

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Claudia Gladys Flores Sejas

**RELAÇÕES CLONAIS E GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES A CARBAPENEMICOS EM CULTURAS DE VIGILÂNCIA ATIVA NO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2020

Claudia Gladys Flores Sejas

RELAÇÕES CLONAIIS E GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES A CARBAPENEMICOS EM CULTURAS DE VIGILÂNCIA ATIVA NO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras: Célia Maria C. P. A. Romão  
Maysa Beatriz M. Clementino

Rio de Janeiro  
2020

Catálogo na Fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Flores, Claudia

Relações Clonais e Genótipos de Resistência de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes a Carbapenêmicos em Culturas de Vigilância Ativa no Rio de Janeiro. / Claudia Flores. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

65 f. : fig. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão. Co-orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Genótipos . 2 . *K. pneumoniae*. 3. Carbapenêmicos. I. Título.

Clonal Relationships and Resistance Genotypes of *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Carbapenems in Active Surveillance Cultures in Rio de Janeiro.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Claudia Gladys Flores Sejas

**RELAÇÕES CLONAIS E GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES A CARBAPENEMICOS EM CULTURAS DE VIGILÂNCIA ATIVA NO RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 23 de setembro de 2020

Banca Examinadora

Dr. Ivano Rafaelle Victorio de Filippis Capasso

Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Dra. Suely Aparecida Pimenta Fracalanza

Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedicado "in memorium" ao meu pai,  
Jaime e ao meu padrinho Jose Alberto e  
minha avó, Emma.

## AGRADECIMENTOS

Estes últimos anos de pesquisas foram uma jornada árdua de desafios, construções, conhecimentos e amadurecimento. Nesse período, aprendi que uma tese é a extensão da vida de um autor e nenhum empreendimento é realizado de forma fácil e sem esforço.

Segundo Albert Einstein “entre as dificuldades se esconde a oportunidade”. Dessa forma, agradeço a todos aqueles que contribuíram nesta longa jornada em diferentes níveis que culminaram na conclusão desta tese. Muito obrigada, por possibilitarem essa experiência enriquecedora e gratificante, de grande importância para meu crescimento como ser humano e profissional.

Em especial in *memorium* ao meu Pai Jaime, a avó e madrinha Emma e ao meu Padrinho José Alberto com seus conselhos, apoiando em tudo o que eu fazia desde a minha tenra idade. Sei que você está orgulhoso por esta conquista. Vocês sempre estarão no meu coração;

A minha mãe Gladys e amada irmã Ângela, por abraçarem cada um dos meus sonhos junto comigo, agradeço pelo apoio em cada decisão para que eu chegasse até aqui, além de toda força emocional, financeira e, principalmente, por todo o seu amor;

Ao meu esposo e amigo Vinicius por estar sempre ao meu lado, fazendo me crer que eu posso mais do que eu imagino. Agradeço a sua paciência, compreensão e ter acalmado o meu coração em todos os momentos;

Ao meu anjo protetor, Gaia;

A Joana Angélica onde iniciei meus primeiros passos na microbiologia como aluna de iniciação científica, na qual durante esse período pude compartilhar meus conhecimentos comigo.

Em especial as minhas orientadoras Dr<sup>as</sup> Maysa Mandetta e Célia Romão, que me deram a oportunidade desde o início desse projeto. Com o tempo aprendi a admirá-las e a respeitá-las. Obrigada pela paciência e apoio e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade e pelas críticas construtivas que influenciaram para o meu crescimento tanto pessoal e profissional.

Felizmente, não estive sozinha nessa árdua jornada, foram anos de luta e dedicação, e sempre recebi seu apoio em cada passo dessa tese. Obrigada Kayo Bianco pela paciência e gratidão por ter encontrado a verdadeira amizade em você!

Você não é só um amigo especial, mas sim um “irmão” que levarei comigo pós-defesa.

À amiga Joseane que esteve comigo desde longa data, compartilhando todas as alegrias e tristezas; apesar de ser um pouco ausente sei que posso contar com você.

A minha nova amiga Ana Paula Alves, levarei comigo para sempre obrigada!

Aos Drs. Ivano de Filippis, revisor da tese, e Antônio Eugênio obrigada pelo apoio de ambos durante este período.

A todos do departamento de microbiologia do INCQS, muito obrigada!

Aos amigos da equipe de Microbiologia do HFL: Ana Paula Silva, Eli Pinheiro e Henrique por serem compreensivos e agradeço pelo aprendizado diário.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

(Albert Einstein)



## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae*, uma das principais causas de infecções hospitalares é considerada patógeno oportunista, causador de vários tipos de infecções, principalmente em indivíduos hospitalizados. A incidência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KPRC) tem aumentado em todo o mundo, tornando-se uma ameaça à saúde pública. Desta forma, a busca de pacientes colonizados e/ou infectados através de cultura de vigilância ativa tem sido adotada como medida de prevenção e controle da disseminação da resistência. O objetivo desse estudo foi a determinação da diversidade clonal, associada aos perfis genéticos de resistência aos carbapenêmicos em isolados de culturas de vigilância ativa, de um hospital no Rio de Janeiro. Para isso, foi realizado: a) identificação de KPRC de pacientes admitidos em UTI; b) pesquisa de genes de resistência; c) estabelecimento de relações clonais pelo ERIC-PCR; d) avaliação da diversidade genética de *K. pneumoniae* carreando *bla<sub>NDM</sub>* por MLST. Dos 108 isolados identificados como *K. pneumoniae* pelo VITEK II, 103 foram confirmados pela PCR. Todos os isolados (103/103) foram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos testados, 94% (97/103) à ciprofloxacina, 84 % (87/103) à tigeciclina, 77% (79/103) à gentamicina, 62% (64/103) à amicacina e 35% (36/103) à colistina. O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi encontrado em 89% (92/103) dos isolados, *bla<sub>OXA-48</sub>* em 37% (38/103), *mcr-1* em 23% (18/103), *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* em 11% (11/103), *bla<sub>BKC</sub>* em apenas um isolado, *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* não foram encontrados e dois isolados foram negativos para todos os genes. O ERIC-PCR resultou em 83 perfis genéticos e 7 possíveis grupos clonais com percentual de identidade acima de 80%. Onze isolados *bla<sub>NDM</sub>* positivos foram agrupados em três perfis de resistência e quatro genótipos de resistência. A análise genotípica revelou 11 STs diferentes, sendo 8 novos e 3 descritos e dois complexos clonais (CC258 e CC15). No presente estudo, relatamos, pela primeira vez *K. pneumoniae* de culturas de vigilância carreando *bla<sub>NDM</sub>*, *KPC*, *OXA-48* e *VIM*, pertencentes ao ST515. Os dados aqui apresentados nos permitem concluir que a abordagem de cultura de vigilância ativa deve ser considerada essencial no combate da resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar.

Palavras Chave: relações clonais, cultura de vigilância, *K. pneumoniae*, resistência aos carbapenêmicos, genótipos de resistência.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae*, considered an opportunistic pathogen, is a major cause of infectious processes, especially in hospitalized individuals. The incidence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) has increased worldwide, becoming a threat to public health. Thus, the search for colonized and / or infected patients through active surveillance cultures has been adopted as a measure to prevent and control the spread of antibiotic resistance. The objective of this study was to determine the clonal diversity associated with the carbapenem-resistance genetic profiles in isolates from active surveillance cultures from a hospital in Rio de Janeiro. For this purpose, it was performed: a) identification of CRKP of patients admitted to the ICU; b) research of resistance genes; c) establishment of clonal relations by ERIC-PCR; d) evaluation of the genetic diversity of *K. pneumoniae* carrying *bla*<sub>NDM</sub> by MLST. Out of the 108 isolates identified as *K. pneumoniae* by VITEK II, 103 were confirmed by PCR. One hundred percent (103/103) were resistant to the all  $\beta$ -lactams tested, 94% (97/103) to ciprofloxacin, 84% (87/103) to tigecycline, 77% (79/103) to gentamicin, 62% (64 / 103) to amikacin and 35% (36/103) to colistin. The *bla*<sub>KPC</sub> gene was found in 89% (92/103) of the isolates, *bla*<sub>OXA-48</sub> in 37% (38/103), *mcr-1* in 23% (18/103), *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> in 11% (11/103), *bla*<sub>BKC</sub> in only one isolate, *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>SPM</sub> were not found and two isolates were negative for all genes. ERIC-PCR resulted in 83 genetic profiles and 7 possible clonal groups with an identity percentage above 80%. Eleven positive *bla*<sub>NDM</sub> isolates were grouped into three resistance profiles and four resistance genotypes. Genotypic analysis revealed 11 different STs, 8 new and 3 described and two clonal complexes (CC258 and CC15). In the present study, we reported for the first time *K. pneumoniae* from surveillance cultures carrying *bla*<sub>NDM</sub>, KPC, OXA-48 and VIM, belonging to ST515. The data presented here leads us to conclude that the active surveillance culture program is an essential approach in combating antimicrobial resistance.

Keywords: clonal relationships, surveillance culture, *K. pneumoniae*, resistance to carbapenems, resistance genotypes.

## LISTAS DE SIGLAS

ABRC	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BKC	Brazilian <i>Klebsiella</i> carbapenemase
BLAST	Basic Local alignment Search Tool
CCIH	Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
CRKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenêmicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dexoxinucleotídeo trifosfato
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ERC	Enterobacteriaceae resistentes a carbapenemicos
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR
ESBL	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
ExPEC	Infecções extra-intestinais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GIPEA	Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPCSL	Infecção de corrente sanguínea primária
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MBL	metalo- $\beta$ -lactamases
MDR	Multidroga Resistente
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MLST	Multilocus Sequence Typing
NDM	“New Delhi” Metallo- $\beta$ -lactamase
NHSN	National Healthcare Safety Network
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase

PARC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos
PBPs	Penicillin Binding Protein
PCIH	Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RAM	Resistência Antimicrobiana
Rede RM	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana
ST	Sequence type
SHV	$\beta$ -lactamase "Sulfhydryl variable"
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TEM	$\beta$ -lactamase Temoneira
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WGS	Whole Genome Sequencing

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
Ct	Ciclo threshold
dNTPs	Deoxinucleosídeos tri-fosfato
OD	Oxigênio Dissolvido
g	Grama
pb	Pares de bases
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
nM	Nanomolar
Tm	Temperatura de melting

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resistência aos antimicrobianos de <i>K. pneumoniae</i> isoladas a partir de culturas de vigilância. *Ampicilina com sulbactam, piperacilina com tazobactam, ceftazidima, ceftriaxona, ceftazidima, cefoxitina, cefuroxima, cefepime, ertapenem, imipenem e meropenem.....	42
Figura 2 - Prevalência de genes de resistência nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> a partir de culturas de vigilância.....	43
Figura 3 - <i>Minimum spanning tree</i> dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases. Bolas azuis: n=1; bolas verdes; n=2; bolas amarelas: n=3; bolas roxas: n=4; bolas vermelhas: n=5 ou mais. I a XII – Perfil genéticos de resistência. O halo que circula alguns isolados indica a formação de possíveis complexos clonais (CC). A relação entre os isolados foi determinada pela análise com BioNumerics (BioNumerics 6.6) onde o CC é formado por isolados com mais de 80% de similaridade entre si.....	45
Figura 4 - Distribuição de ST entre as localizações geográficas. CC, complexo clonal.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na detecção de genes de carbapenemase, metalo- $\beta$ -lactamase e fosfoetanolamina transferase.....	39
Tabela 2 - Perfil genéticos de resistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> de acordo com os genes detectados.....	44
Tabela 3 - Caracterização de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de NDM....	46
Tabela 4 - Proposição de agrupamento do complexo clonal de cepas que compartilham 5 ou mais alelos entre ST.....	47

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Vigilância sanitária no ambiente hospitalar.....	16
1.2 Controle de infecção hospitalar no Brasil.....	18
1.3 Vigilância microbiológica ativa.....	20
1.4 Multirresistência bacteriana aos antibióticos.....	21
1.4.1 Carbapenemases.....	23
1.4.2 Metallo- $\beta$ -lactamase.....	26
1.4.3 Resistência à polimixinas.....	27
1.5 Tipificação molecular de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	30
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVO</b> .....	<b>36</b>
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
4.1 Aspectos éticos.....	37
4.2 Coleta, isolamento, identificação fenotípica e susceptibilidade aos antimicrobianos.....	37
4.3 Confirmação da identidade dos isolados pela PCR.....	37
4.4 Pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos.....	38
4.5 Relação clonal dos isolados KPRC pela <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR</i> (ERIC-PCR).....	39
4.6 Determinação da relação clonal dos isolados produtores de <i>bla</i> <sub>NDM</sub> por <i>Multilocus sequence type</i> – MLST.....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1 Identificação dos isolados.....	41
5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	41
5.3 Pesquisa de genes codificadores de carbapenemases, metallo- $\beta$ -lactamases e <i>mcr-1</i> .....	42
5.4 Diversidade clonal de KPRC.....	44
5.5 Epidemiologia molecular de isolados produtores de <i>bla</i> <sub>NDM</sub> .....	45
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>



REFERÊNCIAS.....	57
------------------	----

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Vigilância sanitária no ambiente hospitalar

O Sistema Único de Saúde (SUS), aprovado através da Lei Orgânica da Saúde – Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, tem como objetivo e atribuição “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas”. De acordo com essa Lei, a Vigilância Sanitária é definida como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente à saúde. Sendo assim, os serviços de atenção à saúde são submetidos às ações de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1990).

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), um hospital é um estabelecimento que fornece cuidados médicos de curto e longo prazo, consistindo em serviços diagnósticos, terapêuticos, ambulatoriais e de reabilitação para pessoas debilitadas por alguma patologia e ou lesão e para parturientes.

Dentre vários problemas enfrentados pelos hospitais, a resistência aos antimicrobianos continua aumentando e é hoje considerada uma grande ameaça ao tratamento de infecções, particularmente entre pacientes hospitalizados. As razões para a variabilidade nas taxas de resistência em todo o mundo são ainda desconhecidas, mas podem ser relacionadas diferenças nos procedimentos diagnósticos, padrões de uso temporário ou práticas de prevenção e controle de infecções (MULVEY; SIMOR, 2009).

Nos estabelecimentos de assistência à saúde, o crescente aumento de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos e a falta de opções terapêuticas a curto e médio prazo tem se tornado um grande desafio para o controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (GARCIA et al., 2017), especialmente em Unidade de

Terapia Intensiva (UTI), visto que os pacientes se encontram debilitados e muitas vezes imunodeprimidos, apresentando baixa resposta contra estes patógenos (OLIVEIRA; DAMASCENO, 2009; CORREA, 2017). Desta forma, as IRAS são uma das principais causas de morbimortalidade nosocomial, podendo estar associada a doenças graves, intervenções médicas e cirúrgicas e complicações a elas relacionadas (VALADARES et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2011; FERRAZ, 2016).

De acordo com Medina-Polo e colaboradores (2014), as IRAS constituem complicações potencialmente graves que implicam no aumento de custos, tempo de permanência hospitalar, além de favorecer a seleção e disseminação de microrganismos multirresistentes.

Diante desta problemática, é necessária a implementação de programas intensivos de prevenção e controle de IRAS baseados em abordagens eficientes no controle da disseminação da resistência microbiana no ambiente hospitalar (SIMÕES et al, 2016; ANVISA, 2017). Conforme o *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC), aproximadamente 20% a 30% das IRAS são consideradas preveníveis por meio de programas de controle e higiene intensivos (ECDC, 2016; ANVISA, 2016). As medidas de prevenção de IRAS devem ser adotadas em todos os estabelecimentos de assistência à saúde. Componentes importantes desses programas incluem a vigilância, investigação e controle de surtos, protocolos de esterilização e desinfecção de equipamentos. Além da implementação de práticas de cuidados aos pacientes tais como higienização das mãos, isolamento e barreiras entre pacientes infectados/colonizados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017), capazes de reduzir até 70% algumas das infecções, como por exemplo, infecções da corrente sanguínea (CDC, 2016; ANVISA, 2016).

Neste contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as coordenações, estadual (Coordenações Estaduais de Controle de Infecção Hospitalar - CECIH), municipal (Coordenações Municipais de Controle de Infecção Hospitalar - CMCIH) e local (Comissões de Controle de Infecção Hospitalar - CCIH) tornam-se essenciais na implantação, sustentabilidade e expansão de um programa de vigilância e prevenção de IRAS e para o controle da disseminação da resistência microbiana (RM) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

## 1.2 Controle de infecção hospitalar no Brasil

As infecções hospitalares ou IRAS são definidas como aquelas adquiridas após a internação do paciente em hospital, ou outro estabelecimento de saúde, e que se manifeste durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1997). As infecções mais frequentes incluem as da corrente sanguínea associada ao cateter venoso central, as infecções do trato urinário associadas a cateter vesical, infecções do sítio cirúrgico e pneumonia associada à ventilação mecânica (KHAN et al., 2017).

No Brasil, apesar de não haver uma sistematização dos dados, estima-se que aproximadamente de 5% a 15% dos pacientes hospitalizados e 25% a 35% dos pacientes admitidos em UTI adquiriram algum tipo de IRAS, em geral, a quarta causa de mortalidade nesse ambiente (OLIVEIRA et al., 2012; LORENZINI et al., 2013). Destacam-se a infecção do trato urinário (35 – 45%), infecção de trato respiratório (15 – 25%), bacteremia (10 – 20%) e infecção de sítio cirúrgico (14 – 16%) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013a; OLIVEIRA et al., 2012).

O problema da infecção hospitalar só foi assumido pelo Estado em 1983, com a publicação da Portaria nº 196 pelo Ministério da Saúde, que tornou obrigatória a implantação de Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) em todos os hospitais do país (BRASIL, 1983). Essa portaria foi substituída pela Portaria nº 930/1992 e posteriormente revogada pela Lei 9431/1997 que dispõe sobre a obrigatoriedade de hospitais manterem um Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) e criarem uma CCIH. Para os efeitos desta Lei, este programa envolve o conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares (BRASIL, 1997).

A ANVISA coordena o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PNCIH) e conta com o auxílio das CCIH. A CCIH coordena as ações de vigilância epidemiológica das infecções hospitalares, supervisionam normas e rotinas técnico-operacionais relacionadas à prevenção e controle das infecções, capacitam o quadro

de funcionários e profissionais da instituição, desenvolvem ações para o uso racional de antimicrobianos, saneantes e materiais médico-hospitalares e realizam investigação epidemiológica de casos e surtos, implementando medidas imediatas de controle, dentre outras atividades, como fiscalizar se as determinações da vigilância sanitária estão sendo cumpridas (BRASIL, 1997). Em 2012 a ANVISA instituiu a Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, cuja atividade foi a elaboração do Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde – PNPCIRAS. O objetivo geral do programa é reduzir a incidência de IRAS e combater a resistência microbiana. A responsabilidade de acompanhamento dos PCIH nos hospitais é da Vigilância Sanitária, a qual não somente inspeciona como também deve prestar cooperação técnica aos hospitais, orientando para o exato cumprimento e aplicação das diretrizes estabelecidas pela legislação sanitária pertinente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Em 2016, foi publicado o PNPCIRAS para o quinquênio 2016-2020 que entre seus objetivos específicos estabelece o de consolidar o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das IRAS com ações estratégicas para melhorar a regularidade da notificação e, conseqüentemente, reduzir a subnotificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). Além disso, o PNPCIRAS define também como objetivos específicos reduzir a incidência das IRAS prioritárias; prevenir e controlar a disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde; e consolidar o PNPCIRAS (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

Assim, cada instituição deve estabelecer estratégias de ação, sendo primordial a racionalização do uso de antimicrobianos no hospital. A implantação de um sistema de auditoria deve ser realizada pela equipe da CCIH, ser dinâmico e adaptado as necessidades de cada estabelecimento de saúde que deve ser essencial para qualquer programa de controle de antimicrobianos. Neste controle, deverá ser considerada a eficácia do antimicrobiano, efeitos adversos, custos e padrão de sensibilidade dos microrganismos prevalentes.

### 1.3 Vigilância microbiológica ativa

A vigilância ativa é um componente importante para o controle de microrganismos multidroga resistentes (MDR), pois permite a detecção de patógenos emergentes, o monitoramento de tendências epidemiológicas e mensura a eficácia das intervenções. As estratégias variam desde a vigilância de resultados obtidos através de cultura clínica (atendimento de rotina), até a realização de culturas de vigilância ativa para detectar a colonização assintomática (SARAIVA, 2013), a fim de minimizar a transmissão cruzada a partir do paciente colonizado ou infectado, que deve ser mantido em isolamento de contato (ALMEIDA, 2016; FERREIRA, 2017). Culturas de vigilância epidemiológica podem ser definidas como a observação sistemática da ocorrência de um evento e a avaliação de fatores que determinam a tendência de aumento ou diminuição desta ocorrência (CHAGAS et al., 2016).

A coleta de cultura de vigilância de rotina é considerada a abordagem mais sensível para identificação de pacientes colonizados com MDR. Os dados de vigilância fornecem informações individuais dos pacientes, bem como o perfil epidemiológico de setores do hospital. Esta informação pode sinalizar a necessidade da adoção de precauções de contato e outras intervenções para limitar a disseminação do MDR, evitando a exposição desnecessária do paciente. Essa abordagem vem sendo considerada como a técnica de vigilância mais utilizada para detectar bactérias multirresistentes que colonizam o trato intestinal (STIER et al, 2015). Existe ainda a recomendação de se realizar cultura de vigilância por meio de *swab* retal em pacientes que tenham sido hospitalizados anteriormente. Há consenso de que sejam realizadas também, culturas ativas em pacientes que estão próximos a um paciente índice, se existir evidência de transmissão de microrganismo multirresistente dentro de uma unidade ou se os padrões de resistência ameaçarem a capacidade de tratamento da infecção. A CCIH deve avaliar os principais fatores de risco (internação em UTI, uso prolongado de antimicrobianos, uso de dispositivos invasivos) para microrganismos multirresistentes (SARAIVA, 2013).

Cada unidade hospitalar que trabalha com cultura de vigilância epidemiológica deve ter o seu próprio protocolo de implementação, conforme o perfil epidemiológico da

instituição. Geralmente os patógenos de maior relevância clínica são: *Staphylococcus* Negative-Coagulase (SCoN); Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE); enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), bacilos Gram-negativos produtores de  $\beta$ -lactamase AmpC e os bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (FRANCO, 2017; FERREIRA,2017).

Embora amostras de fezes sejam consideradas o “padrão ouro” para rastrear patógenos intestinais em geral e, em particular, ERC, *swabs* retais são frequentemente utilizados devido a questões práticas, tais como facilidade de coleta, manuseio e processamento. Estudo realizado com culturas ativas em pacientes de UTI em um hospital de emergência de Pernambuco, mostrou que 88% do total de amostras coletadas, *K. pneumoniae* foi o microrganismo mais frequente (31,8%) (ALMEIDA et al, 2018).

#### 1.4 Multirresistência bacteriana aos antibióticos

Microrganismos MDR representam um dos principais agravos às IRAS, pois muitas vezes são endêmicos devido à pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos de espectro estendido, levando à disseminação de diferentes mecanismos de resistência.

De acordo com o *Global Antimicrobial Surveillance System* (GLASS), há uma ocorrência generalizada de resistência aos antibióticos entre 500 mil pessoas com suspeita de infecção bacteriana em 22 países. As bactérias resistentes mais comumente relatadas foram *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *S aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella* spp. (GLASS, 2017). De acordo com a OMS, os principais patógenos multirresistentes incluem *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA), VRE e, mais recentemente, enterobactérias produtoras de  $\beta$ -Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos carbapenêmicos (ROCHA,2015; GLASS,2017).

Na Europa, um relatório elaborado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* – ECDC reportou que 65,8% das enterobactérias resistentes às cefalosporinas de terceira geração e produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

(ESBL) e 8,1% resistentes aos antibióticos carbapenêmicos. Além disso, 31,8% dos isolados de *P. aeruginosa* e 55,4% dos *Acinetobacter baumannii* também foram resistentes aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (ECDC, 2016). Nos Estados Unidos, um estudo mostrou que mais de 70% das bactérias isoladas nos hospitais apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico comumente utilizado no tratamento de infecções (OLIVEIRA et al., 2010). Os países da América Latina apresentam altos níveis de resistência bacteriana em comparação à Europa e Estados Unidos, especialmente entre bacilos Gram-negativos não-fermentadores e enterobactérias produtoras de ESBL (CASELLAS, 2011; GALES et al., 2012).

No Brasil, os principais microrganismos MDR causadores de IRAS são MRSA, VRE, cepas produtoras de ESBL e bactérias Gram-negativas resistentes aos antibióticos carbapenêmicos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). Uma pesquisa realizada através da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), em 2012, mostrou nas infecções de corrente sanguínea primária (IPCSL) em pacientes adultos hospitalizados em UTI, 77,4% de resistência em *Acinetobacter* spp. e 39,1% em *P. aeruginosa*, enquanto, nos BGNs pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as taxas de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e às cefalosporinas de amplo espectro (terceira ou quarta gerações) foram de 43,3% para *K. pneumoniae*, 21,6% para *Enterobacter* sp. e 9,7% para *E. coli* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

O aumento da resistência entre os membros da família *Enterobacteriaceae* tem culminado no aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, exigindo esforço multidisciplinar para prevenção e controle, além de uma detecção laboratorial eficiente (GISKE et al, 2011; SEIBERT et al, 2014).

*K. pneumoniae* é considerada um dos microrganismos mais associados a infecções nosocomiais, principalmente em pacientes internados em UTI (6). Considerado como um constituinte da microbiota intestinal humana, esta bactéria ganhou notoriedade ao ser identificada como um patógeno oportunista, amplamente encontrado no ambiente natural (água, esgoto e solo), na boca, pele e intestino, bem como em ambientes hospitalares e dispositivos médicos (SILVA et al, 2019). Alguns estudos revelaram a relação de pacientes colonizados com infecção subsequente por



*K. pneumoniae* MDR (KP-MDR) (9-12). Na última década, *K. pneumoniae* emergiu como uma grande ameaça à saúde pública devido ao aumento da prevalência de infecções associadas à assistência à saúde causadas por cepas multirresistentes produtoras de  $\beta$ -lactamases e/ou carbapenemases de amplo espectro (WYRES et al, 2020).

Além de ser um problema clínico significativo por si só, *K. pneumoniae* é a espécie na qual vários novos genes de resistência aos antimicrobianos (RAM) foram descobertos antes de disseminar para outros patógenos (por exemplo, genes de resistência aos carbapenêmicos tais como, KPC, OXA-48 e NDM-1. Embora a contribuição de *K. pneumoniae* para a crise geral de RAM seja impossível de quantificar, as evidências atuais sugerem que esta possui uma distribuição ecológica mais ampla, possuindo uma composição de DNA significativamente mais variada, maior diversidade genética de RAM e maior “plasmid burden” do que outros oportunistas Gram-negativos (WYRES; HOLT, 2018).

O genoma de *K. pneumoniae* contém entre 5 e 6 mil genes, isso significa que a maior parte do genoma é composta por genes acessórios. Esses genes estão envolvidos em processos específicos, como a fixação de nitrogênio (FOUTS et al., 2008). Eles também podem codificar fatores de virulência específicos, várias enzimas e mecanismos resistentes a antibióticos (BI et al., 2015). Eles podem ser adquiridos via transferência horizontal de genes entre espécies bacterianas, conforme evidenciado pela presença de ilhas genômicas e elementos genéticos móveis em muitos isolados. Os genes codificados em ilhas genômicas auxiliam na adaptação a locais específicos de infecção ou colonização (CHEN et al., 2010; ZHANG et al., 2011; VAN AARTSEn et al., 2012).

#### 1.4.1 Carbapenemases

A crescente prevalência de resistência bacteriana aos antibióticos é um problema crítico de saúde pública. As infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos estão associadas a morbidade significativa e mortalidade em todo o mundo. Atualmente, a principal ameaça de resistência a antibióticos bactéria são de organismos Gram-

negativos MDR, particularmente *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos (ABRC), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (PARC) e *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos (ERC) estão no nível mais elevado da lista de prioridades globais de bactérias resistentes a antibióticos da OMS representando uma maior ameaça à saúde humana (SHEU et al, 2019; Willyard, 2017).

A produção de enzimas  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos (carbapenemases) é um dos principais mecanismos de resistência das Enterobactérias. Ocorrem mais frequentemente nos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella* (NORDMANN et al., 2012). De acordo com a classificação internacional, as carbapenemases pertencem às classes moleculares A (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC), B (metalo- $\beta$ -lactamase, das quais VIM, IMP e NDM são os principais tipos) e D (oxacillinase - representada pelo tipo OXA-48) e são as mais comumente detectadas em *K. pneumoniae*.

A KPC é um dos tipos epidemiologicamente mais importantes devido à sua disseminação mundial (LAVAGNOLI,2017) e é uma  $\beta$ -lactamase pertencente à classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush (BUSH; JACOBY, 2010). Essa enzima confere resistência a todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos, no entanto são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e confere resistência inclusive aos antibióticos carbapenêmicos. Essa última classe de antimicrobianos é de amplo espectro, com uso frequente no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Desse modo, para o tratamento de microrganismos produtores de KPC, restam escassas opções terapêuticas. Essa característica, juntamente do fato da KPC ter alto potencial de disseminação, devido à sua localização plasmidial, a qual facilita a transferência do gene interespecies, tem sido motivo de preocupação em hospitais e instituições de saúde em todo o mundo (CAI et al., 2012).

O primeiro relato sobre KPC foi feito por YIGIT e colaboradores em 2001, após o isolamento de uma cepa de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos no EUA, durante a execução de um projeto de vigilância epidemiológica (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* – ICARE, 1996) para monitoramento da

resistência a antibióticos em UTIs (YIGIT et al., 2001). Em 2005, foi isolada pela primeira vez uma cepa produtora de KPC fora dos EUA, onde um paciente, atendido na França, relatou que recebera tratamento cirúrgico em um hospital do EUA. Com base neste trabalho, foi demonstrado que possivelmente a presença da bactéria produtora de KPC na França tenha sido resultado da transferência intercontinental de um clone a partir dos EUA (NAAS et al., 2008).

Em 2006, foi descrita a primeira detecção do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> no Brasil, na Cidade de Recife. Em 2010, foram relatados com grande repercussão na mídia, surtos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em vários estados brasileiros como: Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Paraíba e Recife, causando grande apreensão na comunidade médica e científica. Tendo em vista a emergência e evolução dos microrganismos produtores de carbapenemases, a ANVISA divulgou, através de uma nota técnica, medidas para o controle da disseminação de bactérias multirresistentes incluindo enterobactérias produtoras de carbapenemases, a fim de limitar sua disseminação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010; DIENSTMANNI et al., 2010). Posteriormente, KPC-2 foi descrita em muitas espécies de *Enterobacteriaceae* e em diversos locais de todo o país. Até o momento, esta é a única variante relatada no Brasil, embora 46 variantes tenham sido descritas em todo o mundo (SAMPAIO; GALLES, 2016, Naas et al., 2017).

Uma nova carbapenemase capaz de hidrolisar não apenas os carbapenêmicos, mas também penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, nomeada (Brazilian *Klebsiella* carbapenemase - BKC-1) foi descrita no Brasil (NICOLLETI, et. al, 2015). Inicialmente, o gene *bla*<sub>BKC-1</sub> foi relatado em apenas seis isolados de *K. pneumoniae* de São Paulo, e sua disseminação é considerada baixa devido ao fato de ser localizado numa região de baixa transferência, em um plasmídeo não conjugativo (NICOLLETI, et. al, 2015; SAMPAIO, GALES, 2016). Embora, recentemente foi descrita a presença de *bla*<sub>BKC-1</sub> em *Citrobacter freundii* proveniente de swab retal (MARTINS et al, 2020). Até o presente momento, são poucos os relatos de detecção de BKC-1 no país.

A oxacillinase com atividade carbapenemase OXA-48 é um membro da família de  $\beta$ -lactamases da classe D, descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* da Turquia

em 2004. Esta enzima hidrolisa penicilinas, carbapenêmicos e cefalosporinas; não é inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases. Desde a primeira descrição, a OXA-48 está difundida na Turquia, no Oriente Médio, em países do norte da África e em toda a Europa. Os genes que codificam essas enzimas foram reportados em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, além de *K. pneumoniae*, incluindo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *Serratia marcescens* e *Providencia rettgeri*. Além da OXA-48, já foram descritas diversas variantes com perfis enzimáticos semelhantes, incluindo OXA-162, -181, -204, -232, -244, -245, -370, -436, -438 e -484; cada variante difere da OXA-48 por apenas alguns aminoácidos (LUTGRING et al, 2018). No Brasil, temos a ocorrência de blaOXA-370 em *Enterobacter hormaechei* oriundo de swab retal. Esta enzima é semelhante a OXA-48 que se difere em apenas 3 nucleotídeos, que resultam na substituição de um único aminoácido em sua cadeia (SAMPAIO et al., 2014). Outro estudo relatou a presença de OXA-370 em diversas espécies de enterobactérias no Brasil (PEREIRA et al., 2015). Recentemente foi descrito a co-produção de NDM-1 e OXA-370 em *K. pneumoniae* relacionado a paciente oriundo do Brasil (CARRASCO-ANABALÓN et al., 2020).

#### 1.4.2 Metallo- $\beta$ -lactamase

Enzimas metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) são membros da classe B de Ambler, são enzimas que possuem  $Zn^{2+}$  no seu sítio ativo. Hidrolisam a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenemases, mas não hidrolisam monobactâmicos. Elas podem ser inibidas por agentes quelantes tais como EDTA (BUSH; BRADFORD,2019; GARAU et al, 2005). Este grupo é representado principalmente pelas enzimas *New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase* (NDM), *Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase* (VIM) e metallo- $\beta$ -lactamase do tipo IMP (IMP). O crescente número de patógenos resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos carregando metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) é uma ameaça significativa à saúde pública global. Uma estratégia promissora para tratar esses patógenos resistentes é a co-administração de inibidores da MBL e outros  $\beta$ -lactâmicos (CHRISTOPEIT et al, 2016).

Os genes que codificam essas enzimas podem ser integrados ao cromossomo

ou no plasmídeo onde inicialmente foram observados em *K. pneumoniae* e *E. coli* (DORTET et al, 2014), mas foi demonstrado que esses plasmídeos podem ser transferidos para outras espécies, o que facilitou a disseminação do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> (Torres-Gonzalez et al, 2015; Torres-Gonzalez et al, 2014). O gene *bla*<sub>NDM-1</sub> está localizado com mais frequência em plasmídeos que albergam outros genes de resistência a outras classes de antibióticos (WEI et al, 2015; IBARIA et al, 2019). Desde o primeiro relato pela primeira vez na Índia (YONG et al., 2009) já foram descritas. Após o primeiro relato, uma vigilância ativa foi iniciada, e houve outros relatos envolvendo *Enterobacteriaceae* produtoras de NDM, como *E. cloacae*, *M. organii*, *E. coli* e *K. pneumoniae* no Brasil (AIRES et al, 2017). Até o momento foram descritas 28 variantes (NAAS et al, 2017; LIU et al, 2018). Porém, diferentemente do que ocorre com cepas produtoras de KPC, a disseminação de *K. pneumoniae* produtora de NDM não está associada à expansão clonal, mas parece estar associada a disseminação do *transposon* Tn3000 (AIRES et al., 2017). O gene *bla*<sub>VIM-1</sub> foi identificado primeiro em *P. aeruginosa* em 1999 e após também foi relatado em outras espécies Gram-negativas de vários países. Atualmente, o *bla*<sub>VIM-2</sub> é o MBL mais difundido em *P. aeruginosa* e tem sido a fonte de múltiplos surtos (WALSH et al, 2005; HONG et al, 2015). Pelo menos 71 variantes do VIM foram posteriormente identificadas em vários países (HISHINUMA et al., 2020).

#### 1.4.3 Resistência à polimixinas

A questão da resistência microbiana aos antibióticos é cada vez mais preocupante, considerando-se a indisponibilidade de opções terapêuticas que vem ocorrendo na prática médica assistencial. A colistina (polimixina E) e polimixina B pertencem à classe das polimixinas, uma das principais classes de antibióticos com ação contra a maioria das bactérias Gram-negativas incluindo *Enterobacteriaceae*, mas não têm atividade contra bactérias Gram-positivas e anaeróbias (POIREL, 2017; NIKOO, et. al, 2017). Esta classe é rotulada como “último recurso” para infecções por micro-organismos Gram-negativos MDR ou XDR (VELKOV, 2017; GARG, 2017).

Essas drogas se ligam a moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) e fosfolipídios na

membrana externa de bactérias Gram-negativas. Desloca competitivamente cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) dos grupos fosfato dos lipídios da membrana, levando a alterações de permeabilidade no arcabouço celular, perda do conteúdo intracelular, e posteriormente a morte celular (BISWAS et al, 2012; NIKOO et al., 2017).

Estudos dos mecanismos de resistência mostraram que mutações cromossômicas eram frequentemente responsáveis pela resistência à colistina em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e, recentemente, *K. pneumoniae*. A maioria dos mecanismos que conferem resistência à colistina são direcionados a modificações da fração lipídica A do LPS, que na maioria das vezes modifica esta fração com 4-amino-4-desoxi-l-arabinose (l-ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PEtN) (BARON et al, 2016). Estas modificações do Ara4N são reguladas, principalmente, pelos sistemas de dois componentes: PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB.

Além disso, a interrupção do gene *mgrB* em *K. pneumoniae* foi identificada como um papel importante na resistência à polimixina neste micro-organismo. Várias interrupções no *mgrB* foram recentemente descritas em diversos isolados clínicos e não clínicos de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* resistentes a colistina, incluindo inativação da inserção por um elemento similar ao IS5 e outras sequências de inserção (CANNATELLI et al., 2013; LÓPEZ-CAMACHO et al., 2013; GAIBANI et al., 2014; OLAITAN et al., 2014b; POIREL et al., 2015). Alterações adicionais que foram relatadas no *mgrB* incluem uma mutação *non-sense* que leva ao término precoce da proteína transmembrana MgrB e mutações *mis-sense* resultando em substituições de aminoácidos (CANNATELLI et al., 2014a; OLAITAN et al., 2014b; POIREL et al., 2014; OLAITAN et al, 2014).

Outras modificações da membrana externa bacteriana incluem o aumento da produção de polissacarídeo da cápsula (CPS) em *K. pneumoniae*. O CPS limita a interação das polimixinas com seus sites alvo. Assim, a regulação positiva das produções de CPS confere maior resistência à polimixina (CAMPOS et al., 2004; FALAGAS et al, 2010). A polimixina tem sido amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multidroga resistentes (MDR), incluindo a *K. pneumoniae*. No entanto, os relatos de isolados de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina aumentaram em todo o mundo e no Brasil, tornando-se um

grande problema de saúde pública (AIRES et al, 2016; BARTOLLETTI et al, 2016).

O recente surgimento da resistência à colistina mediada pelo gene *mcr-1*, carregado por um plasmídeo, tem levantado preocupação entre especialistas em saúde pública em todo o mundo. Desde a sua descoberta na China por LIU et al (2016), foi revelado em várias espécies bacterianas como *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Shigella* spp., e às vezes associado à produção de carbapenemase ou ESBL (PRINCIPE et al, 2018). A resistência à colistina mediada pelo gene *mcr-1* foi detectada em águas naturais, solo, adubo e drenagem urbana, o que demonstra que há uma tendência crescente de resistência a este antimicrobiano em ambiente clínicos e não clínicos (LEKUNBERRI et al, 2017.; LI et al, 2019).

Até o momento, foram descritas dez variantes, *mcr-1* (11 subvariantes), *mcr-2* (3 subvariantes), *mcr-3* (10 subvariantes), *mcr-4*, *mcr-5* e subsequentemente foram identificados *mcr-6* e *mcr-7* em *Enterobacteriaceae* (ZHANG et al, 2018; YANG et al, 2018). A variante *mcr-7.1* foi encontrada em *K. pneumoniae* origem animal na China. WANG e colaboradores (2018) detectaram a variante *mcr-8* associado com *bla<sub>NDM</sub>* em *K. pneumoniae* isolados em humanos e animais. Recentemente, foram relatadas duas novas variante *mcr-9* em *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (CARROLL et al, 2019) e *mcr-10* em *Enterobacter roggkampii* (WANG et al, 2020).

Na Europa, a primeira cepa carregando *mcr-1* foi uma *E. coli* isolada França de origem animal em 2005. Subsequentemente, o gene *mcr-2* foi detectado em *E. coli* isolada de suíno e bovino na Bélgica, e uma variante do gene *mcr-1* foi revelada a partir de swab retal de uma criança na Itália em *K. pneumoniae*. Além disso, a variante *mcr-3* foi encontrada em *E. coli*, *Aeromonas* spp. e *Salmonella* spp. isolados de amostras humanas e animais, enquanto *mcr-4* e *mcr-5* foram detectados em *Salmonella* spp. e de *E. coli*, mas apenas de fontes animais (PRINCIPE et al, 2018).

No Brasil em um estudo em 2016 foi detectado *mcr-1* em *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 em uma amostra clínica humana isolada em UTI. Esta associação levanta uma grande preocupação, uma vez que a *K. pneumoniae* produtora de KPC é disseminada em todo o mundo e destaca o potencial para a disseminação de *mcr-1* associado a clones multirresistentes. Além disso, a possibilidade da transferência

simultânea desses genes ameaça as estratégias de controle de infecções e a terapia clínica (AIRES et al, 2017). Em outro estudo, Neto et al, 2019 descreveu isolados *E. coli* (ST744) e *K. pneumoniae* (ST101) de culturas de vigilância portadores de *mcr-1*. Este fato ressalta a importância de monitoramento minucioso, através de culturas de vigilância ativa, da resistência as polimixinas mediada pelo gene *mcr-1*.

### 1.5 Tipificação molecular de *Klebsiella pneumoniae*

A tipificação molecular de microrganismos patogênicos tem contribuído enormemente para a eficácia de programas de vigilância epidemiológica em todo o mundo, subsidiando estratégias de prevenção e controle de doenças infecciosas. O papel principal desses sistemas de tipificação consiste em acessar a inter-relação genética de isolados microbianos (REGUA-MANGIA, 2015).

Abordagens moleculares como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) são métodos relativamente simples e de baixo custo que foram utilizados com sucesso na genotipagem de *K. pneumoniae* de várias fontes (LIN et al., 2014; RANJBAR et al., 2014).

Mais recentemente, a maioria dos métodos utilizados para a identificação e tipificação bacteriana é baseada no sequenciamento do DNA. De fato, a sequência de genes específicos pode abrigar informações suficientes para classificar bactérias em espécies, subespécies ou também em um nível clonal. Por exemplo, o MLST é um dos métodos mais utilizados para tipificação bacteriana e baseia-se na amplificação e sequenciamento de genes *housekeeping* (PERINI et al., 2020; NUTMAN AND MARCHAIM, 2018). Para cada desses genes, diferentes sequências presentes em uma espécie bacteriana são designadas como alelos distintos e, para cada isolado, os alelos em cada um dos sete loci definem o perfil alélico ou o “*sequence type*” (ST). STs que compartilham quatro ou mais alelos podem pertencer a um complexo clonal (MAIDEN et al., 2006; CODY et al., 2014).



O esquema MLST de *K. pneumoniae* foi desenvolvido em 2005 (DIANCOURT, 2005) e, em seguida, utilizado para caracterizar a diversidade e a epidemiologia de isolados clínicos dessa espécie, levando à identificação de vários clones que diferem acentuadamente por suas características de virulência e resistência aos antimicrobianos (WANG et al., 2013; BRISSE et al., 2009; LUO et al., 2014; GUO et al., 2015). Além disso, é usado para caracterizar relações genéticas entre isolados bacterianos e para rastrear a propagação global de cepas resistentes aos antimicrobianos. Assim como foi, ST15 relacionado ao clone epidêmico em *K. pneumoniae* teve sua origem em perus, e posteriormente foi capaz de colonizar seres humanos e causar infecções graves (CHENG et al., 2018).

As infecções por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KPRC) continuam sendo problemáticas no cenário da assistência médica, particularmente o ST258. KPRC é um problema de saúde pública devido à sua ampla distribuição, sua resistência a múltiplas drogas e a sua capacidade de trocar rapidamente plasmídeos contendo genes de resistência com outras *Enterobacteriaceae* (MARSH et al, 2020). O complexo clonal (CC) que inclui ST258 e suas variantes de um único locus ST11 e ST340 é o mais predominante entre os isolados de KPRC (CHEN et al, 2014). Ele é reconhecido como o mais difundido mundialmente em *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) nas últimas duas décadas, predominantemente os subtipos KPC-2 e KPC-3 em associação com o *transposon* Tn4401 associado ao plasmídeo e suas variantes (SIMMONDS AND UHLEMANN, 2017).

A disseminação de clones resistentes a antimicrobianos pode ser o fator mais importante para o aumento da prevalência de resistência antimicrobiana em todo o mundo. Essa propagação pode ocorrer por transmissão vertical e ou transferência horizontal de elementos móveis que contenham genes de resistência. A globalização trouxe um aumento maciço no comércio e nas viagens de longa distância; ambos aceleraram a disseminação de clones resistentes (KO, 2019).

Cepas de *K. pneumoniae* resistentes a múltiplos fármacos pertencem principalmente a certos STs, como: ST11, ST14, ST15, ST37, ST101, ST147, ST258, ST336, ST340 e ST874. Estes representam clones internacionais mundialmente de alto risco que tiveram papel importante na disseminação em ambientes hospitalares e

aumento da frequência em infecções hospitalares (RODRIGUES et al, 2014; GONÇALVES et al, 2017; DOMOKOS et al, 2019). Entre esses clones, o ST258 foi relatado como um clone híbrido criado por uma grande recombinação entre ST11 e ST442 (MATHERS et al., 2015).

As infecções por *K. pneumoniae* são causadas por diversos clones amplamente distribuídos geograficamente. No entanto, um subconjunto deles contribui desproporcionalmente para a carga global de doenças, a que chamamos de “global problem clones” (WYRES et al., 2020).

Vários estudos têm sugerido a relação entre multirresistências e dados epidemiológicos moleculares baseados na MLST (SHEN et al., 2009.; CUZON et al., 2011; KERDSIN et al., 2019). Desde seu surgimento, no início e meados da década de 2000, o ST258 se tornou o clone de KPRC mais prevalente na América do Norte, América Latina e Europa (PITOUT et al., 2015; XIAO et al., 2020). Foi relatado em mais de 25 países, incluindo países com epidemia de KPC como Nordeste dos EUA, Argentina, Brasil, Colômbia, China Oriental, Grécia, Israel, Itália, Polônia e Porto Rico (BENGTSSON-PALME et al., 2018; DI TELLA et al., 2019). Além disso, é responsável por mais de 77% dos surtos nos EUA e 90% de todas as infecções por KPRC em Israel. Além disso, ST11 e ST437 são descritos como clones prevalentes de *K. pneumoniae* no Brasil (SCOULICA et al., 2004).

A plasticidade genômica é um importante facilitador na disseminação de bactérias MDR. *K. pneumoniae* e outras enterobactérias que possuem vastos genes em comum que são responsáveis por essa resistência utilizada na clínica (KUMAR et al, 2011). A epidemiologia molecular não apenas melhora nossa compreensão da patogênese da doença, como fornece pistas sobre mecanismos específicos, moléculas e genes que influenciam o risco de desenvolver uma patologia, como também auxilia na vigilância epidemiológica, fornecendo dados confiáveis com alta sensibilidade e especificidade. Além disso, resultados obtidos por técnicas moleculares, possibilitam a identificação da origem da patologia, da via de transmissão ou disseminação e da avaliação da eficácia de medidas preventivas (GUPTE et al, 2016). Dada a diversidade genética e a complexidade das ameaças clínicas de *K. pneumoniae*, novos métodos moleculares como o *Whole Genome Sequencing* (WGS) sendo uma ferramenta crucial

para vigilância epidemiológica deste patógeno, particularmente para monitorar a emergência global e a disseminação de clones multidroga resistente e rastrear de acordo com os genes de RAM e hipervirulência (WYRES et al, 2020).

## 2 JUSTIFICATIVA

As IRAS são um grave problema de saúde pública em todo o mundo, pois são os eventos adversos associados à assistência à saúde mais frequentes e apresentam uma alta morbidade e mortalidade, repercutindo diretamente na segurança do paciente e por sua vez na qualidade dos serviços de saúde (COSTA, 2017). Embora significantes progressos tenham ocorrido no que diz respeito à adoção de boas práticas para a prevenção de infecções, esforços devem ser emanados para a redução de sua frequência (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). A segurança do paciente apresenta-se como um componente determinante e uma variável essencial para a qualidade em saúde, sendo essencial estudar os microrganismos presentes em um determinado ambiente hospitalar e sua disseminação (SALES et al., 2014).

Baseadas em evidências da literatura e investigações locais, medidas para prevenção de IRAS devem ser adotadas em todos os estabelecimentos de assistência à saúde, quer no âmbito hospitalar, em estabelecimentos de cuidados de pacientes crônicos, ou na assistência domiciliar (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

A prática hospitalar de busca de pacientes colonizados e/ou infectados através da coleta de materiais clínicos, como por exemplo, *swabs* nasais, orais e retais de pacientes das diversas unidades de internação (UTI e enfermarias), na sua admissão e durante o tratamento, tem sido fortemente incentivada, como medida de prevenção da disseminação de microrganismos multirresistentes, principalmente quando houver suspeita da presença de organismos produtores de carbapenemases (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013c). Neste caso, a CCIH do estabelecimento de saúde deve ser comunicada imediatamente para que sejam instituídas as medidas adequadas como a precaução de contato.

Devido à rápida disseminação de enterobactérias multirresistentes a dificuldade de opções de tratamento, é essencial a adoção de métodos de vigilância para implementar uma política adequada de controle de infecção. O controle realizado através das coletas de vigilância seriadas de swab retal dos pacientes colonizados ou infectados é extremamente importante na prática clínica para evitar surtos hospitalares

de difícil erradicação (BRACCO et al., 2013).

A caracterização fenotípica das cepas multirresistentes é importante, pois fornece dados preliminares sobre determinado isolado bacteriano. Entretanto o uso de técnicas moleculares constitui em um método rápido e confiável para a detecção de cepa que apresentam genes de resistência e auxiliando no controle mais efetivo da infecção e prevenção, fortalecendo as ações de vigilância (BRAUN, 2014). Além disto, a tipificação de isolados para investigações de surtos, determinação de clones e para o monitoramento de reservatórios de microrganismos, contribuem de forma significativa para prevenção e controle das IRAS, através da vigilância epidemiológica e avaliação da circulação de clones específicos em uma determinada população (TOSIN et al., 2003).

Os resultados obtidos irão permitir o mapeamento de genes de resistência e a verificação de possíveis relações clonais e suas associações com os perfis de susceptibilidade microbiana no ambiente hospitalar a nível nacional, possibilitando dessa forma o monitoramento e vigilância da resistência microbiana. Assim, estas informações servirão como subsídios para adoção de medidas de controle de combate a resistência microbiana nas unidades de terapia intensiva.

Na presente investigação, *K. pneumoniae* foi escolhido como microrganismo de estudo pois se aplica como excelente indicador da situação de multirresistência em determinado ambiente e região geográfica. Esse microrganismo é um agente etiológico de grande relevância em infecções hospitalares e tem apresentado altos percentuais de resistência em estabelecimentos de assistência à saúde, carreando inúmeros genes codificadores de resistência aos carbapenêmicos e a outros antibióticos de última geração. Portanto, a detecção prematura de marcadores de resistência aos carbapenêmicos e a caracterização genética desse patógeno tem se tornado cada dia mais necessária.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar a diversidade clonal e os perfis genéticos de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de culturas de vigilância ativa, em uma unidade de assistência à saúde no Rio de Janeiro.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KPRC) a partir de cultura de vigilância ativa de pacientes da UTI hospitalar;
- Realizar a identificação fenotípica e determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados;
- Confirmar a identidade dos isolados por metodologia molecular;
- Pesquisar os genes determinantes de resistência: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>BKC</sub>; *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *mcr-1* pela PCR;
- Estabelecer as relações clonais dos isolados KPRC por meio da ERIC-PCR;
- Avaliar a diversidade genética de isolados carreando *bla*<sub>NDM</sub> pelo esquema do MLST.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/FIOCRUZ), sendo aprovado sob o número 1.787.832.

### 4.2 Coleta, isolamento, identificação fenotípica e susceptibilidade aos antimicrobianos

O estudo foi realizado em um hospital federal localizado no município do Rio de Janeiro, que possui cerca de 220 leitos de atendimento ao SUS, sendo 35 leitos em UTI adulto e pediátrica. Culturas de vigilância ativa, mais especificamente, *swab* retal de pacientes da UTI deste hospital foram coletadas pela equipe técnica do hospital no período de março 2016 – 2017. Os *swabs* retais foram semeados em meio CHROMagar KPC e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C ± 1/24-48h. Em seguida, os isolados obtidos foram semeados em meio ágar MacConkey e novamente incubados a 35 °C ± 1/24-48 h.

A identificação e o antibiograma dos isolados foram realizadas pelo sistema automatizado VITEK II® (BioMérieux) conforme instruções do fabricante. Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KPRC) foram determinados de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017).

### 4.3 Confirmação da identidade dos isolados pela PCR

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN®), conforme instruções do fabricante. A confirmação da identidade dos isolados foi realizada através da amplificação da região intergênica dos genes 16S-23S rRNA específica de *K. pneumoniae* (Pf 5' - ATTTGAAGAGGTTGCAA - 3' e Prf 5' - CGATCGAAGATGTTTCACTTCTGATT - 3') (Liu et al., 2008). O volume da mistura de

cada reação totalizou 25 µL contendo os seguintes reagentes: 50 pmol/µL de cada iniciador, mastermix 1X (PROMEGA), ~20ng de DNA genômico e água deionizada estéril q.s.p (INVITROGEN®). A cepa de referência *K. pneumoniae* INCQS 00147/ATCC 13883 foi utilizada como controle positivo e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, temperatura ótima de anelamento e 72°C por 2 min mais um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) com GelRed™ 1X (BIOTIUM). O produto da PCR será visualizado em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com 1X de GelRed e fotografado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS). Após a identificação molecular, os isolados foram preservados por liofilização e depositados na Coleção de Microrganismos Ambientais e Clínicos do INCQS/FIOCRUZ.

#### 4.4 Pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos

A pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> e *bla*<sub>BKC</sub>), metalo-β-lactamases (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>SPM</sub>) e fosfoetanolamina transferase (*mobile colistin resistance - mcr-1*) foi realizada utilizando-se iniciadores específicos (Tabela 1). A mistura para a PCR teve o volume final de 25 µL contendo 1X de PCR Master Mix (PROMEGA); 15 pmol de cada iniciador; cerca de 20 ng de DNA molde e água Gibco® completando o volume. As condições de ciclo consistem de um passo inicial de 95°C durante 5 min, e 35 ciclos de amplificação a 95°C durante 1 minuto, temperatura de anelamento adequado (Tabela 1) durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto. E um alongamento final a 72°C durante 6 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) com GelRed™ 1X (BIOTIUM). A análise foi realizada no equipamento de pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS). Foram



utilizados controles positivos (Tabela 1) e uma alíquota de água deionizada estéril para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura.

Tabela 1 - Primers utilizados na detecção de genes de carbapenemase, metalo- $\beta$ -lactamase e fosfoetanolamina transferase

Gene	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência	Controle positivo
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	TGTCACTGTATCGCCGTC	900	YIGIT et al., 2001	<i>K. pneumoniae</i> INCQS 00628/ATCC BAA1705
	CTCAGTCTCTACAGAAAACC			
<i>bla</i> <sub>BKC</sub>	ACATAATCTCGCAACGGGCG	513	NICOLETTI et al., 2015	<i>E. coli</i> BL21+pET-26BKC-1
	TCGCCGGTCTTGTTTCATCAC			
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743	POIREL et al., 2004	<i>K. pneumoniae</i> CCBH 24264
	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GATGGTGTGTTGGTTCGCATA	390	Mohamed Al-Ahmady, 2010	<i>P. aeruginosa</i> CCBH 20008
	CGAATGCGCAGCACCAG			
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	660	MULVEY et al., 2011	<i>K. pneumoniae</i> CCBH 24172
	CGGAATGGCTCATCACGATC			
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	232	Toleman, 2002	<i>P. aeruginosa</i> CCBH 24208
	GTCGCAACGACTGTGTAG			
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	AAAATCTGGGTACGCAAACG	800	Poirel et al., 2011	<i>P. aeruginosa</i> CCBH 25732
	CATTATCCGCTGGAACAGG			
<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	LIU et al., 2016	<i>E. coli</i> CCBH 23595
	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.5 Relação clonal dos isolados KPRC pela Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR (ERIC-PCR)

Foi utilizado o iniciador ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') com protocolo previamente descrito (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de 2% de agarose ultrapura (INVITROGEN) em tampão TAE 1X por 30 minutos a 55 V e 1 hora e 45 minutos a 75 V, e em seguida corados com GelRed™ 1X (BIOTIUM). O gel foi fotografado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS), os padrões de bandas foram analisados através do programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) e o dendograma foi construído com a utilização do índice de *Dice* e o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) (VAN BELKUM et al., 2007).

#### **4.6 Determinação da relação clonal dos isolados produtores de *bla*<sub>NDM</sub> por *Multilocus sequence type* – MLST**

A análise genotípica de isolados carreando o gene *bla*<sub>NDM</sub> foi realizada de acordo com o *Klebsiella Sequence Typing by Pasteur Institute MLST Database* (<https://bigsddb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). A amplificação dos genes *housekeeping* (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB*) foi realizada conforme descrito anteriormente e as sequências de nucleotídeos foram sequenciadas com terminadores fluorescentes (BigDye; Applied Biosystems, Foster City, CA) em Applied Biosystems ABI Prism 3730. As sequências foram submetidas ao banco de dados do MLST para determinar os números alélicos e ST, quando possível os novos STs foram atribuídos.

## **5 RESULTADOS**

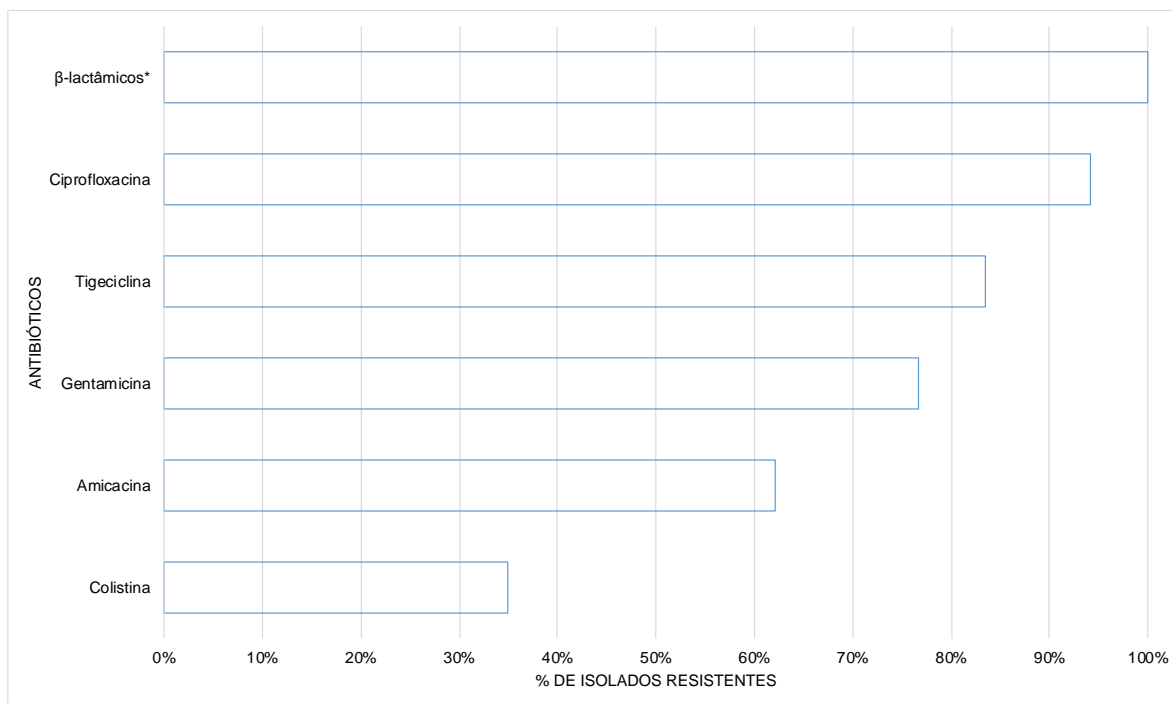
### **5.1 Identificação dos isolados**

Foram coletados 4453 swabs retais de cultura ativa oriundos de pacientes internados na UTI adulto e pediátrico de um hospital federal no Município do Rio de Janeiro, entre março de 2016 e março de 2017. Destes, 1151 apresentaram crescimento presuntivo de enterobactérias produtoras de carbapenemase. Cento e oito isolados foram identificados como KPRC pelo VITEK II. Posteriormente, a identidade de 103 isolados foi confirmada pela PCR.

### **5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

Todos os 103 isolados foram resistentes aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos como ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, cefepime, ceftazidima, cefuroxima, ceftriaxona e ceftazidima. Em relação às fluoroquinolonas, 94% (97/103) dos isolados apresentaram resistência a ciprofloxacina. Oitenta e quatro por cento (87/103) dos isolados foram resistentes a tigeciclina, 77% (79/103) a gentamicina, 62% (64/103) a amicacina e 35% (36/103) a colistina (Figura 1).

Figura 1 - Resistência aos antimicrobianos de *K. pneumoniae* isoladas a partir de culturas de vigilância. \*Ampicilina com sulbactam, piperacilina com tazobactam, ceftazidima, ceftriaxona, ceftioxina, cefuroxima, cefepime, ertapenem, imipenem e meropenem

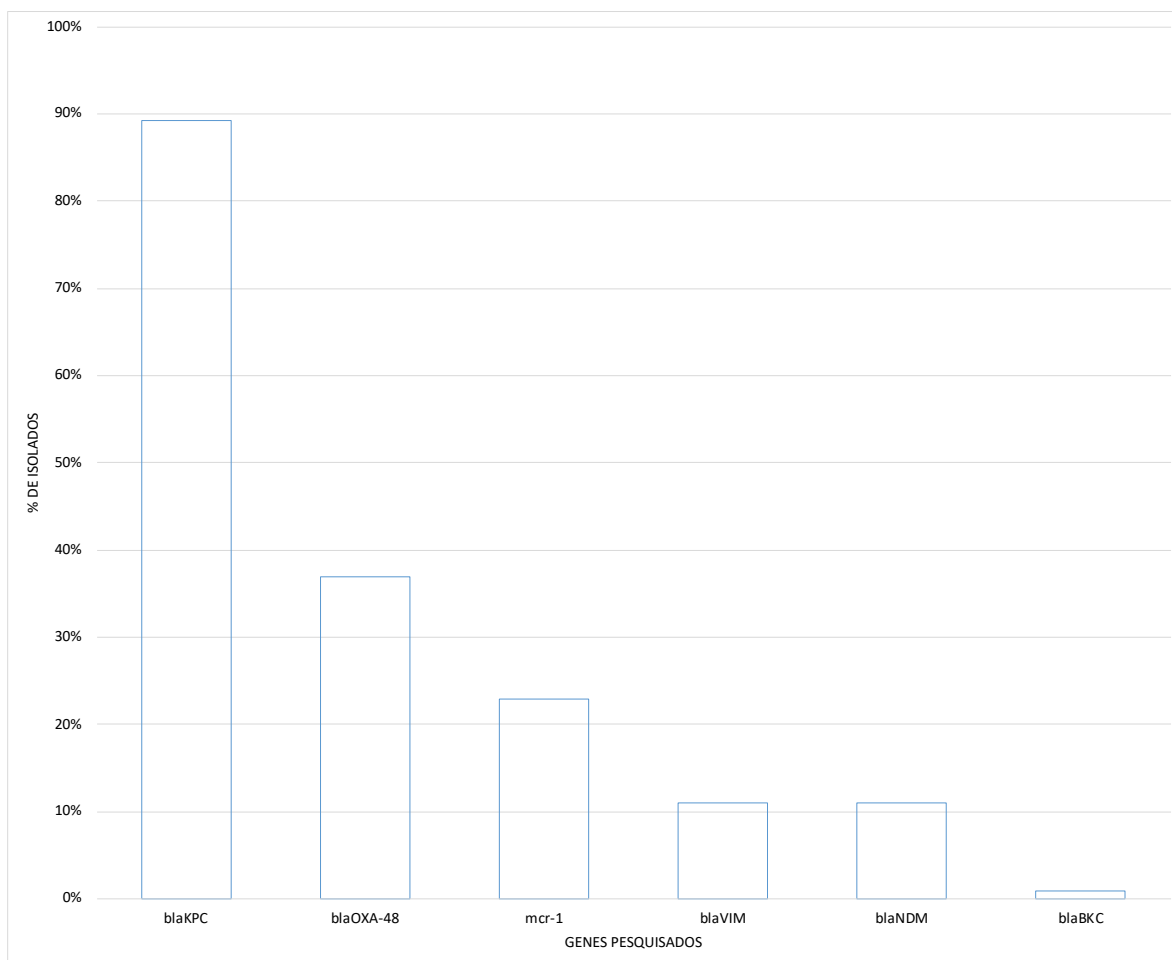


Fonte: A autora, 2020.

### 5.3 Pesquisa de genes codificadores de carbapenemases, metalo-β-lactamases e *mcr-1*

O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi encontrado em 89% (92/103) dos isolados, seguido de *bla<sub>OXA-48</sub>* em 37% (38/103), *mcr-1* em 23% (18/103) e, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* 11% (11/103), respectivamente. Enquanto isso o gene *bla<sub>BKC</sub>* foi encontrado em apenas um isolado e os genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* não foram encontrados em nenhum isolado. Vale ressaltar que dois isolados, não apresentaram nenhum dos genes pesquisados.

Figura 2 - Prevalência de genes de resistência nos isolados de *K. pneumoniae* a partir de culturas de vigilância



Fonte: A autora, 2020.

Considerando os genes de resistência pesquisados, foram determinados doze genótipos de resistência. Dos 103 isolados, 2% (2/103) não apresentaram nenhum gene pesquisado, 40% (41/103) apresentaram apenas um gene, 45% (47/103) dois genes, 10% (10/103) três genes, 3% (3/103) apresentaram quatro genes de resistência (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil genéticos de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* de acordo com os genes detectados

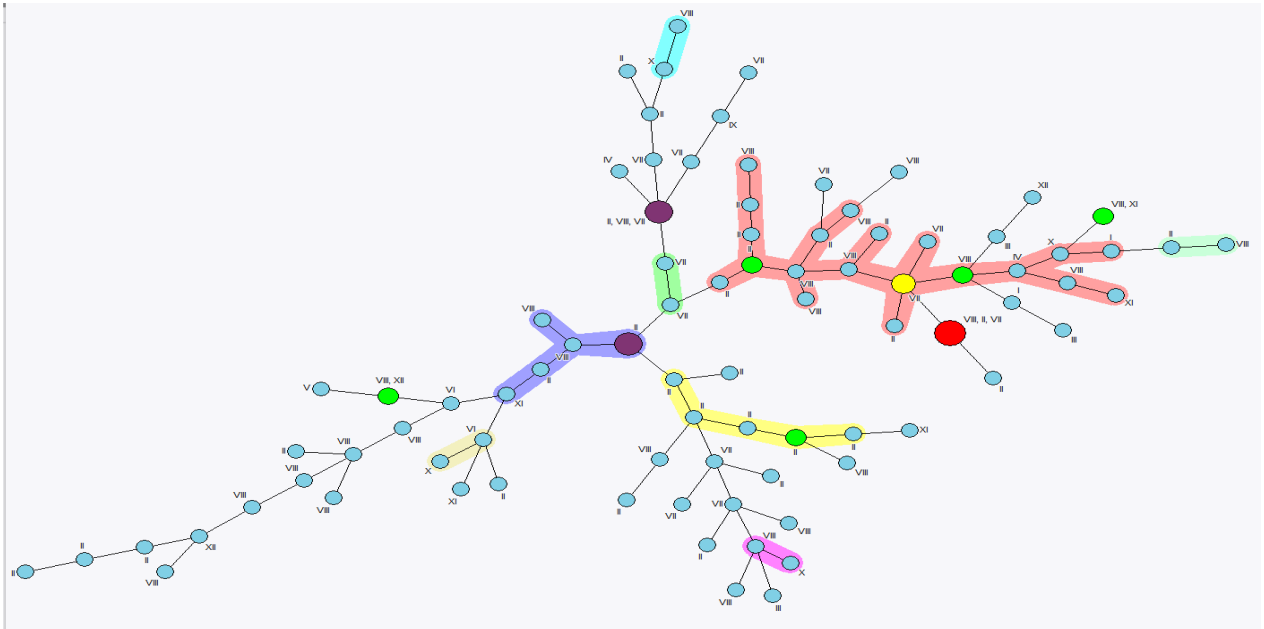
Perfis de resistência	Genótipo de resistência	% / Nº de isolados
I	Nenhum gene	2% (2/103)
II	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	35% (35/103)
III	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	3% (3/103)
IV	<i>mcr-1</i>	2% (2/103)
V	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	1% (1/103)
VI	<i>bla<sub>VIM</sub></i> e <i>bla<sub>NDM</sub></i>	2% (2/103)
VII	<i>bla<sub>KPC</sub></i> e <i>mcr-1</i>	16% (17/103)
VIII	<i>bla<sub>KPC</sub></i> e <i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	27% (28/103)
IX	<i>bla<sub>BKC</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> e <i>mcr-1</i>	1% (1/103)
X	<i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> e <i>mcr-1</i>	4% (4/103)
XI	<i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> e <i>bla<sub>NDM</sub></i>	5% (5/103)
XII	<i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> e <i>bla<sub>NDM</sub></i>	3% (3/103)

Fonte: A autora, 2020.

#### 5.4 Diversidade clonal de KPRC

Inicialmente, a diversidade genética dos 103 isolados foi avaliada através da técnica ERIC-PCR. Verificou-se uma grande variabilidade genética entre os isolados, foram 83 perfis genéticos que evidenciaram 7 possíveis grupos clonais com percentual de identidade acima de 80% (Figura 3).

Figura 3 - *Minimum spanning tree* dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases.



Legenda - Bolas azuis: n=1; bolas verdes; n=2; bolas amarelas: n=3; bolas roxas: n=4; bolas vermelhas: n=5 ou mais. I a XII – Perfil genéticos de resistência. O halo que circula alguns isolados indica a formação de possíveis complexos clonais (CC). A relação entre os isolados foi determinada pela análise com BioNumerics (BioNumerics 6.6) onde o CC é formado por isolados com mais de 80% de similaridade entre si.

Fonte: FLORES et al., 2020.

## 5.5 Epidemiologia molecular de isolados produtores de *bla<sub>NDM</sub>*

Entre os 103 isolados, 11% (11/103) apresentaram o gene *bla<sub>NDM</sub>* e foram agrupados em três perfis de resistência e quatro genótipos de resistência (Tabela 1). Nove isolados foram classificados como multidroga resistentes (MDR), um como extensivamente droga resistente (XDR) e um como Pandrug resistente (PDR) com altas porcentagens de resistência a  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos e ciprofloxacina 90% (10/11), tigeciclina 82% (9/11), gentamicina 73% (8/11) e amicacina 18% (2/11) (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM

Cepas	Idade	Fenótipo	Resistência		ST
			Perfil	Genótipo	
P5335	72	AK;CIP;GEN;TIG;COL	PDR	NDM/VIM/KPC	4050
P5336	NI	CIP;TIG;GEN;COL	XDR	NDM/VIM/KPC	4051
P5337	64	CIP;TIG	MDR	NDM/VIM/KPC/OXA-48	515
P5339	7 mouth	TIG;GEN	MDR	NDM/VIM/KPC	4054
P5430	2	CIP;TIG;GEN	MDR	NDM	4047
P5435	2	CIP;TIG;GEN	MDR	NDM/VIM	4048
P5462	84	CIP;TIG;GEN	MDR	NDM/VIM/KPC	4049
P5678	37	CIP;TIG	MDR	NDM/VIM/KPC	661
P5750	83	CIP	MDR	NDM/VIM/KPC/OXA-48	4052
P5763	76	CIP;GEN;AK	MDR	NDM/VIM	15
P5773	73	CIP;TIG;GEN	MDR	NDM/VIM/KPC/OXA-48	4053

Fonte: FLORES et al., 2020.

Além disso, dois isolados (P5335 e P5336) exibiram resistência à colistina, mas não carregavam genes relacionados a *mcr*. Vale ressaltar que um desses isolados (P5335) foi resistente a todos os antimicrobianos analisados. Vinte e sete por cento (3/11) dos *K. pneumoniae* que abrigam NDM revelaram co-ocorrência com KPC, OXA-48 e tipo VIM, 46% (5/11) com KPC e VIM, 18% (2/11) com o VIM.

A análise genotípica dos 11 isolados que abrigam o gene *bla*<sub>NDM</sub> revelou 11 STs diferentes, sendo 8 (ST4047, ST4048, ST4049, ST4050, ST4051, ST4052, ST4053 e ST4054) novos e 3 (ST15, ST515, ST661) descritos anteriormente (Tabela 3) Os dois complexos clonais (CCs) encontrados neste estudo, incluindo CC258 (P5336 e P5339) e CC15 (P5337, P5435 e P5763) (Tabela 4).



Tabela 4 - Proposição de agrupamento do complexo clonal de cepas que compartilham 5 ou mais alelos entre ST

Cepa	ST	Alelos de genes do MLST						tonB	CC
		gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB		
MLST database	258	3	3	1	1	1	1	79	258
	15	1	1	1	1	1	1	1	15
	515	2	1	1	1	1	1	4	15
	661	4	3	1	36	9	10	14	661
P5335	4050	47	3	1	36	9	10	14	661
P5336	4051	15	3	1	1	1	1	31	258
P5337	515	2	1	1	1	1	1	4	15
P5339	4054	15	3	1	1	1	1	329	258
P5430	4047	1	1	1	13	16	15	1	UG
P5435	4048	80	1	1	1	1	1	159	15
P5462	4049	178	4	6	1	7	4	38	UG
P5678	661	4	3	1	36	9	10	14	661
P5750	4052	18	22	26	1	98	37	194	UG
P5763	15	1	1	1	1	1	1	1	15
P5773	4053	47	1	1	1	7	4	65	UG

Fonte: FLORES et al., 2020.

## 6 DISCUSSÃO

O controle e a prevenção da disseminação da resistência microbiana aos antimicrobianos pelos serviços de saúde é imperativo nos dias atuais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020). O isolamento precoce de pacientes colonizados por microrganismos MDR é medida padrão de controle de infecção para reduzir o risco de transmissão entre pacientes e dessa forma reduzir os casos de infecção hospitalar (LEDOUX et al., 2016; STRICH; PALMORE ,2017). Sendo assim, as culturas de vigilância tornaram-se uma ferramenta essencial em programas de controle de infecção, não apenas durante surtos, mas também como uma medida de rotina em ambientes endêmicos para CRE. Recomenda-se a vigilância da linha de base para determinar a prevalência e tipos de enzimas carbapenemases que circulam em uma instituição sendo importante para fins de vigilância, controle de infecção e tratamento (RICHTER; MARCHAIM,2017).

Desta forma, é de extrema importância implementar medidas de prevenção que devem ser realizadas por toda equipe multiprofissional, como higienização das mãos, medidas de precauções de contato, realização de coleta de *swab* retal, técnica de vigilância mais utilizada na detecção de linhagens MDR que colonizam o trato gastrointestinal (STIER et al, 2016; FOSHI et al, 2019).

O trato gastrointestinal é considerado um reservatório comum e significativo de *K. pneumoniae* em termos de risco de transmissão e infecção (Martin e Bachman, 2018). Estudos mostraram que a colonização por *K. pneumoniae* esta associada a infecções subsequentes em pacientes internados. Além disso, 80% de concordância foi demonstrada em isolados de *K. pneumoniae* capazes de colonizar e infectar pacientes (MARTIN et al., 2016; GORRIE et al., 2017)

Na última década, *K. pneumoniae* emergiu como uma grande ameaça à saúde pública, principalmente devido ao aumento da prevalência de infecções associadas à assistência à saúde causadas por cepas multidroga resistentes (WYRES et al, 2020). Além de ser um problema clínico significativo, é nesta espécie que vários novos genes de resistência aos antimicrobianos vêm sendo descobertos (por exemplo, os genes KPC, OXA-48 e NDM-1). Embora a contribuição de *K. pneumoniae* para a crise global

de RAM seja impossível de quantificar, as evidências atuais sugerem que esta possui uma ampla distribuição ecológica, composição de DNA significativamente variada, maior diversidade de genes de resistência (WYRES et al,2018).

No Brasil, muitos estudos têm revelado a presença de *K. pneumoniae* em infecções nosocomiais. Um estudo realizado em um hospital no sudoeste do Paraná em 2017, registrou 289 casos de infecções hospitalares, sendo 7,3% desse total causadas por *K. pneumoniae*. Ainda nesse estudo, das 109 infecções na UTI Neonatal 11,9% (13) foram causadas por *K. pneumoniae* (DA SILVA; VELASQUEZ, 2017). Outro estudo no Paraná também apontou que 8,9% do total de infecções hospitalares na UTI Adulto e 10,1% na UTI Neonatal tinham como agente etiológico a *K. pneumoniae* (GASPAR, BUSATO AND SEVERO, 2012).

Alvim e colaboradores (2019) também demonstraram a prevalência de *K. pneumoniae* (68%) principalmente, em infecções de corrente sanguínea (ICS), infecções do trato respiratório e trato urinário relatadas em um hospital em Minas Gerais. Estudos mostraram a prevalência desse microrganismo em ICS e destacam a importância deste agente etiológico no contexto epidemiológico atual. Esse microrganismo mostrou resistência à maioria dos antimicrobianos comumente usados em UTIs e têm sido associados à presença de mecanismos de resistência moveis. Além disso, quando mais de um gene resistente é codificado na mesma estrutura genética, como plasmídeos, leva ao fenômeno da co-resistência (PONS; RUIZ, 2019).

No presente estudo, avaliamos os genótipos de resistência, bem como, as relações clonais de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos de culturas de vigilância ativa em pacientes admitidos em uma UTI no Rio de Janeiro. Os sistemas automatizados, embora eficientes, apresentam limitações em relação a identificação dos mecanismos envolvidos na resistência microbiana. Esses sistemas muitas vezes necessitam de complementação por testes fenotípicos e/ou genotípicos para a determinação dos mecanismos de resistência (NOWAKONSKI et al., 2015).

Além de 100% de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, foi revelada alta taxa de resistência as fluoroquinolonas (94%) e a tigeciclina, aminoglicosídeos e colistina. A taxa de resistência à ciprofloxacina entre isolados vem aumentando significativamente. Um estudo em Taiwan demonstrou que a taxa de resistência à

ciprofloxacina entre *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foi de 18,5%, o que é muito menor do que o mostrado no presente estudo (94%) (LIN et al., 2016). Como as fluoroquinolonas são antibióticos alternativos aos carbapenêmicos no tratamento de *K. pneumoniae*, esse aumento da resistência gera grande preocupação clínica. No Brasil, estudos demonstram que a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPRC), de origem clínica e ou de colonização, também apresentam alta resistência a diferentes classes de antibióticos (PEREIRA et al., 2013; FERREIRA et al, 2019).

Assim, o uso constante de antimicrobianos carbapenêmicos no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* levou aumento do uso de polimixinas (polimixina B e colistina) e tigeciclina como últimas opções para o tratamento de infecções graves causadas por este microrganismo (CHIOTOS et al,2017). Muitos estudos vêm revelando o aumento nas taxas de resistência à tigeciclina (83%) e colistina (35%) quando comparados a estudos anteriores (AIRES et al, 2019; FERREIRA et al, 2019). DEGLMANN e colaboradores (2019) também observaram que em pacientes com IRAs admitidos em UTI de um hospital público em Santa Catarina houve um aumento na resistência à colistina (80%) e à tigeciclina (45,5%). O mesmo foi encontrado em hospitais de São Paulo, onde isolados de KPRC apresentaram resistência à colistina (27,1%) (BARTOLLETTI et al, 2016). Estudos brasileiros realizados na região sudeste também relataram aumento na resistência à polimixina desde 2009 (BRAUN et al, 2018; ROSSI et al, 2017, RODRIGUES, 2019).

O surgimento e a disseminação de ERCs produtoras de carbapenemases e metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) são uma preocupação clínica e de saúde pública, resultando em dificuldades no tratamento. Inúmeros pesquisadores têm detectado essas enzimas nas mais diversas partes do mundo, como por exemplo em Teerã, isolados clínicos de *K. pneumoniae* carreavam os genes *bla<sub>VIM</sub>* (8,1%), *bla<sub>oxa-48</sub>* (27%) e *bla<sub>KPC</sub>* (24,3%) (SEDIGHI et al, 2017). Por outro lado, isolados de KPRC em um hospital na Turquia apresentaram genes *bla<sub>NDM</sub>* (52,9%), *bla<sub>oxa-48</sub>* (39,8%), *bla<sub>KPC</sub>* (2,0%) e *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>oxa-48</sub>* (5,9%) (SAGIROGLU et al, 2018). Estudos de LÓPEZ-GONZÁLEZ e colaboradores (2019) com enterobactérias de diversas amostras clínicas isoladas entre 2014 e 2016 na Espanha, revelaram que 56,7% apresentavam o gene *bla<sub>oxa-48</sub>*, 24,3%

*bla<sub>KPC</sub>* e 19% *bla<sub>VIM</sub>*. Nesse mesmo estudo, o gene *bla<sub>KPC</sub>* foi prevalente em isolados de 2014, enquanto em isolados de 2016 o *bla<sub>OXA-48</sub>* foi predominante. Uma possível explicação para a mudança epidemiológica de *bla<sub>KPC</sub>* para *bla<sub>OXA-48</sub>* nesse hospital pode estar relacionada a disseminação de ERCs através do território espanhol. Portanto, esse hospital estaria representando apenas uma pequena parte do que é de fato um fenômeno de âmbito nacional (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al, 2019). Já nesse presente estudo, demonstramos a prevalência de *bla<sub>KPC</sub>* seguida por *bla<sub>OXA-48</sub>*, o que revela a alta variabilidade de enzimas carbapenemases e sua rápida disseminação.

A coprodução de KPC com outras carbapenemases, como VIM e NDM em *K. pneumoniae* foi relatada em diferentes países, incluindo Itália (RICHTER et al, 2009), Grécia (GIAKKOUIA et al, 2009) e China (HU et al, 2014), indicando sua distribuição mundial (KUMARASAMY et al, 2012; CANDEVIR et al, 2017; IRAZ et al, 2015). O mesmo foi demonstrado no presente estudo, onde isolados de culturas de vigilância apresentaram a coprodução de KPC, NDM, VIM e OXA-48 além da resistência a gentamicina, ciprofloxacina, tigeciclina e colistina.

No Brasil, o gene *mcr-1* foi descrito em *E. coli* isoladas de animais (FERNANDES et al., 2016) e em amostras clínicas (SELLERA et al., 2017) e recentemente encontrado em associação ao *bla<sub>KPC-2</sub>* (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017). Em nosso estudo, também encontramos 17 isolados carregando *mcr-1* em associação ao *bla<sub>KPC</sub>*. O *mcr-1* em linhagens que produzem KPC pode promover a disseminação de isolados resistentes a colistina e carbapenêmicos (DALMOLIN et al, 2018). Em outro estudo houve a colonização simultânea por *E. coli* (ST744), portadora de *mcr-1* e *K. pneumoniae* (ST101) (NETO et al., 2019).

No presente estudo, a análise da diversidade genética dos 103 isolados pela ERIC-PCR revelou uma grande variabilidade genética entre os isolados, demonstrando pequena relação epidemiológica entre eles. Os isolados foram distribuídos em 83 perfis genéticos distintos com no máximo 50% de similaridade. Apesar disso, verificamos cepas com percentual de similaridade acima de 80%, apesar de formarem sete pequenos possíveis complexos clonais mostraram características distintas em relação à susceptibilidade aos antibióticos e ao perfil de genes de resistência.

Recentemente, isolados portando o gene *bla<sub>KPC</sub>* foram relatados em quase todas as regiões do Brasil (SHEN et al., 2009; CUZON et al., 2011; KERDSIN et al., 2019). Enquanto a enzima NDM-1, descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolado de um paciente indiano na Suécia em 2008 (DI TELLA et al., 2019), já possui pelo menos vinte e oito NDM variantes relatadas em todos os continentes (LOGAN et al., 2017).

No presente estudo também avaliamos as relações clonais de 11 isolados carreando o gene *bla<sub>NDM</sub>* pelo esquema do MLST. Estes isolados apresentaram resistência a outras classes de antimicrobianos, incluindo gentamicina, ciprofloxacina e tigeciclina. Altas taxas de resistência aos aminoglicosídeos podem ser atribuídas ao uso excessivo de gentamicina, além da possibilidade da presença do gene *aac(3)-II* no mesmo elemento genético móvel portador dos genes de carbapenemases (DZIRI et al., 2019).

Em contrapartida, outro estudo relatou um KPRC suscetível a diferentes aminoglicosídeos, como a gentamicina (TZOUVELEKIS et al., 2014), o que pode estar relacionado à estabilidade de plasmídeos na presença ou ausência de pressão seletiva (SMETS et al., 2005; WEIN et al., 2019). Em relação ao tratamento, o uso de gentamicina isolada ou em a combinação com tigeciclina tem sido usada para reduzir a mortalidade por sepse causada por CRE (GONZALEZ-PADILLA et al., 2015). É importante notar que, no presente estudo, as altas porcentagens de KPRC foram resistentes à gentamicina e à tigeciclina.

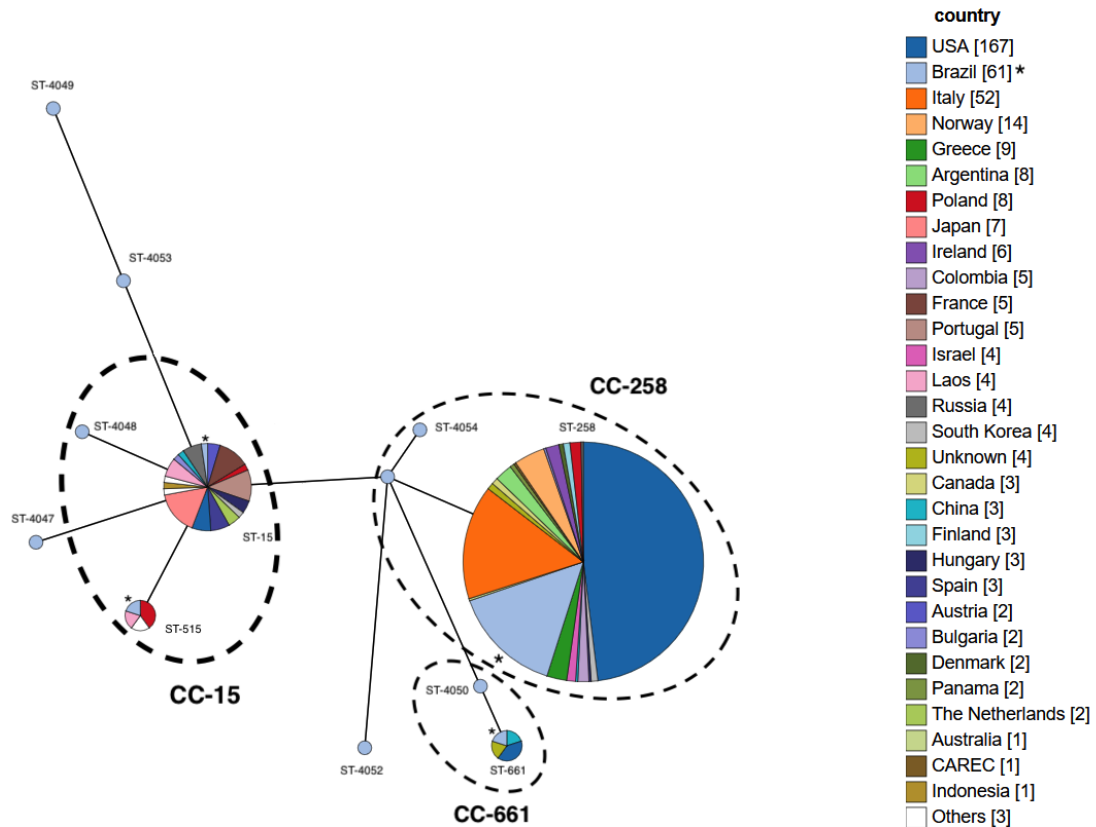
Durante as últimas décadas, a resistência aos carbapenêmicos entre *K. pneumoniae* é normalmente causada pela emergência de carbapenemases transmissíveis, como KPC e NDM. NDM compreende, especialmente, um dos grupos de MBLs de maior crescimento (YONG et al., 2009; KIAEI et al., 2019). Eles têm sido cada vez mais detectados em diferentes países, sugerindo uma disseminação mundial (DZIRI et al., 2019; KIAEI et al., 2019). Assim, os antimicrobianos carbapenêmicos estão se tornando cada vez mais ineficazes e apenas algumas opções terapêuticas estão disponíveis, como a colistina (PEREZ, 2018).

De acordo com NORDMANN et al., a maioria das bactérias produtoras de NDM também carregam uma diversidade de outros mecanismos de resistência, incluindo ESBLs (especialmente CTX-M-15) e diferentes carbapenemases (por exemplo, tipos

OXA-48, VIM e KPC) (NORDMANN et al., 2011). O fenômeno de coexistência de determinantes de resistência a múltiplos medicamentos em uma única cepa tornou-se muito comum (CHEN et al., 2011; ANDRADE et al., 2014; ZHANG et al., 2019). Por outro lado, outro estudo que avaliou a relação genética e determinantes moleculares da resistência aos carbapenêmicos em cepas clínicas, revelou que nenhum dos 100 KPRC abrigava os genes KPC ou VIM. No entanto, eles exibiram uma prevalência de OXA-48 e NDM, bem como um aumento na taxa de resistência à colistina, polimixina B, fosfomicina e tigeciclina, e alguns aminoglicosídeos (JAFARI et al., 2019). A existência de pelo menos dois genes carbapenemase em KPRC também foi relatada em todo o mundo, incluindo KPC e VIM na Itália (RIPABELLI et al., 2018; DI TELLA et al., 2019; PERILLI et al., 2013), KPC-2 e VIM-24 na Colômbia (ROJAS et al., 2013), NDM-1 e KPC-2 no Brasil (PEREIRA et al., 2015), e NDM-1 e OXA-181 em Cingapura (BALM et al., 2015).

No presente estudo, relatamos pela primeira vez *K. pneumoniae* de culturas de vigilância carreando até quatro carbapenemases (NDM, KPC, OXA-48 e VIM) e pertencentes ao ST515. Dados de epidemiologia molecular baseados em MLST mostraram a variedade de STs de *K. pneumoniae* associados a genes de resistência, como ST258, que é o ST com genótipo resistente aos carbapenêmicos prevalente nos Estados Unidos, Brasil, Itália, Noruega e Grécia (LEE et al., 2016; PITOUT et al., 2015; BOSZCZOWSKI et al., 2019; FLORES et al., 2020) (Figura 4).

Figura 4 - Distribuição de ST entre as localizações geográficas. CC, complexo clonal.



Fonte: FLORES et al., 2020.

Um estudo realizado na Rússia também mostrou que o ST340 estava associado com *K. pneumoniae* produtora de NDM (AGEEVETS et al., 2014). Evidências recentes mostraram que a epidemiologia global está mudando, com o surgimento de novas linhagens, como isolados KpV\_S\_1 e KpV\_S\_2 pertencentes a ST661 e ST307, respectivamente, recentemente relatados como responsáveis por surtos em vários países europeus.

A detecção do gene *bla<sub>VIM-1</sub>* em clones não predominantes de *K. pneumoniae* em ambiente hospitalar também são fortes evidências de alterações epidemiológicas na Itália (PIAZZA et al., 2019). Na Argentina, o ST258 não é mais o clone absoluto entre os isolados KPC-Kp com o surgimento de linhagens mais virulentas, como a hiper mucoviscosa ST25 e o surgimento do clone de alto risco ST307 (HAASE et al., 2013).



No presente estudo, as 11 linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de NDM foram agrupadas em 11 STs diferentes, sendo 8 novos e 3 descritos anteriormente (ST515, ST661 e ST15). Seis dos oito novos STs foram associados a cepas MDR, além de um isolado PDR pertencente ao ST4050. De acordo com o banco de dados MLST, ST661 é uma linhagem rara isolada apenas na China e nos Estados Unidos, e foi implicada em um surto no Reino Unido, que envolveu a propagação clonal de *K. pneumoniae* produtora de KPC e a disseminação do plasmídeo pKpQIL-D2-KPC-2 (MARTIN et al., 2017). Já o ST15 é um genótipo disseminado em todo o mundo, mas nunca foi relatado como fonte de surtos hospitalares de KPRC. Conforme relatado anteriormente (MARKOVSKA et al., 2015; TADA et al., 2017; CHUNG et al., 2015; ZHOU et al., 2016), a cepa ST15 isolada neste estudo apresentou um perfil MDR associado aos genes *bla*<sub>VIM</sub> e NDM, sugerindo uma alta capacidade de transferência horizontal de genes de resistência (BERGLUND et al., 2019). De fato, o sequenciamento do genoma completo de cepas *K. pneumoniae* do ST15 revelou alta resistência antimicrobiana compartilhando um ancestral comum com 140 cepas de *K. pneumoniae* disseminadas globalmente (DE MAN et al., 2016).

Outro genótipo encontrado no presente estudo, ST515, foi relatado na Polônia e no Vietnã como um agente de infecção esporádica. É importante notar que ST515 e ST15 compartilham 5 alelos MLST (Tabela 4), sugerindo um agrupamento no mesmo CC15 que vem se estabelecendo entre portadores saudáveis e pacientes no ambiente hospitalar ou fora das unidades de saúde. Os STs 4051 e 4054 estão intimamente relacionados ao ST258 associado à resistência antimicrobiana, compartilhando 5 alelos, e sendo agrupados em CC258 (Tabela 4). As cepas desses dois STs apresentaram os genes *bla*<sub>KPC</sub>, NDM e VIM, além de alta resistência a b-lactâmicos, ciprofloxacina, tigeciclina e gentamicina.

Os dados obtidos no presente estudo ressaltam a importância de culturas de vigilância como ferramenta preventiva, destacando-se a necessidade de identificação de mecanismos de resistência e genes envolvidos, que poderão colaborar com a prevenção da crescente e relevante multirresistência bacteriana.

## 7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo revelam novos clones de KPRC multirresistentes de culturas de vigilância que podem representar uma preocupação para as autoridades de saúde em relação à disseminação da resistência aos antibióticos. Notavelmente, dos oito novos STs descritos neste estudo, dois são resistentes à colistina, porém sem alelos *mcr* (1 a 8), mas apresentando coprodução de KPC, NDM e VIM.

A presença de NDM nos 11 diferentes STs pode refletir a possibilidade de transferência de plasmídeo carregando vários genes carbapenemases, como foi relatado em todo o mundo. Este evento pode ter consequências graves para a saúde pública, levando a uma maior disseminação de genes antimicrobianos e microrganismos MDR, tornando o tratamento contra patógenos bacterianos difícil.

O programa de cultura de vigilância ativa pode ser considerado uma abordagem essencial para combater a ameaça de resistência antimicrobiana. Além disso, a divulgação de nossos dados deve ser compartilhada tanto com a comunidade científica quanto com as principais partes interessadas, incluindo a população e tomadores de decisão governamentais.

## REFERÊNCIAS

- AGEEVETS, V.A. *et al.* Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v.44,p.152-155, 2014.
- AIRES, C.A.M. *et al.* Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, 2017.
- AIRES, C.A.M. *et al.* Population Structure of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Surveillance Rectal Swabs in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 26, n. 6, p. 652-660, 2019.
- AKHSHI, B.; AFSHARI, N.; FALLAH, F. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected *Shigella* spp. outbreaks. **Braz. J. Microbiol.**, v. 49, n. 3, 2018.
- AKTAŞ, Z. *et al.* First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, p. 695-6, 2006.
- ALI, A.H.I.; OMER, F. Molecular Characterization of Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* Dominance of OXA-48, KPC, VIM and NDM Producers in Khartoum. **Sudan**, v. 2, n. 3, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Orientações para vigilância epidemiológica e notificação nacional das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), da Resistência Microbiana (RM) e do consumo de antimicrobianos.** Brasília: ANVISA, 2020.
- BALM, M.N. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 19, n. 9, p. 421-3, 2013.
- BARTOLLETTI F. *et al.* Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Brazil Emerg Infect Dis.**, São Paulo, v. 22, n. 10, p. 1849-1851, 2016.
- BASSETTI M. *et al.* Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria. **Front Med.**, v. 6, n. 74, 2019.
- BEN-DAVID D. *et al.* of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **Infect Control Hosp. Epidemiol.**, v. 31, n. 6, 2010.
- BERRGLUND, B. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of clinical isolates belonging to a KPC-2-producing strain of ST15 *Klebsiella pneumoniae* from a Vietnamese pediatric hospital. **Antimicrob Resist Infect Control.**, v. 8, n. 156, 2019.

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. **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, v. 61, n. 29, 2019.

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. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, n. 3, p. 522-27, 2018.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Nomenclature of TEM beta-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 1-3, 1997.

CANDEVIR, U. *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* at a Turkish centre: Is the increase of resistance a threat for Europe? **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 10-16, 2017.

CHIOTOS, K. *et al.* Use of Carbapenems, Polymyxins, and Tigecycline in United States Children's Hospitals, 2010-2014. **Open Forum Infect. Dis.**, v.4, n. 2, 2017.

CHUNG THE H. *et al.* A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO Mol Med.**, v. 7, n. 3, p. 10-16, 2015.

CONCEIÇÃO NETO ,O.C. *et al.* Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 50, n. 2, p. 282-4, 2017;.

CUZON,G.; NAAS,T.; NORDMANN.P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, 2011.

VAN DUIN, D. *et al.* Tigecycline therapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, n. 12, 2014.

DALMOLIN, T. V. *et al.* Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **J Antimicrob Chemother Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 2404-6, 2017.

DALMOLIN, T. V.; LIMA-MORALES, D.; BARTH, A. L. Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? **J Infectiology**, v. 1, n. 2, p. 16-22, 2018.

DAVARCI, I. *et al.* Molecular Epidemiology of Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Anatol Clin.**, 2019.

DE MAN, T.J.B. *et al.* Genomic analysis of a pan-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae*, United States. **American society for microbiology**, v. 9, 2018.

DEGLMANN, R.C.; OLIVEIRA, D.; FRANÇA, P.H.C. Phenotypical profile of colistin and tigecycline resistance in a public hospital in Brazil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 9, n. 4, 2019.

DEL BIANCO ,F. *et al.* Comparison of Four Commercial Screening Assays for the Detection of blaKPC, blaNDM, blaIMP, blaVIM, and blaOXA48 in Rectal Secretion Collected by Swabs. *Microorganisms*. **Microorganisms**, v. 7, n .12, p. 704, 2019.

DI PILATO, V. *et al.* mcr-1. 2, a new mcr variant Carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 5612–5615, 2016.

DI TELLA, D. *et al.* Molecular epidemio-logical insights into colistin-resistant and carbapenemases-producing clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Infect. Drug Resist.**, v. 12, p. 3783-3795, 2019.

DZIRI, R., I. *et al.* First report of NDM and VIM copro-ducing *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia and emergence of novel clones. **Microb. Drug Resist.**, v. 25, p.1282-1286, 2019.

EFFAH ,C.Y. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 19, n. 1, p. 1, 2020.

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

FERREIRA, R.L. *et al.* High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and  $\beta$ -lactamase encoding genes in a brazilian intensive care unit. **Front. Microbiol.**, v. 9, 2019.

FLORES, C. *et al.* Genetic Relatedness of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Co-occurring VIM, KPC, and OXA-48 Enzymes from Surveillance Cultures from an Intensive Care Unit. **Microbial drug resistance**, 2020.

FOSCHI, C. *et al.* Rectal screening for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a proposed workflow. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 21, p. 86-90, 2019.

GIAKKOUP, P. *et al.* Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p.4048-4050, 2009.

GONZALEZ-PADILLA, M. *et al.* Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 70, n. 3, p. 905-913, 2015.

GORRIE, C.L. *et al.* Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. **Clin Infect Dis.**, v. 65, n. 2, p. 208-215, 2017.

HAASE, R. *et al.* [Results of surveillance cultures on a neonatal intensive care unit: a retrospective analysis]. **Z Geburtshilfe Neonatol.**, v.17, n. 2, p. 56-60, 2013.

HE Q. *et al.* Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 21, n. 15, 2016.

HO, K.W. *et al.* Active surveillance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in intensive care units: is it cost-effective in a nonendemic region? **Am J Infect Control.**, v. 44, n. 4, p. 394-9, 2016.

HU, L. *et al.* The prevalence of carbapenemase genes and plasmid-mediated quinolone Resistance determinants in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from five Teaching hospitals in central China. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, p. 1972-1977, 2014.

IRAZ, M. *et al.* Distribution of  $\beta$ -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. **Ann Lab Med.**, v. 35, p. 595-601, 2015.

JALALVAND K. *et al.* Evaluation of Phenotypic and Genotypic Characteristics of Carbapenemases-producing Enterobacteriaceae and Its Prevalence in a Referral Hospital in Tehran City. **Iran J Pathol.**, v. 15, n. 2, p. 86-95, 2020.

KANG, J.S. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Acquisition in an Emergency Intensive Care Unit in a Tertiary Hospital in Korea: a Case-Control Study. **J Korean Med Sci.**, v. 34, n. 18, 2019.

KERDSIN, A. *et al.* Genomic characterization of an emerging blaKPC-2 carrying Enterobacteriaceae clinical isolates in Thailand. **Sci. Rep**, 2019.

KIAEI, S. *et al.* Emergence of co-existence of blaNDM with rmtC and qnrB genes in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in burning center from southeast of Iran. **Folia Microbiol.**, Praha, v. 64, p. 55-62, 2019.

KUMARASAMY, K. *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, p. 597-602, 2010.

LEDOUX G. *et al.* Impact of a targeted isolation strategy at intensive-care-unit-admission on intensive-care-unit-acquired infection related to multidrug-resistant bacteria: a prospective uncontrolled before-after study. **Clin Microbiol Infect.**, v. 22, n. 10, 2016.

LEE, C. R. *et al.* Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Front Microbiol.**, v. 7, artigo 895, p.1-30, 2016.

LENTZ, S.A. *et al.* Letter to editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Euro Surveill.**, v. 21, n. 26, p. 1-2, 2016.

LIN, W.P. *et al.* The Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* from Community Settings in Taiwan, a Trend Analysis. **Sci Rep.**, 2016.

LINCOPAN, N. *et al.* Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **JMed Microbiol.**, v. 55, p. 1611-1613, 2006.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, L. *et al.* Description of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates in a Spanish tertiary hospital. Epidemiological analysis and clinical impact. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 32, n. 3, p. 254-262, 2019.

LORENZONI, V. V. *et al.* Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 51, n. 5, 2018.

MARKOVSKA, R., T. *et al.* Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. **APMIS**, v. 123, n. 10, p. 887-894, 2015.

MARTIN, J. *et al.* Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long- and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. **J Antimicrob Chemother.**, v. 72, n. 11, p. 3025-3034, 2017.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, 2018.

MARTIN, R. M. *et al.* Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **mSphere.**, v. 1, n. 5, 2016.

MARTINS, A.F. *et al.* Antimicrobial activity of plazomicin against Enterobacteriaceae-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 90, n. 3, p. 228-232, 2018.

MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.

MOTA, F. S.; OLIVEIRA, H. A.; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 270-7, 2018.

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

NETO, L. V. P.; CORSCADDEN, L.; MARTINS, R. C. R. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring mcr-1 in Brazil. **Infection**, v. 47, p. 661-664, 2019.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae worldwide. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, p. 821-30, 2014.

NORDMANN P.; NAAS T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis.**, v.17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

OLIVEIRA, P. M. N. *et al.* Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 52, 2019.

PEREIRA, P.S. *et al.* Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother.**, v. 68, n. 2, p. 312-316, 2013.

PEREIRA, P.S. *et al.* Asensi, and A.P.D.A. Carvalho-Assef. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microb. Drug Resist.**, v. 21, n. 2, p. 234-236, 2015.

PEREZ, L.R.R. An Increase in the Prevalence of KPC Nosocomial bacteremia as a trigger for growing polymyxin resistance among other multidrug-resistant non-KPC-producing Enterobacteriaceae isolates. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 39, p. 242-243, 2018.

PERILLI, M., C. *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 75, n. 2, p. 218-221, 2013.

PIAZZA, A., F. *et al.* Identification of blaVIM-1 gene in ST307 and ST661 *Klebsiella pneumoniae* clones in Italy: old acquaintances for new combinations. **Microb. Drug Resist.**, v. 25, p. 787-790, 2019.

PITOUT, J.D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

PONS, M.; RUIZ, J. Current trends in epidemiology and antimicrobial resistance in intensive care units. **Journal of Emergency and Critical Care Medicine**, v.3, 2019.



RHODES, H. *et al.* Notes from the Field: carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with *mcr-1* Gene Identified in a Hospitalized Patient. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 6, p. 171-172, 2020.

RICHTER, S.N. *et al.* KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. **Gut Pathog.**, v. 4, n. 1, p. 7, 2011.

RICHTER, S. S.; MARCHAIM D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 417-426, 2017.

RIPABELLI, G. *et al.* Tracking Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian Hospital: Molecular Epidemiology and Surveillance by PFGE, RAPD and PCR-Based Resistance Genes Prevalence. **Curr Microbiol.** v. 75, n. 8, p. 977-987, 2018.

RODRIGUES, A.C. *et al.* Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

ROJAS, L.J.; MOJICA, V.M.; BLANCO, A. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Coharboring KPC and VIM Carbapenemases in Colombia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 2, p. 1101-1102, 2013.

ROSSI, F. *et al.* Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **Braz J Infect Dis.**, v. 21, n. 1, p. 98-101, 2017.

SAĞIROĞLU.; HASDEMIRA, U.; GELMEZA, G.A. Performance of "RESIST-3 O.K.N. K-SeT" immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. **Braz. J. Microbiol**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 885-890, 2018.

SAMASTI, M. *et al.* Investigation of Carbapenemase Genes and Clonal Relationship in Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. **Bezmialem Science**, v. 7, n. 3, p. 186-90, 2019.

SELLERA, F.P. *et al.* *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *blaCTX-M* genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **J Antimicrob Chemother.**, v. 72, p. 1255-6, 2017.

SHEN, P. *et al.* Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, n. 10, p. 4333-4338, 2009.

SMETS, B.F.; BARKAY, T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. **Nat. Rev. Microbiol.**, p.675-678, 2005.

STRICH, J.R.; PALMORE, T.N. Preventing Transmission of Multidrug-Resistant Pathogens in the Intensive Care Unit. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 31, n. 3, 2017.

TADA, T. *et al.* Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. **BMC Infect Dis.**, v. 17, n. 1, p. 467, 2017.

TAVARES, C.P. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 85, n. 4, p. 326-330, 2015.

TEKELI, A. *et al.* Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. **Microb Drug Resist.**, v. 26, n. 2, p.118-125, 2020.

TOLENTINO, M. F. “**Detecção e Identificação dos genes de beta-lactamases blaSHV, blaTEM e blaCTX-M em Klebsiella pneumoniae isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo**”. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2009.

TZOUVELEKIS, L.S. *et al.* Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, n. 9, p. 862-872, 2014.

VIVAS, R. *et al.* Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 53, 2020.

Wang, C. *et al.* Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerg Microbes Infect.**, v. 9, n. 1, p. 508-516, 2020.

WANG, M. *et al.* Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. **Bosn J Basic Med Sci.**, v. 19, n. 1, p. 86-93, 2019.

WEIN, T. *et al.* Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. **Nat Commun.**, v. 10, n. 2595, 2019.

WYRES K.L.; HOLT K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Curr Opin Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 131-139, 2018.

WYRES K.L. *et al.* Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. **Genome Med.**, v. 12, n. 1, p. 11, 2020.

QIN, X. *et al.* The Colonization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Resistance Mechanisms, and Risk Factors in Patients Admitted to Intensive Care Units in China. **J Infect Dis.**, 2020.

YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZARAKOLU, P. *et al.* Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization: a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 85, p. 85, p. 466-70, 2016.

ZHOU, K. *et al.* Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum-beta-lactamase-producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. **Sci. Rep.**, 2016.