica de ColR-KPC para pacientes de menor complexidade em uma enfermaria do hospital. Nas coortes, apenas pacientes com ColR-KPC eram internados (Figura 11).

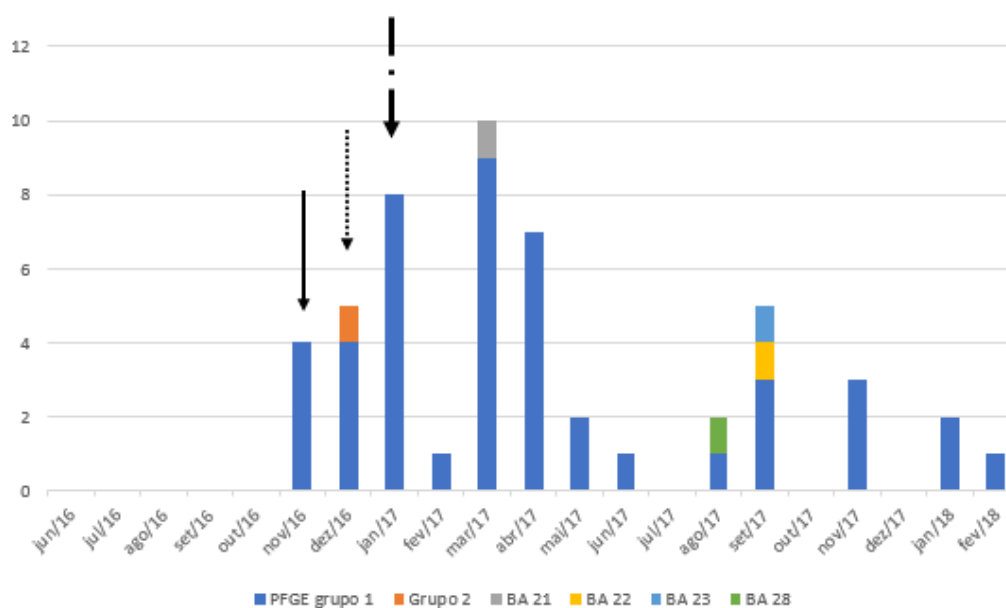


Figura 11 Distribuição temporal dos pacientes com ColR-KPC conforme o perfil do PFGE e pontos de intervenções realizados no HGRS, Salvador - Bahia (N=46)

Linha preta cheia: retirada de cortinas dos leitos, intensificação da limpeza do ambiente, maior disponibilidade de álcool gel para higienização das mãos, retirada de adornos dos profissionais de saúde, introdução do swab retal na admissão dos pacientes no setor e controle diário da prescrição de antimicrobianos.

Linha preta pontilhada: coorte funcional de funcionários para pacientes colonizados/infectados por ColR-KPC, intensificação da higiene de mãos e precaução de contato universal em todos os pacientes internados no setor e swab retal semanal em todos os pacientes internados no setor (além do swab retal e nasal de vigilância na admissão de todos os pacientes).

Linha preta tracejada com ponto: reestruturação física da unidade, retirada de colchões danificados, limpeza terminal por 2 vezes (por equipes diferentes de higienização) dos leitos de pacientes que tiveram alta ou óbito antes da internação de outro paciente.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta 56 casos de ColR-KPC provenientes de 46 pacientes internados em um hospital, durante o período de setembro/2016 a fevereiro/2018, cujo provável foco foi uma UTI com disseminação das cepas por diversos setores do hospital, a despeito das medidas de controle de infecção hospitalar. A análise molecular evidenciou que 83,92% (N=47/56) pertenciam a um mesmo perfil de PFGE sugerindo a ocorrência de um surto.

A alteração no PCR do gene *mgrB* foi detectada em 64,2% (n=39/56) dos isolados e a não detecção desse gene em 8,9% (n=5/56), justificando a resistência às polimixinas nessas cepas.(RODRIGUES et al., 2019) A polimixina não foi utilizada por 67,6% (n=21/31) dos pacientes e os isolados apresentaram predominantemente um mesmo aglomerado, o que sugere que a transmissão cruzada tenha sido a principal responsável pela disseminação. Um estudo semelhante realizado em São Paulo, sugeriu que os casos de ColR-KPC teriam sido consequência da pressão seletiva pelo aumento do uso de polimixinas e não pela transmissão horizontal, já que diversos aglomerados foram identificados no PFGE e a pesquisa dos genes *mcr-1* e 2 foi negativa (BOSZCZOWSKI et al., 2019).

A disseminação do perfil de PFGE BA18 em pacientes internados em diversos setores, fora da UTI geral, em que 85,71% deles não fizeram uso de polimixinas antes da detecção da ColR=KPC, reforçam a possibilidade de transmissão horizontal. As não conformidades detectadas no centro cirúrgico podem ter contribuído para que este local

fosse a fonte de contaminação ou algum profissional (técnicos de raio-X, profissionais do laboratório, da enfermagem, médicos, etc.) que trabalhasse na UTI e em outros setores de forma simultânea ou consecutiva. Foram observados profissionais da enfermagem da UTI geral que possuíam mais de um vínculo no hospital trabalhando em diferentes setores, em turnos consecutivos, o que poderia causar a transmissão das cepas através das mãos e roupas.

Em 2015 e 2016, mais de 70% das *Enterobacteriaceae* do setor da UTI geral do Hospital do estudo não apresentavam suscetibilidade aos carbapenêmicos. Em decorrência desse cenário, no primeiro semestre de 2016, a polimixina foi utilizada, conforme recomendação do SCIH do hospital, como droga-chave no tratamento de pacientes em sepse com suspeita ou confirmação de infecção por *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, muitas vezes associada a outras drogas, tais como: aminoglicosídeos, tigeciclina, fosfomicina e meropenem (em dose otimizada). O uso extensivo de polimixinas pode ter contribuído para o surgimento de cepas de ColR-KPC, mas não explica a disseminação do mesmo clone pelo PFGE em pacientes de diferentes setores, sem uso prévio de polimixina.

Um trabalho de Uberlândia/Minas Gerais, avaliou um surto de ColR-KPC em que o elevado consumo de carbapenêmicos e de colistina, a estrutura inadequada hospitalar e a baixa adesão às medidas de controle de infecção possam ter contribuído para o surgimento e disseminação das cepas (que tiveram um padrão monoclonal no PFGE) (ROSSI GONÇALVES et al., 2016a). Outro estudo que avaliou 58 isolados de ColR-KPC em um hospital italiano descreveu a dificuldade de controlar a disseminação da ColR-KPC, e sugeriu que a pressão seletiva com antibióticos e a disseminação horizontal possam ter sido responsáveis pelo surgimento e disseminação dos 3 clones identificados, embora não tenham investigado a presença dos genes *mcr-1* e 2 (MAMMINA et al., 2012).

A letalidade de 58,4% dos pacientes infectados por ColR-KPC do nosso estudo foi semelhante a de outro estudo de São Paulo, cuja letalidade geral e em até 30 dias foi 64% e 53%, respectivamente (BOSZCZOWSKI et al., 2019). Outro estudo realizado em Uberlândia/Minas Gerais demonstrou que a letalidade dos pacientes infectados por cepas ColR-KPC foi de 44,4% (ROSSI GONÇALVES et al., 2016b). Em um estudo italiano, a letalidade por ColR-KPC foi de 40,6% e a análise multivariada demonstrou que a resistência a colistina foi um fator de risco independente para mortalidade (CAPONE et

al., 2013b). Não foi encontrado trabalhos da região nordeste do Brasil de letalidade relacionado com essa cepa.

O sequenciamento da cepa do paciente 28 evidenciou o gene bla_{KPC-2} , ST-11 do CC258. A ST-11 é o ST mais comumente encontrada em algumas regiões do mundo, como por exemplo, na China, e parece apresentar vantagens em relação a tempo de sobrevivência em superfícies de unidades de terapia intensiva em comparação com outras ST de *K. pneumoniae*. Essa possível característica talvez possa contribuir para sua ampla disseminação.(LIU et al., 2020) A *K. pneumoniae* produtora de KPC ST-258, que é um híbrido do ST-442 e do ST11, e suas variantes se espalharam nas Américas e na Europa, principalmente carregando o gene bla_{KPC-2} (CHEN et al., 2014b; DA SILVA et al., 2020; CHEN et al., 2014b).

No presente estudo, a carbapenemase KPC foi detectada em 92,8% (n=52) e a NDM em 16% (n=9) dos isolados. Apesar do aumento de carbapenemase do tipo NDM no Brasil, a KPC parece ainda ser a carbapenemase mais prevalente em *K. pneumoniae* no Brasil, principalmente a KPC-2 (BRAUN et al., 2018). Um trabalho realizado em um hospital de Recife analisou 40 cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e verificou que os genes bla_{KPC} e bla_{NDM} foram detectados em 24 (88.8%) e 16 (59.2%) dos isolados, respectivamente (DE OLIVEIRA et al., 2020). *Biberg et al* avaliaram 360 isolados de *Klebsiella spp* de um hospital no Mato Grosso do Sul em que 44 (12,2%) eram resistentes a carbapenêmicos, sendo identificado o gene bla_{KPC-2} em 36 (BIBERG et al., 2015). Um estudo brasileiro publicado em 2020 que avaliou 118 isolados do LACEN-Distrito Federal com resistência a carbapenêmicos, o bla_{KPC} e bla_{NDM} , foram detectados em 59,3% (n = 70) e 38,9% (n = 46) das cepas, respectivamente (SILVA et al., 2021).

Aires et al avaliaram 126 amostras de *K. pneumoniae* provenientes de swabs retais de vigilância de diferentes estados brasileiros (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pernambuco e Distrito Federal) coletados entre 2009 e 2013. Oito dos 10 isolados resistentes a polimixina continham bla_{KPC-2} e pertenciam ao complexo clonal 258 (CC258)(AIRES et al., 2016). Em São Paulo, *Boszcowski et al* avaliaram 28 pacientes com infecção por ColR-KPC provenientes dos Hospitais das Clínicas em que 26 (93%) apresentavam bla_{KPC-2} , sendo 1 com co-expressão com o bla_{KNDM-1} . As outras duas cepas apresentavam NDM. Assim como no nosso estudo, não foi detectado bla_{OXA-48} em nenhum caso (BOSZCZOWSKI et al., 2019).

Em um isolado do nosso estudo foi detectada a carbapenemases do tipo GES. As enzimas do tipo GES pertencem às β -lactamases codificadas por plasmídeo da classe Ambler A. Embora as enzimas GES geralmente exibam propriedades de β -lactamases de espectro estendido, alterações em seu local ativo aumentam sua atividade, podendo conferir a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos (AKINCI; VAHABOGLU, 2010). Em 2010, quando foi publicado o primeiro relato no Brasil de GES-5 em *K. pneumoniae*, apenas um caso havia sido detectado no mundo, na Coreia (PICÃO et al., 2010). Na região nordeste, em Recife/Pernambuco, apenas foi identificada uma publicação sobre a detecção de *bla*GES (GES-1 e GES-11) em *P. aeruginosa*, sem relato em *Klebsiella pneumoniae* (SILVA JÚNIOR et al., 2017).

Após a conclusão do nosso trabalho, foi optado por fazer sequenciamento de uma cepa das cepas pertencentes ao maior grupo de PFGE sendo evidenciado inserção do elemento IS903B na posição do gene *mgrB*. As alterações no *mgrB* parecem ser as principais responsáveis pela resistência as polimixinas no Brasil e no mundo (PITT et al., 2018)(POIREL et al., 2015; BRAUN et al., 2018). Um estudo realizado em dois hospitais no Mato Grosso do Sul que descreveu a base genética dos mecanismos de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*, identificou diversas mutações e inativações do gene *mgrB*. Dentre as 30 cepas avaliadas por sequenciamento, 22 apresentaram interrupções mediadas por IS na sequência de codificação do *mgrB*, tais como: IS903, IS5-like, ISKpn13, ISEcp1 e ISKpn18. A inserção IS903 foi a mais comum do estudo (DA SILVA et al., 2020).

Um estudo brasileiro publicado em 2020 que avaliou 118 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos do LACEN-Distrito Federal, verificou que a resistência à polimixina por microdiluição em caldo foi detectada em 78 (66,1%). As reações de PCR para detecção do *mcr-1*, 2, 3 e 4 foram realizadas sendo negativo para todas exceto em três (3,8%) cepas em que o *mcr-1* foi detectado. Todas as cepas *mcr-1* negativas foram avaliadas em relação a inserção de elementos no gene *mgrB*. Em 56% das 118 cepas foi detectado amplicons no gene *mgrB*. Sequências da família IS5 predominantemente (76,1% - 32/42) interromperam o *mgrB*, já IS903 e IS903B respondendo por 33,3% (14/42) e 26,1% (11/42) dos detectados (SILVA et al., 2021). Outro estudo que avaliou 10 isolados de diversos estados brasileiros, evidenciou em todos interrupção no *mgrB* por sequências de inserção IS903B, IS5, IS102, ISKpn26 (família IS5), e IS10L (família IS4) ou mutações (AIRES et al., 2016).

Um estudo realizado em um hospital no Iran avaliou 20 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina, obtidos entre 2015 e 2017. Em 75% dos casos, o gene *mgrB* apresentava alterações na região promotora ou codificadora. Dois tipos de alterações no *mgrB* foram observados nesse estudo iraniano: término prematuro devido a mutações sem sentido e inserção de elementos (IS). Essas alterações resultaram na produção de proteínas truncadas e provavelmente não funcionais de 29 e 38 aminoácidos, em vez de uma proteína de tipo selvagem com 47 aminoácidos. Os elementos IS envolvidos na interrupção do *mgrB* pertenciam a famílias semelhantes a IS1 (768 pb) e semelhantes a IS5 (1.056 pb) que se inseriram em diferentes posições do gene *mgrB*. A presença dos genes plasmidiais *mcr-1*, 2, 3, e 4 foram investigados, porém sem identificação em nenhum isolado. Assim como no nosso estudo, esse trabalho iraniano sugeriu que as alterações do gene *mgrB* desempenharam um papel importante na resistência às polimixinas nas *K. pneumoniae* (HAEILI et al., 2017).

Em relação a resistência às polimixinas, o nosso estudo apenas investigou o gene cromossomal *mgrB* e a presença do gene plasmidial *mcr-1*, não sendo pesquisado alterações em outros genes plasmidiais *mcr* e cromossomais, tais como: alterações no sistema de 2 componentes *pmrA/pmrB* e *phoP/phoQ*. Entretanto, na cepa sequenciada, além da inserção do elemento IS903B no *mgrB* também foi detectada mutação (R256G) no *prmB*. Pitt et al detectaram essa mutação R256G, tanto em ColR-KPC quanto em *K. pneumoniae* sensível a colistina, sugerindo que não seja determinante na resistência a colistina (PITT et al., 2018). Poucos trabalhos descrevem mutações no *pmrA/pmrB*. Em São Paulo, Boszczowski et al, avaliaram 28 pacientes com infecção por ColR-KPC provenientes dos Hospitais das Clínicas. O sequenciamento evidenciou mutações cromossomais nos genes *pmrA*, *pmrB* e *mgrB* (BOSZCZOWSKI et al., 2019).

Não foi detectado nenhum *mcr-1* em nossos isolados. A detecção de genes *mcr* em *K. pneumoniae* parece ser esporádica no Brasil, pois poucos estudos relataram o isolamento de cepas de Kp-RC positivas para *mcr-1* até o momento (DALMOLIN et al., 2018)(AIRES et al., 2017b)(HIGASHINO et al., 2019b).

A CIM90, a concentração que inibiu 90% das cepas do nosso estudo, foi > 16 µg/ml, sendo que mais da metade dos isolados (55%) tiveram a CIM de 256 µg/ml (Tabela 8). Em um estudo iraniano, em que a mutação do gene *mgrB* também foi a principal responsável pela resistência às polimixinas, todas as cepas que identificaram alterações

na sequência do gene *mgrB* também apresentaram CIM elevadas, sendo todas >64 µg/ml (HAEILI et al., 2017). Outros estudos também descreveram CIM elevada em isolados com alteração no gene *mgrB* (AIRES et al., 2016)(RODRIGUES et al., 2019). A ocorrência simultânea do gene *mgrB* inativado e do *mcr-1* em *K. pneumoniae* foi verificada em uma publicação e o *mcr-1* pareceu não ter efeito sobre a CIM para polimixina, quando coexiste com gene *mgrB* inativado (ZHANG et al., 2018).

Apesar do nosso trabalho não apresentar metodologia para avaliar o desempenho do teste da gota na determinação da sensibilidade a colistina, observamos uma boa correlação deste em comparação a microdiluição em caldo, sendo talvez uma opção melhor para detectar o fenômeno da heterorresistência, já que o teste da gota evidenciou resistência em um isolado que pelo método BMD ainda era sensível, mas que a cepa possuía ausência do gene *mgrB*. Mais trabalhos são necessários para avaliar seu uso em outras BGN e em um maior número de isolados. O teste da gota poderia ser uma alternativa mais econômica e de maior aplicabilidade para centros de saúde e laboratórios que não possuem a microdiluição em caldo, principalmente em regiões com recursos financeiros limitados, caso o seu uso fosse validado.

Uma das limitações do estudo foi a utilização do Vitek2® na triagem que não é recomendado para avaliar a sensibilidade às polimixinas devido a elevada falsa sensibilidade. Sendo assim, muitas cepas podem ter sido falsamente identificadas como sensíveis e não terem entrado no estudo, subestimando o número de casos. Outros fatores podem ter reduzido o número de cepas no estudo: amostras extraviadas, a não coleta de culturas ou a coleta tardia. Nosso estudo também não teve acesso ao número de pacientes internados por mês nos setores, impossibilitando avaliarmos estatisticamente se as medidas de controle de infecção hospital para redução dos casos de ColR-KPC foram efetivas. Outra limitação relevante foi o fato de o hospital não ter sistema eletrônico, o que dificultou a coleta de dados, pois muitos prontuários não eram encontrados ou estavam incompletos, impedindo que outros pacientes fossem categorizados como infectados.

7 CONCLUSÃO

- O uso de dispositivos invasivos foi bastante frequente, tanto em pacientes colonizados como infectados por ColR-KPC.
- A infecção por ColR-KPC apresentou letalidade de 58,4%, sendo compatível com a literatura.
- A CIM90 para colistina foi $> 16 \mu\text{g/ml}$, sendo que mais da metade dos isolados (55%) tiveram a CIM de $256 \mu\text{g/ml}$.
- O teste da gota apresentou boa correlação com a BMD para avaliar a sensibilidade a colistina em *K. pneumoniae* e, talvez, seja um método interessante para verificar o fenômeno da heterorresistência. Outros estudos precisam ser realizados para verificar o desempenho do teste da gota em outros microorganismos e em um número maior de isolados.
- Apenas a amicacina apresentou sensibilidade para mais de 90% das cepas, sendo a única opção terapêutica efetiva, embora a sensibilidade da ceftazidima-avibactam não tenha sido avaliada.
- O *bla*_{KPC} foi detectado em 92,8% dos isolados, sendo a carbapenemase mais frequente, e o *bla*_{NDM} em 16% (n=9). Uma carbapenemase pouco frequente, GES, foi encontrada juntamente com a KPC.
- Embora outros genes cromossomiais relacionados com a resistência às polimixinas e outros *mcr* não tenham sido avaliados, as alterações no gene *mgrB* foram encontradas em 73,1% e não foi detectado *mcr-1* em nenhum dos isolados, sugerindo que as alterações no gene *mgrB* sejam os principais mecanismos relacionados com a resistência às polimixinas neste estudo.
- A análise do PFGE evidenciou um perfil monoclonal em quase todos os isolados sugerindo a ocorrência de um surto. A transmissão horizontal parece ter contribuído para a disseminação da ColR-KPC pelos diversos setores do hospital a despeito das medidas de controle de infecção hospitalar, já que os casos foram detectados em muitos pacientes que não haviam feito uso de polimixinas e as cepas apresentavam semelhança no perfil do PFGE.
- Medidas de controle de infecção hospitalar devem ser implementadas para investigação e controle de surtos de ColR-KPC. A maior parte dos casos detectados em nosso estudo, foram em swab retal demonstrando a importância da

vigilância ativa para detecção de bactérias multirresistentes. Não-conformidades estruturais e de processos, talvez contribuam com a disseminação da ColR-KPC no ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS

- AH, Y. M.; KIM, A. J.; LEE, J. Y. **Colistin resistance in Klebsiella pneumoniae** *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V. jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857914000880>>. Acesso em: 16 fev. 2020
- AIRES, C. A. M. *et al.* mgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6969–6972, 1 nov. 2016.
- AIRES, C. A. M. *et al.* Multiclonal expansion of *klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 1 abr. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, 1 jul. 2017b.
- AKINCI, E.; VAHABOGLU, H. **Minor extended-spectrum -lactamases** *Expert Review of Anti-Infective Therapy* *Expert Rev Anti Infect Ther*, , nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21073290/>>. Acesso em: 16 fev. 2021
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4077–8, ago. 2013.
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* Carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* harbouring blaKPC-2 in Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 4, p. 369–70, out. 2014.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde e Resistência Microbiana nº22 da ANVISA – Avaliação dos Indicadores Nacionais de Infecções**

Relacionadas à Assistência à Saúde. Disponível em:

<<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoicjQ5ZDhjZmEtNDdhOC00MDk3LWFhNDEtNzg0MmE4MmE2MjhhIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9&pageName=ReportSectionac5c0437dbe709793b4b>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

AREND, L. N. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of 942 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 4, p. 316–8, abr. 2015.

BAGLEY, S. T. **Habitat association of Klebsiella species** *Infection Control Infect Control*, , 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3882590/>>. Acesso em: 12 jun. 2021

BARBERINO, M. G. *et al.* Isolation of bla_{NDM}-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 47–50, 1 jan. 2018.

BARON, S. *et al.* Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, dez. 2016a.

BARON, S. *et al.* Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 1 dez. 2016b.

BENEDICT, R. G.; LANGLYKKE, A. F. Antibiotic activity of Bacillus polymyxa. **Journal of bacteriology**, v. 54, n. 1, p. 24, 1 jul. 1947.

BERGEN, P. J. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of “old” polymyxins: What is new? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 213–223, nov. 2012.

BIBERG, C. A. *et al.* KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 501–504, 26 jun. 2015.

BOGAERTS, P. *et al.* GES extended-spectrum β -lactamases in Acinetobacter

baumannii isolates in Belgium. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4872–8, nov. 2010.

BOSZCZOWSKI, I. *et al.* Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, 2019.

BOUCHER, H. W. *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1–12, jan. 2009.

BRATU, S. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 128–32, jul. 2005.

BRAUN, G. *et al.* Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 522–527, 1 mar. 2018.

BRCast. **BR Cast**. Disponível em: <<http://brcast.org.br/>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. **A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure** **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** American Society for Microbiology, , 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7574506/>>. Acesso em: 29 jun. 2021

CANNATELLI, A. *et al.* In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5521–5526, nov. 2013.

CAPONE, A. *et al.* High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, 2013a.

CAPONE, A. *et al.* High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. E23–E30, 1 jan. 2013b.

- CARATTOLI, A. *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 31, 3 ago. 2017.
- CARVALHO-ASSEF, A. P. D. ALINCOUR. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, dez. 2013.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Meropenem-vaborbactam tested against contemporary Gram-negative isolates collected worldwide during 2014, including Carbapenem-resistant, KPC-producing, multidrug-resistant, and extensively drug-resistant enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, 1 set. 2017.
- CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Carbapenem-Resistant Klebsiella | A.R. & Patient Safety Portal**. Disponível em: <<https://arpsp.cdc.gov/profile/antibiotic-resistance/carbapenem-resistant-emklebsiellaem>>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- CHEN, L. *et al.* Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. **mBio**, v. 5, n. 3, 24 jun. 2014a.
- CHEN, L. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2014b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25304194/>>. Acesso em: 16 fev. 2021
- CHENG, Y. H. *et al.* Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2909–2913, 1 maio 2015.
- CLINKER, K. *et al.* **I P A C C A N A D Members**. [s.l: s.n.].
- CLSI. **M100Ed31 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition**. Disponível em: <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- COMUNICADO DE RISCO N 01 2016 GVIMS GGTES ANVISA - Busca - Anvisa**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-01-2016-gvims-ggtes-anvisa/view>>. Acesso em: 4 jan. 2020.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **The Lancet. Infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 381–93, maio 2011.

D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF, A. P. *et al.* Escherichia coli producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 3, p. 337–8, nov. 2010.

DA COSTA GUIMARÃES, A. C. *et al.* Clonal spread of carbapenem-resistant Serratia marcescens isolates sharing an IncK plasmid containing bla_{KPC-2}. **International journal of antimicrobial agents**, v. 42, n. 4, p. 369–70, out. 2013.

DA SILVA, I. R. *et al.* Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 394–399, 1 abr. 2019.

DA SILVA, K. E. *et al.* Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant Klebsiella pneumoniae strains isolated from Brazil with multiple mgrB gene mutations. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 7, 1 out. 2020.

DAIKOS, G. L. *et al.* Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes and the Role of Carbapenems. 2014.

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**, v. 90, n. 2, p. 132–133, 1 fev. 2018.

DAO, T. T. *et al.* Klebsiella pneumoniae oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 25 mar. 2014.

DAVIDO, B. *et al.* Ceftazidime-avibactam and aztreonam, an interesting strategy to overcome β -Lactam resistance conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae and pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** American Society for Microbiology, , 1 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28630191/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

DE OLIVEIRA, É. M. *et al.* High plasmid variability, and the presence of incfIB, incQ, inca/c, inchi1b, and incl/m in clinical isolates of klebsiella pneumoniae with bla_{KPC} and blandm from patients at a public hospital in brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de**

Medicina Tropical, v. 53, p. 1–8, 2020.

DELGADO VALVERDE, M. *et al.* **Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae** *Therapeutic Advances in Infectious*

Disease *Ther Adv Infect Dis*, , 2013. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25165544/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

DERIS, Z. Z. *et al.* A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. **Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 2, p. 147–151, fev. 2014.

DONG, N. *et al.* Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella Pneumoniae* from China. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 2, 1 fev. 2018.

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.

EFFAH, C. Y. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health.

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials BioMed Central Ltd., , 9 jan.

2020. Disponível em: <[https://ann-](https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-019-0343-8)

[clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-019-0343-8](https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-019-0343-8)>. Acesso em: 15 fev. 2020

EHMANN, D. E. *et al.* Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 29, p. 11663–11668, 17 jul. 2012.

ESCANDÓN-VARGAS, K. *et al.* The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Review of Anti-Infective Therapy** Taylor and Francis Ltd, , 4 mar. 2017.

EUCAST. **EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics**. Disponível em:

<https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/>. Acesso em: 30 jun. 2021.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases** *Clin Infect Dis*, , 1 maio 2005. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15825037/>>. Acesso em: 12 jun. 2021

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I.; MATTHAIIOU, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4–5, p. 132–138, ago. 2010.

FALCONE, M. *et al.* Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo- β -lactamase-Producing Enterobacterales. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 11, p. 1871–1878, 1 jun. 2021.

FERNANDES, M. R. *et al.* First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the mcr-1 gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415–6417, 1 out. 2016.

FRIEDLAENDER, C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. **Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin**, v. 87, n. 2, p. 319–324, fev. 1882.

GALLARDO-GODOY, A. *et al.* Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 1068–1077, 11 fev. 2016.

GRUNDMANN, H. *et al.* **Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://doc.rero.ch>>. Acesso em: 19 jun. 2021.

HAEILI, M. *et al.* MgrB alterations mediate colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 18 dez. 2017.

H AidAR, G. *et al.* Identifying Spectra of Activity and Therapeutic Niches for Ceftazidime-Avibactam and Imipenem-Relebactam against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, set. 2017.

HIGASHINO, H. R. *et al.* Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit Bone Marrow Transplantation. **Nature Publishing Group**, 1 jul. 2019a. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41409-018-0416-x>>. Acesso em: 17 fev. 2020

HIGASHINO, H. R. *et al.* Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC

and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit Bone Marrow Transplantation. **Nature Publishing Group**, 1 jul. 2019b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504905/>>. Acesso em: 11 fev. 2021.

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

HRABÁK, J. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 45, 2013.

IAGG. Interagência de Coordenação do Grupo de Resistência Antimicrobiana. **Não há tempo a perder: acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos**. Nações Unidas. Abril 2019. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf?ua=1>. Acesso em: 18 jan. 2020.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 5, p. 526–535, 1 maio 2017.

JOUY, E. *et al.* Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Microbiological Methods**, v. 132, p. 125–127, 1 jan. 2017.

KARAIKOS, I. *et al.* Colistin: still a lifesaver for the 21st century? **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, 2017.

KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E. I.; GIKAS, A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**, v. 1, p. 3, 2020.

KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E. I.; GIKAS, A. **Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems** *Infection* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32875545/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

KARLOWSKY, J. A. *et al.* In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Clinical Isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Collected in Latin American Countries: Results from the INFORM global surveillance program, 2012 to 2015. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30670424/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Global Dissemination of bla_{KPC} into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4490–500, 2016.

LANDMAN, D.; SALAMERA, J.; QUALE, J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for enterobacter cloacae and enterobacter aerogenes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4106–4111, dez. 2013.

LI, J. *et al.* Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Agents Elsevier B.V.**, , 2005.

LI, J. *et al.* **Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infectious Diseases**, set. 2006.

LIU, Y. *et al.* Enhanced survival of ST-11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Cambridge University Press, , 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32216853/>>. Acesso em: 29 jun. 2021

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, 1 fev. 2016.

LIU, Z. *et al.* Identification and characterization of NDM-1-producing hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* in China. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 39, n. 2, p. 167–175, mar. 2019.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MAMMINA, C. *et al.* Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011.

Eurosurveillance, v. 17, n. 33, p. 20248, 16 ago. 2012.

MIGLIORINI, L. B. *et al.* Prevalence of bla_{KPC-2}, bla_{KPC-3} and bla_{KPC-30}—carrying plasmids in *klebsiella pneumoniae* isolated in a brazilian hospital. **Pathogens**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2021.

MONTEIRO, J. *et al.* A major monoclonal hospital outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 and the first report of ST2570 in Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology** Cambridge University Press, , 1 abr. 2019.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30791966/>>. Acesso em: 29 jun. 2021

MORRILL, H. J. *et al.* Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, 1 abr. 2015.

MUELLER, L. *et al.* Phenotypic, biochemical, and genetic analysis of KPC-41, a KPC-3 variant conferring resistance to ceftazidime-avibactam and exhibiting reduced carbapenemase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, 2019.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Microbiology and Infection** , v. 14 Suppl 1, p. 42–52, jan. 2008.

NANG, S. C.; LI, J.; VELKOV, T. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. **Critical Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltd, , 4 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31122100/>>. Acesso em: 30 jun. 2021

NATION, R. L.; VELKOV, T.; LI, J. **Colistin and polymyxin B: Peas in a pod, or chalk and cheese?** **Clinical Infectious Diseases** Oxford University Press, , 1 jul. 2014.

NAVA, R. G. *et al.* New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the bla_{NDM-1} -encoding gene in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 101–103, 1 fev. 2019.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS**

Microbiology ReviewsOxford University Press, , 1 maio 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1093/femsre/fux013>>. Acesso em: 15 fev. 2020

NO TIME TO WAIT: SECURING THE FUTURE FROM DRUG-RESISTANT INFECTIONS REPORT TO THE SECRETARY-GENERAL OF THE UNITED NATIONS. . [2019]. Disponível no site: <https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**Lancet Infect Dis, , abr. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19324295/>>. Acesso em: 29 jun. 2021

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. **Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria***Frontiers in Microbiology*, Frontiers Media S.A., 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, set. 2016.

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, jun. 2009.

PERDIGÃO NETO, L. V. *et al.* Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil. **Infection**, v. 47, n. 4, p. 661–664, 1 ago. 2019.

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, 1 ago. 2015a.

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, 1 ago. 2015b.

PETROSILLO, N. *et al.* Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: The

- state of the artExpert Review of Anti-Infective Therapy. **Expert Review Anti Infectious Therapy**, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23409822/>>. Acesso em: 19 jun. 2021
- PICÃO, R. C. *et al.* Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 796–7, abr. 2010.
- PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**American Society for Microbiology, , 1 out. 2015a. Disponível em: </pmc/articles/PMC4576115/>. Acesso em: 25 mar. 2021
- PITT, M. E. *et al.* Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 3, 1 mar. 2018.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**American Society for Microbiology, , 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9767057/>>. Acesso em: 9 jun. 2021
- POIREL, L. *et al.* Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**Oxford University Press, , 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21393189/>>. Acesso em: 29 jun. 2021
- POIREL, L. *et al.* The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 75–80, 1 jan. 2015.
- POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**American Society for Microbiology, , 1 abr. 2017.
- PULZOVA, L.; NAVRATILOVA, L.; COMOR, L. Alterations in Outer Membrane Permeability Favor Drug-Resistant Phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 4, p. 413–420, 1 jun. 2017.
- QI, Y. *et al.* ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in

- China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 307–312, fev. 2011.
- RARO, O. H. F. *et al.* Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring bla_{KPC-2} or bla_{NDM-1}. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 15 jul. 2020.
- ROCK, C. *et al.* Frequency of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)–Producing and Non-KPC-Producing *Klebsiella* Species Contamination of Healthcare Workers and the Environment . **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 426–429, abr. 2014.
- RODRIGUES, A. C. S. *et al.* Non-clonal occurrence of pmrb mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 4, 1 abr. 2019.
- RODRÍGUEZ-BAÑO, J. *et al.* Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, ampC-, and carbapenemase-producing enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews** American Society for Microbiology, , 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29444952/>>. Acesso em: 19 jun. 2021
- ROSSI GONÇALVES, I. *et al.* Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 322–329, 2016a.
- ROSSI GONÇALVES, I. *et al.* Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 322–329, 1 dez. 2016b.
- SABINO, S. *et al.* A Cohort Study of the Impact of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections on Mortality of Patients Presenting with Sepsis. **mSphere**, v. 4, n. 2, 2019.
- SATLIN, M. J. *et al.* Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5893–5899, dez. 2011.
- SAVOV, E. *et al.* NDM-1 Hazard in the Balkan States: Evidence of the First Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. **Microbial Drug Resistance**,

v. 24, n. 3, p. 253–259, 1 abr. 2018.

SCAVUZZI, A. M. L. *et al.* Emergence of bla_{NDM-1} associated with the aac(6')-ib-cr, acrB, cps, and mrkD genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SHAW, E. *et al.* Clinical outcomes after combination treatment with ceftazidime/avibactam and aztreonam for NDM-1/OXA-48/ CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 1104–1106, 1 abr. 2018.

SHIELDS, R. K. *et al.* Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne bla_{KPC-3} mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, 1 mar. 2017.

SILVA, D. M. DA *et al.* Insertion sequences disrupting mgrB in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 53–57, 1 mar. 2021.

SILVA JÚNIOR, V. V. DA *et al.* Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring bla_{GES-1} and bla_{GES-11} in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764–768, 2017.

STAHLHUT, S. G. *et al.* Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 350–359, jul. 2012.

STORR, J. *et al.* Core components for effective infection prevention and control programmes: New WHO evidence-based recommendations. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, 10 jan. 2017.

SUETENS, C. *et al.* Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: Results from two european point prevalence surveys, 2016 to 2017. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 46, p. 1800516, 15 nov. 2018.

TAGGAR, G. *et al.* **Molecular epidemiology of carbapenemases in**

enterobacteriales from humans, animals, food and the

environmentAntibioticsMDPI AG, , 1 out. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066205/>>. Acesso em: 29 jun. 2021

TOLEMAN, M. A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673–9, nov. 2002.

TSUJI, B. T. *et al.* International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). **Pharmacotherapy**, v. 39, n. 1, p. 10–39, 1 jan. 2019.

TUMBARELLO, M. *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 7, p. 943–950, 1 out. 2012.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. 2012a.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682–707, out. 2012b.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682–707, out. 2012c.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24890393/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

VAN DUIN, D. *et al.* Colistin Versus Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Infectious**

Diseases, v. 66, n. 2, p. 163–171, 15 jan. 2018.

VAN DUIN, D.; BONOMO, R. A. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. **Clinical infectious diseases**, University Press, , 15 jul. 2016.

VAN DUIN, D.; DOI, Y. Outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae: Are we at the end of the road? **Journal of Clinical Microbiology** American Society for Microbiology, , 1 out. 2015.

VAN DUIN, D.; DOI, Y. **The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Virulence** Taylor and Francis Inc., , 19 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27593176/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

WEINSTEIN, R. A.; GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848–854, 15 set. 2005.

XAVIER, B. B. *et al.* Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 21, n. 27, 7 jul. 2016a.

XAVIER, B. B. *et al.* Identification of a novel plasmid-mediated colistinresistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, june 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 27, 7 jul. 2016b.

YANG, T.-Y. *et al.* Contributions of insertion sequences conferring colistin resistance in Klebsiella pneumoniae. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 105894, jan. 2020.

YANG, Y. Q. *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in Klebsiella pneumoniae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791–1795, 1 jul. 2018.

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

ZAVASCKI, A. P. *et al.* KPC-2-producing Enterobacter cloacae in two cities from

Southern Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, n. 3, p. 286–8, set. 2009.

ZHANG, H. *et al.* Mcr-1 Gene has no effect on colistin resistance when it coexists with inactivated mgrB gene in klebsiella pneumoniae. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1117–1120, 1 out. 2018.