

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

TESE DE DOUTORADO

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA B EM
ENTEROBACTÉRIAS NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA**

ADSON SANTOS MARTINS

Salvador - BA
2022

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

ADSON SANTOS MARTINS

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA B EM
ENTEROBACTÉRIAS NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Joice Neves Reis Pedreira

**Salvador - BA
2022**

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

M386 p Martins, Adson Santos

Prevalência e caracterização de resistência a polimixina B em enterobactérias na cidade de Salvador, Bahia. / Adson Santos Martins. _ Salvador, 2022.

90 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Joice Neves Reis Pedreira

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Resistência à polimixina. 2. Teste da gota. 3. Escherichia coli
4. Klebsiella pneumoniae. 5. Polimixinas. I. Título.

CDU 615


“PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA B EM ENTEROBACTÉRIAS
NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA”.

ADSON SANTOS MARTINS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de dezembro 2022.

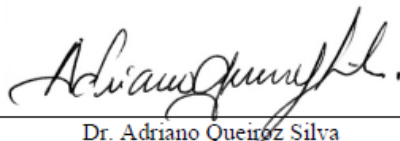
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Ricardo David Couto
Professora Titular
UFBA



Dra. Tânia Fraga Barros
Professor Adjunto I
UFBA



Dr. Adriano Queiroz Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Fundação de Amparo à Pesquisa Estado da Bahia (FAPESB).

Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana-Brasil (INPRA).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus pais, Beto e Maisa, pelo amor e paciência.

À minha irmã, pelo cuidado e, meu irmão, pela amizade.

Agradeço a vocês, minha família, pelo carinho e por estarem sempre próximos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser dono de minhas atitudes e proporcionar-me a conclusão de mais esta etapa. Senhor, tu és a quem sempre ofereço minha vida como profissional de saúde.

Aos meus pais, Vanzinho e Maisa, pela dedicação de suas vidas em meu favor e amor diário.

À minha irmã Aline, por seu coração cheio de cuidado e carinho que me conquista cada dia mais.

Ao meu irmão Mailson, pela disponibilidade.

A Luan Filipe, pela compreensão, entendimento e convívio.

À Lívia pelas conversas descontraídas.

Aos meus tios, Gordinho, Branca e Marise pela vigilância dos meus passos.

A minha avó Guiomar, pela oferta de amor aos descendentes.

À minha querida orientadora, professora Joice Neves Reis Pedreira, pela partilha de conhecimentos, e pelo real aprendizado do perfil a ser seguido no futuro que será amanhã.

À equipe de pesquisa, em especial Adrielle e Matheus, pela dedicação, sorrisos e convivência leve.

Ao professor Jailton Azevedo, pela ajuda na análise dos dados.

A Adriano pelas dicas.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular – LPBM, em especial Paula, pela disponibilidade necessária, bom humor e atenção.

A Cleiton pela competência, dinâmica e bom convívio.

Ao grupo de microbiologia da FACFAR-UFBA por tornarem esta etapa acadêmica mais produtiva e amigável.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Muniz pelo conhecimento cedido.

À Dra. Gorete por permitir a realização deste trabalho em uma das unidades de pesquisa, obrigado pelo apoio e confiança no trabalho desenvolvido.

À Dra. Vania pela contribuição no diagnóstico dos pacientes.

Aos colegas Ledilce Ataíde, Alan Malheiros e Sara Souza, obrigado pela receptividade e auxílio nas coletas.

A todos os funcionários das unidades coletadas, em especial Angélica e Aninha, pela colaboração e ajuda com os pacientes, tornando o trabalho mais agradável.

Aos funcionários da Fiocruz não vinculados ao laboratório, em especial Seu Zé Carlos, Denilton, Fernando, e Danilo, pelo atendimento e ajuda quando necessário.

Aos pacientes das unidades pela colaboração e por terem aceitado participar do estudo; Por fim, a todos que posso não ter mencionado, mas contribuíram de alguma forma nesta vitória.

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos."

(Charles Chaplin)

MARTINS, Adson Santos. **Prevalência e caracterização de resistência a polimixina B em enterobactérias na cidade de Salvador, Bahia.** 2022. 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Durante a última década, a resistência aos antibióticos de amplo espectro chegou a níveis preocupantes, especialmente em bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae. O rápido surgimento de novos mecanismos de resistência aos antibióticos, associado à alta prevalência de enzimas, que conferem resistência aos beta-lactâmicos, como beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) e Nova Deli metalo-beta-lactamase (NDM), muitas vezes limitam as opções de tratamento a antibióticos de último recurso, como polimixinas. **OBJETIVO:** Descrever a prevalência de resistência à polimixina em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* provenientes de casos de infecção de corrente sanguínea e caracterizar o mecanismo de resistência nestes isolados. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo, conduzido com bactérias isoladas de pacientes com infecção de corrente sanguínea, em hospitais terciários de Salvador, Bahia, no período de 01/04/2015 a 28/02/2019. Dados epidemiológicos foram coletados por meio de revisão de prontuários, o perfil de sensibilidade e identificação dos isolados bacterianos foram realizados por espectrometria de massa e pelo VITEK-2®. Resistência a polimixina foi investigada pelo teste da gota e microdiluição em caldo e os mecanismos de resistência determinados pela reação de polimerase em cadeia para investigar a presença do plasmídeo *mcr-1*, e detecção de genes cromossomais: *phoP/Q*, *pmrA/B* e *mgrB*. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico X^2 , exato de Fisher ou a razão de odds (intervalo de confiança de 95%); os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para avaliar a associação entre microdiluição e teste da gota foi utilizado o teste de coeficiente *Kappa de Cohen*. **RESULTADOS:** Foram avaliados 366 isolados, sendo 168 de *Klebsiella pneumoniae* e 198 de *Escherichia coli*. A triagem inicial com o teste da gota identificou 91/199 (45,7%) isolados como sensíveis à polimixina, sendo 44 (48,4%) *E. coli* e 47 (51,6%) *K. pneumoniae*. Um total de 81 (22,0%) isolados foram resistentes a polimixina, sendo 22 (27,2%) *E. coli* e 59 (72,8%) *K. pneumoniae*. Heteroresistência foi identificada em 76 dos 366 isolados analisados inicialmente (20,7%), sendo 15 (19,7%) *E. coli* e 61 (80,3%) *K. pneumoniae*. A microdiluição em caldo foi realizada para 199 isolados, sendo 78 *E. coli* e 121 *K. pneumoniae*, sendo confirmada a resistência a polimixina em 40/199 isolados de *K. pneumoniae* e em 4/199 *E. coli*. A sensibilidade do teste da gota foi de 100% e a especificidade foi de 76,1%. A investigação dos genes de resistência foi realizada nestas 44 amostras confirmadas por microdiluição. Assim, dos 44 isolados resistentes, os genes *phoQ/phoP* foi identificado em 20 (45%), o gene *pmrA* foi identificado em 30 (68%) dos isolados resistentes, sendo que em 11/30 isolados o gene *pmrB* também foi detectado. O gene plasmidial *mcr-1* foi detectado em apenas um isolado de *E. coli*. O gene *mgrB* foi encontrado em apenas um isolado de *K. pneumoniae*. Dentre os 155 isolados sensíveis a polimixina pela microdiluição em caldo 19 apresentavam os genes *phoQ/phoP*. Entre cepas com heteroresistência no teste da gota, 48/76(63%) tinham alteração nos genes *phoQ/phoP*. **CONCLUSÃO:** A resistência a polimixina é mais frequente em isolados de *K. pneumoniae* e está associada aos genes *phoQ/phoP*. O teste da gota revelou-se uma boa opção para triagem de resistência entre *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Palavras-chave: Resistência à polimixina. Teste da gota. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Polimixinas.

MARTINS, Adson Santos. **Prevalence and characterization of polymyxin B resistance in enterobacteria in Salvador, Bahia.** 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: During the last decade, resistance to broad-spectrum antibiotics has reached worrying levels, especially in bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family. The rapid emergence of new mechanisms of antibiotic resistance, coupled with the high prevalence of enzymes that confer resistance to beta-lactams, such as extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) and New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM), often limit treatment options to last-resort antibiotics such as polymyxins. **OBJECTIVE:** To describe the prevalence of resistance to polymyxin in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from cases of bloodstream infection and to characterize the mechanism of resistance in these isolates. **METHODS:** A Prospective study, conducted with bacteria isolated from patients with bloodstream infection, in tertiary hospitals in Salvador, Bahia, from 04/01/2015 to 02/28/2019. Epidemiological data were collected through review of medical records, the sensitivity profile and identification of bacterial isolates were performed by mass spectrometry and VITEK-2®. Resistance to polymyxin was investigated by the drop test and microdilution in broth and the resistance mechanisms determined by the polymerase chain reaction to investigate the presence of the *mcr-1* plasmid, and detection of chromosomal genes: *phoP/Q*, *pmrA/B* and *mgrB*. Data were evaluated using X2 statistical test, Fisher's exact test or odds ratio (95% confidence interval); p values <0.05 were considered statistically significant. To assess the association between microdilution and the drop test, the *Kappa cohen* test was used. **RESULTS:** 366 isolates were evaluated, 168 of *Klebsiella pneumoniae* and 198 of *Escherichia coli*. Initial screening with the drop test identified 91/199 (45.7%) isolates as sensitive to polymyxin, 44 (48.4%) *E. coli* and 47 (51.6%) *K. pneumoniae*. A total of 81 (22.0%) isolates were resistant to polymyxin, 22 (27.2%) *E. coli* and 59 (72.8%) *K. pneumoniae*. Heteroresistance was identified in 76 of the 366 isolates initially analyzed (20.7%), 15 (19.7%) being *E. coli* and 61 (80.3%) *K. pneumoniae*. Microdilution in broth was performed for 199 isolates, 78 of which were *E. coli* and 121 *K. pneumoniae*, with polymyxin resistance being confirmed in 40/199 isolates of *K. pneumoniae* and in 4/199 *E. coli*. The sensitivity of the drop test was 100% and the specificity was 76.1%. The investigation of resistance genes was carried out in these 44 samples confirmed by microdilution. Thus, of the 44 resistant isolates, the *phoQ/phoP* genes were identified in 20 (45%), the *pmrA* gene was identified in 30 (68%) of the resistant isolates, and in 11/30 isolates the *pmrB* gene was also detected. The *mcr-1* plasmid gene was detected in only one *E. coli* isolate. The *mgrB* gene was found in only one *K. pneumoniae* isolate. Among the 155 isolates sensitive to polymyxin by broth microdilution, 19 had the *phoQ/phoP* genes. Among strains with heteroresistance in the drop test, 48/76(63%) had alteration in the *phoQ/phoP* genes. **CONCLUSION:** Polymyxin resistance is more frequent in *K. pneumoniae* isolates and is associated with the *phoQ/phoP* genes. The drop test proved to be a good option for screening for resistance between *K. pneumoniae* and *E. coli*.

Keywords: Polymyxin Resistance. Drop test. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Vias de regulação do lipopolissacarídeo descritas por Poyrel (2017) em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. 33
- Figura 2** Esquema representativo do painel do teste POLICIMBAC® contendo 12 cavidades por linha, com concentração variável de 64 µg/mL à 0, 125µg/mL e dois poços para controle. 44
- Figura 3** Representação dos poços na microdiluição em caldo para teste de sensibilidade à polimixina. 45
- Figura 4** Placa de Muller Hinton com cultura de *Klebsiella pneumoniae* submetida a triagem com o teste da gota de polimixina, sendo em (A) com halo totalmente limpo (cepa sensível), e em B com crescimento no local da gota (cepa resistente). 50
- Figura 5** Placa de Muller Hinton com cultura de *Klebsiella pneumoniae* submetida a triagem com o teste da gota de polimixina, onde no halo vê-se colônias resistentes, evidenciando o fenômeno de heterorresistência. 51
- Figura 6** Placa de POLICIMBAC demonstrando o crescimento da cepa sensível a polimixina (CIM 0,50 µg/mL) (ATCC 25922) e uma cepa resistente (CIM 16,0 µg/mL), positiva para o gene *mcr1*. 52
- Figura 7** Placa de 96 poços utilizada para microdiluição em caldo, em duplicata, no teste de sensibilidade à polimixina com sinalização do local do controle positivo, controle de crescimento (CC) e controle negativo (ATCC25922). 57
- Figura 8** Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima de polimixina entre isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* que apresentaram resistência na triagem com o teste da gota. 53
- Figura 9** Eletroforese em agarose a 1% do produto de PCR para detecção do gene plasmidial *mcr-1* com identificação do produto com 320 pares de base na coluna 6. 59
- Figura 10** Gel da PCR para detecção do gene *mgrB* mutato/truncado. A linha branca inferior se encontra na marcação de 253 pb que corresponde ao gene *mgrB* sem mutação com 47 aminoácidos. A linha superior indica que esses fragmentos possuem 1110 pb, sugerindo a possibilidade de gene *mgrB* mutado gerando proteínas truncadas, na coluna 3. 59

Figura 11 Perfil de eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de PCR para 60
detecção do gene cromossomal *phoQ*, com detecção de fragmento de
1594pb pares de bases.

Figura 12 Perfil de eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de PCR para 61
detecção do gene cromossomal *pmrA*, com detecção de fragmento de
808pb pares de bases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de iniciadores utilizados e condições das reações de PCR.	47
Tabela 2	Características demográficas e clínicas de pacientes com infecção de corrente sanguínea por <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> em hospitais privados de Salvador, Bahia (2015-2019). (N=366).	49
Tabela 3	Caracterização do perfil de sensibilidade à polimixina dos isolados avaliados no teste da gota e na microdiluição em caldo (N= 199).	53
Tabela 4	Valores de sensibilidade especificidade, valor preditivo positivo e negativo para o teste de triagem da gota.	54
Tabela 5	Características demográficas e clínicas de pacientes com infecção da corrente sanguínea devido a <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> estratificada por sensibilidade à polimixina, conforme determinado pelo teste da gota, e confirmadas por microdiluição em caldo (N =270).	55
Tabela 6	Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> submetidos a avaliação de sensibilidade à polimixina pelo teste da gota	56
Tabela 7	Perfil de resistência a outros antibióticos entre as 44 cepas confirmadas como resistentes à polimixina, através do teste de microdiluição em caldo.	57
Tabela 8	Perfil de multirresistência em isolados de enterobactérias resistentes à polimixina em casos de infecção de corrente sanguínea em Salvador, Bahia.	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Regras para definição de multirresistência, resistência estendida e panresistência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina + Ácido clavulânico
AMI	Amicacina
ASB	Ampicilina +Sulbactam
BGN	Bacilo gram-negativo
CDC	<i>Centers For Disease Control and Prevention</i>
CAZ	Ceftazidima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIP	Ciprofloxacino
CFM	Cefixime
CLSI	<i>Clinical &Laboratory Standards Institute</i>
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPC	Enterobactéria Produtora de Carbapenemase
ERC	Enterobactéria Resistente a Carbapenêmicos
ERT	Ertapenem
ESBL	<i>Extended Spectrum Betalactamase</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FOS	Fosfomicina
GEN	Gentamicina
GN	Gram-negativo
ICS	Infecção de Corrente sanguínea
ICsS	Infeções de Corrente Sanguínea
IH	Infecção Hospitalar
IMP	Imipenem
IPCS	Infecção Primária de Corrente Sanguínea
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
ITR	Infecção do Trato Respiratório
ITU	Infecção do Trato Urinário

KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>mcr1</i>	<i>Mobilized Colistin Resistance 1</i>
MDR	Multidrograrresistente
MER	Meropenem
MIC	Concentração Inibitória Mínima
µg	Micrograma
NDM	<i>New Delhi metallobetalataamase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
OXA	Oxacilinase
OXA-23	Oxacilinase 23
OXA-48	Oxacilinase 48
<i>P</i>	Valor de Probalidade ou Valor de <i>p</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PolIR	Resistente a polimixina
PPT	Piperaciclina + Tazobactan
TIG	Tigeciclina
VIM	Ventilação Mecânica Invasiva
VM	Ventilação mecânica
Vs.	<i>Versus</i>
X^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	Infecção da corrente sanguínea por enterobactérias	24
2.2	Epidemiologia das infecções de corrente sanguínea	25
2.3	Enterobactérias e resistência a antimicrobianos	28
2.4	Polimixinas: o retorno de uma terapia antiga	33
2.4.1	Mecanismos de resistência a polimixinas em cepas de <i>k. pneumoniae</i> e <i>e. coli</i>	34
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos Específicos	41
3.3	Hipótese	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Tipo e local do estudo	42
4.2	Identificação microbiana	42
4.3	Aspectos éticos	42
4.4	Crítérios de seleção dos pacientes	43
4.5	Testes de triagem de perfil fenotípico e molecular de resistência à polimixina	43
4.5.1	Droptest (teste da gota)	43
4.6	Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	44
4.7	Extração de DNA e amplificação dos genes codificadores de resistência à polimixina	45
4.7.1	Reação em cadeia da polimerase para o gene <i>mcr-1</i>	45
4.7.2	Amplificação do gene <i>mgrB</i>	46
4.7.3	Amplificação do gene <i>phoQ</i> , <i>phoP</i> , <i>pmrA</i> e <i>pmrB</i>	49
4.8	Eletroforese dos produtos de PCR	48
4.9	Análise estatística	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Triagem do perfil de resistência (teste da gota e microdiluição em caldo	50
5.1.1	Teste da gota	50
5.1.2	Teste de sensibilidade à polimixina por microdiluição em caldo	50
5.2	Pesquisa de genes de resistência às polimixinas (MCR-1; MGR E PHOQ)	58

5.2.1	Detecção do gene <i>mcr-1</i>	58
5.2.2	Detecção do gene <i>mgrB</i>	59
5.2.3	Detecção do gene <i>phoQ/P</i>	60
5.2.4	Detecção dos genes PmrA/B	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana acontece desde a antiguidade, muito antes dos fármacos serem identificados, sintetizados ou comercializados, sendo as vias moleculares presentes nas bactérias responsáveis pelo surgimento da resistência (MORRINSON; ZEMBOWER, 2020; CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Vimos, nos últimos anos, a resistência antimicrobiana manifestar-se rapidamente em escala global e se disseminar mais rápido do que o esperado. Evidencia-se superbactérias e bactérias multirresistentes endêmicas em diversas partes do mundo. Certamente, o uso generalizado, o uso excessivo e o mau uso de antimicrobianos no decorrer dos últimos 80 anos foram associados à explosão da resistência antimicrobiana (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Na era moderna, a resistência antimicrobiana foi identificada como uma das principais ameaças e preocupações para a saúde humana em todo mundo (KOUKOUBANI et al., 2021). Amplamente, infecções por organismos Gram-negativos resistentes a antibióticos têm aumentado e mundialmente representam um problema significativo de saúde pública (CHIOTOS et al, 2016; EL-HERTE et al, 2012; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019; KOUKOUBANI et al., 2021). Esta é uma situação preocupante nos serviços de saúde e requer ações de todos os setores da sociedade, pois coloca em risco a eficácia de tratamentos das doenças infecciosas. Na maioria dos casos, afeta pacientes com enfermidades graves, que estão em uso de dispositivos invasivos necessários para algum tratamento clínico-cirúrgico ou tem idade superior aos 60 anos.

Entre as infecções mais prevalentes podem-se destacar as infecções de corrente sanguínea (ICS), nas quais o isolado bacteriano encontra-se no tecido sanguíneo muitas vezes por migração de outro sítio fisiológico não identificado. As infecções da corrente sanguínea (ICSS) são eventos adversos clínicos graves associados à morbidade e mortalidade muito altas, e representam uma das infecções mais comuns relacionadas à assistência à saúde, entre as quatro condições mais caras. O diagnóstico de ICSS é baseado em hemoculturas, com detecção automatizada da presença de microrganismos viáveis (COSTA-DE-OLIVEIRA et al, 2017).

Estas infecções proporcionam altas taxas de morbimortalidade e muitas são causadas por bactérias Gram-negativas, as quais possuem mecanismos de resistência de forma natural ou adquirida, envolvendo adaptações, ou aquisições de genes (informações) de outras

bactérias, da mesma espécie ou não, que podem levar, portanto, a cepas com características de resistência. Estes parâmetros são responsáveis pela ineficácia do antimicrobiano (SANTOS et al, 2015; TORTORA et al, 2017).

Mundialmente, as infecções bacterianas são responsáveis pelo uso disseminado de medicamentos antimicrobianos. Tais bactérias, relacionadas aos diversos tipos de infecções existentes, podem apresentar resistência aos antimicrobianos mais utilizados e, dessa forma, prejudicar a terapêutica ou levar a uma maior dificuldade no tratamento dos pacientes infectados com estes espécimes, limitando as opções de tratamento e levando a resultados clínicos adversos e/ou custo excessivo de cuidados (KOUKOUBANI et al., 2021; DA COSTA; SILVA, 2017; VENTOLA, 2015).

Evidentemente, existem muitos genes de resistência putativos no ambiente, todavia, ainda não podemos prever quais seriam capazes de se expressar como fenótipos em bactérias patogênicas e causar doenças clínicas. Por outro lado, na presença de concentrações inibitórias e subinibitórias de antibióticos pode-se supor que novos mecanismos de resistência surgirão contra compostos antimicrobianos (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). De fato, estão sendo relatadas infecções com Enterobacteriaceae resistentes a carbapenem (CRE), por pacientes em hospitais, ambulatórios. Este fato causa alta morbidade do paciente, mortalidade atribuível e custos hospitalares (MAGIORAKOS et al., 2017).

A maior incidência de bactérias Gram-negativas multiressistentes, em particular *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, e a falta de novos antibióticos/ novas opções terapêuticas para combater esses patógenos, tem levado à reintrodução do grupo das polimixinas como alternativa terapêutica nos seus tratamentos. As polimixinas são antibióticos de último recurso para a terapêutica humana e eficazes contra bactérias Gram-negativas (RAY et al., 2022; LORENZO; RAMIREZ, 2010; ARNOLD; FORREST; MESSMER, 2007). As polimixinas são moléculas cíclicas e catiônicas, usadas na prática médica, sendo que a polimixina B e polimixina E (colistina) apresentam potencial de ação sobre inúmeras bactérias Gram-negativas (SEIBERT et al., 2014; LORENZO; RAMIREZ, 2010). Entretanto, há uma evolução rápida e complexa dos mecanismos de resistência bacteriana em *Klebsiella pneumoniae* produzindo β -lactamases e carbapenemases de espectro estendido, sendo uma das ameaças mais significativas à saúde pública, e preocupação crescente em pacientes imunocomprometidos (HIGASHINO, H. R. et al., 2021; CANEIRAS et al., 2019).

A terapia combinada é uma opção como estratégia de minimização da disseminação da resistência antimicrobiana a polimixina, com base em alguns resultados *in vitro* e *in vivo* atualmente disponíveis na literatura (SOBIESZCZYK et al., 2004; HUANG et al., 2017; ZUSMAN et al., 2016; LEE; BURGESS, 2013), mas ainda são necessários mais dados clínicos que elucidem tais recomendações, devido aos possíveis quadros de neurotoxicidade e nefrotoxicidade adquiridos com o uso deste fármacos (ZAVASCKI et al., 2007).

A resistência a essas polimixinas tem acontecido devido à pressão seletiva causada pelo uso inadequado desses antibióticos, principalmente na agricultura. Mediados por alterações intrínsecas, mutacionais ou genéticas em genes cromossômicos, os mecanismos de resistência às polimixinas, inclui a rede regulatória que controla as modificações químicas da porção lipídica A do lipopolissacarídeo, reduzindo a carga negativa do lipídeo A e sua afinidade pelas polimixinas. Ainda, o único gene móvel de resistência à colistina/polimixina B (*mcr*), relatado em Enterobacteriales é responsável pela disseminação horizontal da resistência às polimixinas através da cadeia alimentar, facilitada por alguns elementos móveis, como os integrons, já observado em isolados de *E.coli* (RAY et al., 2022; TORO; CORREA, 2010).

Há uma necessidade urgente de aumentar a atenção para detectar a resistência às polimixinas. Métodos moleculares podem contribuir para uma identificação rápida e específica de microrganismos. Entretanto, em relação aos testes de suscetibilidade, poucas informações úteis podem ser fornecidas, pois apenas alguns genes que codificam proteínas associadas à resistência são conhecidos (SALIMNIA et al., 2014; CEYSSENS et al., 2016).

A avaliação laboratorial da suscetibilidade antimicrobiana é um pré-requisito para o manejo adequado das infecções. No entanto, é necessário um tempo prolongado para testes de suscetibilidade antimicrobiana fenotípica (AST) de rotina, uma vez que o crescimento na presença de diferentes drogas antimicrobianas é obrigatório. A falta de uma metodologia rápida e de fácil execução para determinar o perfil de sensibilidade das bactérias às polimixinas (Polimixina B e Polimixina E/Colistina) é um desafio na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica.

Os ensaios automatizados não são adequados para caracterizar o perfil de resistência a estas drogas, principalmente em isolados, cujo resultado apresenta sensibilidade ao antibiótico, devido ao alto peso molecular destes fármacos, fazendo com que eles precipitem durante o ensaio, impossibilitando um resultado mais preciso (COSTA-DE-OLIVEIRA, 2017; PINA-VAZ E RODRIGUES, 2010). Os testes atualmente recomendados, como a

microdiluição em caldo, são testes manuais laboriosos e demorados, que inviabilizam seu emprego na rotina de diagnóstico para benefício direto dos pacientes. Em bancada de unidades hospitalares, estes problemas na detecção do perfil de sensibilidade às polimixinas acontecem principalmente na liberação deste antibiótico como sensível, empregando o teste automatizado, pois a maior parte dos isolados encontrados em unidades fechada resulta sensível às drogas, sendo que possivelmente uma parcela destes pode ser resistente à polimixina. O teste da gota (Drop test), ferramenta diagnóstica abordada neste estudo, apresenta-se então como uma alternativa importante e necessária para o desfecho do perfil de resistência/sensibilidade destes microorganismos, já que demonstrou ser bastante assertivo na detecção de cepas quando comparado ao padrão ouro, e com sua inclusão será possível aos analistas clínicos possuírem uma resposta segura e rápida quanto à resistência às polimixinas. Este teste é comparável ao teste de microdiluição em caldo, porém com a vantagem de ser menos laborioso e menos demorado.

Além disso, compreender atualmente sobre o mecanismo de resistência às polimixinas, com suas variantes genéticas associadas, métodos de avaliação, transmissão de resistência e fatores de risco relacionados, deve ser considerada de forma abrangente na vigilância voltada para detecção de cepas bacterianas resistentes, podendo implicar em estratégias para contornar essa resistência e, levar a perspectivas futuras sobre os possíveis alvos terapêuticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecção da corrente sanguínea por enterobactérias

Os membros da ordem Enterobacterales são microrganismos Gram-negativos encontrados na natureza e isolados com frequência de material biológico, colonizam o trato gastrointestinal dos humanos integrando a microbiota normal destes órgãos, tornando-o um potencial reservatório para esses agentes patogênicos. Dentre as bactérias Gram-negativas de maior importância clínica, têm-se as enterobactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, e *Enterobacter* spp., algumas fazem parte da microbiota normal e causam doenças incidentalmente, enquanto outras, incluindo *Salmonella* e *Shigella*, são regularmente patogênicas para humanos (LAVAGNOLI *et al.*, 2017). Estas espécies são responsáveis por muitas das doenças diarreicas infantis presentes em nações em desenvolvimento, porém, ao tratar-se de resistência antimicrobiana emergente em enterobactérias, a espécie de *Klebsiella pneumoniae* ganha destaque frente a diversas classes de antibióticos, e hoje se enquadra no grupo de agentes etiológicos dos mais difíceis de tratar (ROCK; DONNENBERG, 2014). Estas espécies de enterobacterales correspondem a mais de 70% dos isolados bacterianos, que acometem os indivíduos por diferentes patologias infectocontagiosas como gastroenterites, bacteremias, infecções urinárias, infecções de feridas, meningites, e são estreitamente relacionadas a distintos mecanismos de resistência bacteriana frequentes em unidades hospitalares (HOLANDA, 2017). As enterobactérias disseminam-se facilmente entre humanos a partir de transporte entre mãos, alimentos e água contaminada, e são propensas a adquirirem material genético de outras bactérias, por meio da transferência horizontal de genes, mediada principalmente por plasmídeos e transposons (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

O conceito de bacteremia é essencialmente microbiológico e é definido como a presença de bactérias na corrente sanguínea demonstrada por hemocultura. De modo geral, a invasão da corrente sanguínea representa uma falha do sistema imunológico em conter a infecção no foco primário. Em última instância, a bacteremia implica a existência de infecção disseminada que pode levar a um quadro de sepse e um pior prognóstico (ORDÓÑEZ; COLMENERO CASTILLO, 2006). As infecções de corrente sanguínea causadas por bactérias estão muito relacionadas às infecções relacionadas aos cuidados de saúde (IRAS), ocasionadas, na maioria das vezes, pelo uso de dispositivos empregados para o tratamento e

pela manipulação do paciente por profissionais envolvidos no cuidado. No ambiente hospitalar as fontes de transmissão podem ser associadas à água, cateteres, sondas, soros, antissépticos e equipamento de respiração mecânica (CARRIZO, 2017).

Nos estudos incluídos na pesquisa de meta análise de Tansarli et al. (2019) a fonte de bacteremia foi originada de infecções do trato urinário (54,8%), infecção do trato biliar/gastrointestinal (13,8%), intra-abdominal (5%), cateter venoso central/primário, bacteremia relacionada (4,8%), pneumonia (3,6%), infecção de tecido (1,4%) ou outras fontes desconhecidas. No geral, o trato urinário foi a fonte prevalente de bacteremia em todos os estudos investigados, compreendendo 71%. No estudo de Ocanã Carrizo (2006) os fatores de riscos mais comuns para bacteremia por enterobactérias foram neoplasias (33,3%) e diabetes (12,4%); sendo infecção urinária (29,5%) e abdominal (13,9%) os focos primários identificados com mais frequência. O patógeno bacteriano mais frequentemente observado foi *E. coli*, seguida por *Klebsiella* spp. (21,7%) e *Enterobacter* spp. (12,4%). A bacteremia por *Klebsiella* spp. foi mais comum em pacientes submetidos a tratamentos intensivos. A bacteremia continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes adultos, apesar da existência de vários agentes antimicrobianos e do aumento das medidas de suporte (OCANÃ CARRIZO, 2006). Há uma elevada mortalidade, superior a 50% nos casos de sepse grave ou choque séptico (BELLIER et al., 2008). A incidência de bacteremia por bacilos Gram-negativos continua a aumentar comparados a Gram-positivos de importância clínica, e continua a ser um grande contribuinte para a morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (CHOTIPRASITSAKUL et al., 2018).

2.2 Epidemiologia das infecções de corrente sanguínea

Enterobactérias podem ocasionar infecções pulmonares, infecções do trato urinário (ITU) (NETO, 2019) e estão relacionadas às infecções da corrente sanguínea (ICS), infecções neonatais, e em indivíduos imunocomprometidos. Nos países desenvolvidos o índice de infecções relacionadas aos cuidados de saúde (IRAS), considerando todas as causas, varia de 5% a 8%. Em um estudo de prevalência de infecções em unidades de cuidado hospitalares com a participação de 10.038 pacientes, com 1417 destes em Centros de Terapia Intensiva (CTI), na Europa, observou-se que as infecções da corrente sanguínea perfazem 12% das IRAS, sendo esta considerada a quarta causa, e responsável por 14% a 38% das mortes associadas às IRAS (SILVA; ESTEVES, 2017).

Babay et al. (2005) coletaram dados clínicos de todos os pacientes pediátricos com hemoculturas positivas entre janeiro e dezembro de 2004 no King Khalid University Hospital (KKUH), Riyadh, Arábia Saudita, 218 pacientes foram identificados com ICS. As bactérias Gram-negativas totalizaram 20% das amostras e incluíam *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* como os patógenos mais prevalentes. Infecções ósseas e articulares, doenças cardíacas, renais, gastrointestinais, câncer e procedimentos cirúrgicos foram outros diagnósticos clínicos associados à ICS em pacientes pediátricos. A mortalidade geral foi de 6% e esses pacientes apresentavam fatores de risco associados, como internação prolongada, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), cateterismo de demora, ventilação mecânica e uso prévio de antimicrobianos.

Em infecções de corrente sanguínea associada ao uso de cateter, os índices de infecção oscilam conforme o local de implante, o tipo de cateter utilizado, a classe do Centro de Tratamento Intensivo (queimados, trauma, pós-operatório), as comorbidades e fatores de risco dos pacientes. Segundo Bonvento (2007), essas infecções são frequentemente evidenciadas em unidades de atendimento a queimados (12,8% por 1000 cateteres/dia) em comparação as unidades de pós-operatório de cirurgia cardíaca e de tórax (2,8%). Estudos comparando pacientes clínicos e cirúrgicos revelaram que o índice de infecção de corrente sanguínea primária em pacientes cirúrgicos é de 31%, enquanto 24% estão associados ao uso de cateter e o período de permanência.

Rommaneli *et al.* (2013), avaliaram os fatores de risco e a letalidade das ICSs em uma Unidade Neonatal de Cuidados Progressivos (UNCP) no estado de Minas Gerais, entre janeiro de 2008 a maio de 2012, em um total de 150 pacientes pediátricos, tendo submetidos a cirurgia prévia e uso de cateter venoso central (CVC), estes se associaram significativamente à infecção por enterobactérias, estando presente em 14 casos, com três óbitos. Nesse mesmo sentido, Younekura; Abramczyk; Lapchik (2015) realizaram um estudo retrospectivo, com investigação de prontuários de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, do Hospital Infantil Cândido Fontoura, São Paulo, entre janeiro a dezembro de 2010. Nesta investigação, dos 192 recém-nascidos avaliados, 8,3% apresentaram infecção da corrente sanguínea e todos estavam em uso de cateter central de inserção periférica, com média de 11 dias de permanência e com mortalidade associada à infecção da corrente sanguínea de 31%.

Carneiro (2015) avaliando a terapia com polimixina B intravenosa em monoterapia e combinada com outro antimicrobiano em ICS por bactérias Gram-negativas, em 99 pacientes, de um hospital terciário de Porto Alegre (RS), concluiu que sepse grave/choque séptico no dia

da ICS, e condição de neoplasia como doença de base, foram individualmente relacionadas a maiores índices de mortalidade em um período de 30 dias.

Com o intuito de investigar o perfil sociodemográfico, clínico e etiológico das mortes relacionadas aos cuidados de saúde, no Hospital Estadual Sumaré, SP, de 2007 a 2008, uma investigação retrospectiva de 133 prontuários foi conduzida por Guimarães *et al.* (2011), no qual 97% dos pacientes foram submetidos a procedimento invasivo, e infecção hospitalar foi associada as pneumonias em 67,7%, infecções urinárias a 46,6%, e de corrente sanguínea 73%. Visando identificar os principais patógenos causadores de infecções e sua incidência, Bordignon e Lima (2018) avaliaram o resultado de 241 hemoculturas de pacientes em internamento de um hospital no estado do Paraná, entre março a junho de 2016; identificaram que *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.*, corresponderam a 21,16% e 12,86% dos microrganismos, respectivamente. *Klebsiella pneumoniae* surge como o segundo microrganismo mais incidente nos hospitais, representando mais de 10% dos casos reportados (SILVA; ESTEVES, 2017). Alvim; Couto e Gazinelli (2019), ao identificarem o perfil epidemiológico das infecções relacionadas por Enterobactérias, contendo o gene *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (bla_{KPC}) em unidade hospitalar de Belo Horizonte, Minas Gerais, demonstraram que dos 82 pacientes participantes do estudo, *Klebsiella pneumoniae* foi o patógeno mais incidente (68%), presente em 30% das culturas de sangue, 22% nas culturas de lavado broncoalveolar e 18% em culturas de urina. A infecção de corrente sanguínea de maior incidência foi relacionada a implantação do cateter (30%) e uma taxa de letalidade de 62% dos pacientes.

Em uma pesquisa epidemiológica realizada em hospital universitário de Fortaleza-CE, com análise de 512 fichas de notificação de IRAS durante o ano de 2007, Nogueira *et al.* (2019) explicitaram que a frequência anual média de IRAS foi de aproximadamente 8,2%, com registro 29,1% de infecções relacionado a pneumonias; 26,6% ICS; 17% ITU, 11% infecções de cateter central e 9,2% de infecções associadas a procedimentos cirúrgicos. Inúmeros patógenos foram identificados, com destaque para as enterobactérias *Klebsiella pneumoniae* (22%) e *Escherichia coli* (10%).

Com o objetivo de identificar as bactérias isoladas a partir de hemoculturas, no período de julho de 2009 a julho de 2010 em um hospital Universitário do Sul de Minas, Fernandes *et al.* (2011) avaliaram um total de 1388 hemoculturas, na qual 93% destas foram negativas e 7% foram positivas. A unidade hospitalar com maior número de isolados foi a UTI com 18%, e prevalência de 17% para *Klebsiella pneumoniae*. Em um estudo conduzido

em uma UTI de um hospital de Belo Horizonte, entre Janeiro de 2012 a julho 2017, com a inclusão de 63 pacientes, Kayser (2018) identificou que a taxa de mortalidade intra hospitalar foi de 59%, sendo que a taxa de mortalidade entre pacientes com ICS causada por *K. pneumoniae* e *E. coli* multirresistentes foi de 60%, enquanto que a taxa de mortalidade entre pacientes com infecção da corrente sanguínea causada por *K. pneumoniae* e *E. coli* multissensíveis foi de 57%, concluindo que nessa pesquisa não houve correspondência entre mortalidade e resistência bacteriana.

Tratando de um estudo que envolveu dados epidemiológicos de infecção da corrente sanguínea por enterobactérias, coletados de prontuários, advindos de dois hospitais terciários de Salvador, Bahia, entre 2016 e 2018, Araújo (2019) identificou 242 pacientes com ICS por enterobactérias em 255 amostras analisadas, sendo *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* as mais prevalentes. Infecção de corrente sanguínea por *Proteus mirabilis* também foi identificada e juntamente com *K. pneumoniae* apresentaram uma taxa de letalidade de 40,9%. A taxa de resistência aos carbapenêmicos foi de 17,7%, com letalidade próxima a 74% para este grupo. Infecção por *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, ITU e contato prévio por enterobactéria resistente a carbapenêmicos representaram os fatores de risco individuais para infecções por enterobactéria resistente aos carbapenêmicos (ERC).

2.3 Enterobactérias e resistência a antimicrobianos

O aumento da resistência microbiana entre o grupo de bacilos fermentadores de glicose tem culminado no aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, as quais representam um importante problema de saúde pública, exigindo esforço multidisciplinar em nível de estratégias preventivas e de controle, além de uma detecção laboratorial eficiente (SEIBERT et al., 2014) e escolha do tratamento antibiótico empírico (SABATIER; PEREDO; VALLÉS, 2009). Se a resistência aos antibióticos é significativamente alta, isso leva a uma preocupação adicional na seleção da terapia empírica até para pacientes graves portadores de qualquer infecção do trato urinário inferior (LEE et al., 2018). *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são fontes comuns de infecções comunitárias e hospitalares e com elevada resistência antimicrobiana (COSTA et al., 2020).

A descoberta dos antibióticos é considerada um dos avanços mais importantes da ciência moderna. No entanto, a resistência antimicrobiana (RAM) ameaça esse progresso, apresenta riscos significativos para a saúde humana (MARSTON et al., 2016) e implica

anualmente em altas taxas de morbidade, mortalidade e custos econômicos (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019). O uso de fármacos não efetivos pode criar uma pressão seletiva para o desenvolvimento de cepas resistentes (TENOVER, 2006). As drogas são frequentemente classificadas em consonância com seu principal mecanismo de ação, estes mecanismos incluem interferência com a síntese da parede celular (por exemplo, β -lactâmicos e agentes glicopeptídicos), inibição da síntese de proteínas (macrolídeos e tetraciclina), interferência com a síntese de ácido nucléico (fluoroquinolonas e rifampicina), inibição de uma via metabólica (trimetoprim-sulfametoxazol), e ruptura da estrutura da membrana bacteriana (polimixinas e daptomicina). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a mais de uma classe de agentes antimicrobianos ou podem adquirir resistência por mutação de novo ou por meio da aquisição de genes de resistência de outros organismos.

O surgimento da resistência em microrganismos pode acontecer naturalmente, mas também é impulsionada pela exposição a medicamentos nos cuidados de saúde, na agricultura e no meio ambiente (HOLMES et al., 2016). Prescrição e vendas inadequadas de muitas drogas fora do setor de saúde e fatores genéticos intrínsecos às bactérias contribuem negativamente para esta situação, agravadas ainda por incentivos econômicos escassos para o desenvolvimento farmacêutico de novos agentes antimicrobianos. Abordagens alternativas para lidar com a ameaça de RAM incluem novos métodos de identificação de drogas antibacterianas e estratégias que neutralizam os fatores de virulência (MARSTON et al., 2016).

Entre as bactérias Gram-negativas, a produção de enzima do tipo beta-lactamase é a principal forma de resistência bacteriana aos antimicrobianos da classe de beta-lactâmicos. Beta-lactamases são enzimas que degradam o anel beta-lactâmico, ocasionando a inativação do antibiótico e evitando que ele exiba atividade de bloqueio da síntese da parede celular bacteriana. Entre as beta-lactamases, os grupos que requerem maior atenção, são as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) e as carbapenemases (SEIBERT et al., 2014), configurando-se como um problema para as comissões de controle de infecção hospitalar (CCIH), bem como para a rotina dos laboratórios de microbiologia, que têm o papel de detectar os patógenos resistentes e transmitir essa informação para equipe multiprofissional no menor tempo possível (NORCIA, 2015). As principais bactérias produtoras das enzimas do tipo beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, com destaque para as enzimas do tipo KPC, NDM e OXA-48, que são carbapenemases de significativa relevância clínica, consideradas enzimas com larga

capacidade de resistência, para beta-lactâmicos e para outros antibióticos. Logo, terapias antes utilizadas para impedir infecções ocasionadas por essas bactérias se tornaram ineficazes e a procura por novos fármacos que sejam capazes de inibir essas enzimas torna-se imperioso (PITANGA et al., 2018).

As ESBL são definidas como enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração e aztreonam, são inativadas por inibidores específicos, como o clavulanato, sulbactam e tazobactam. Até o momento, mais de 430 beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) foram caracterizadas, havendo descrição de muitas delas no Brasil. A emergência e a disseminação de ESBL entre os membros da família Enterobacteriaceae têm sido descritas mundialmente como ponto de urgência clínica devido à grande incidência desses isolados em infecções relacionadas aos cuidados de saúde (IRAS). Frequentemente, as ESBLs são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, os quais também carregam genes de resistência a outras classes de antibióticos, de modo que o isolamento de cepas produtoras de ESBL multirresistentes é a principal causa de falha terapêutica, levando ao aumento considerável de morbidade por infecções bacterianas. Por outro lado, o uso de antimicrobianos na produção animal tem favorecido a seleção de enterobactérias produtoras de ESBL com potencial para disseminação na comunidade por meio de contato direto e consumo de alimentos contaminados, podendo ainda se estabelecer nos ecossistemas (SILVA; LINCOPAN, 2012).

As infecções da corrente sanguínea primárias (IPCS) causadas por *Escherichia coli* produtora de ESBL (ESBL-EC) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL (ESBL-KP) estão aumentando globalmente. Quan et al. (2016) com objetivo de investigar a epidemiologia e os fatores de risco para infecção por ESBL-EC e ESBL-KP em IPCSs em 28 hospitais terciários da China, no período de setembro de 2013 a novembro de 2014, avaliaram um total de 919 episódios consecutivos de IPCSs sendo 640 isolados de *E. coli* e 279 *K. pneumoniae* (não duplicados). No total, 72% dos casos foram classificados como tendo infecções de corrente sanguínea adquiridas na comunidade, enquanto os 28% restantes foram classificados como tendo infecções de corrente sanguínea associadas aos cuidados de saúde, estes dados não condizem com a realidade das ICSs no Brasil, onde a maioria associa-se com IRAS. As proporções de produtores de ESBL foram 55,5% entre isolados de *E. coli* e 16,5% entre isolados de *K. pneumoniae*.

Um patógeno perigoso deve ser virulento, resistente a antibióticos e epidêmico. A disseminação rápida dessa resistência antimicrobiana está associada a elementos genéticos

móveis, como plasmídeos, que também podem carregar determinantes de virulência. Dentre as bactérias de relevância epidemiológica que demonstraram um desenvolvimento célere em suas propriedades de resistência, encontram-se as Enterobactérias produtoras de Carbapenemases, ou seja, carreadoras do gene blaKPC (EPC-KPC) (ALVIM; COUTO; GAZZINELLI, 2019). *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases, restringe as alternativas terapêuticas para infecções bacterianas (MAGALHÃES; SOARES, 2019). Os resultados das pesquisas publicadas até o momento indicam que há uma ligação entre resistência e virulência, evidenciados nos clones epidêmicos de *E. coli* (ST131) e *K. pneumoniae* (ST15, ST147, ST336) associados à disseminação de determinadas enzimas do tipo ESBLs (SILVA; MENDONÇA, 2012). *Klebsiella pneumoniae* é reconhecida como uma ameaça urgente para a saúde humana devido ao surgimento de cepas multirresistentes associadas a surtos hospitalares e cepas hipervirulentas associadas a infecções graves adquiridas na comunidade (HOLT et al., 2015).

Por outro lado, um número crescente de genes de resistência foi evidenciado em cepas de *E. coli* durante as últimas décadas, e muitos desses genes de resistência foram adquiridos por transferência horizontal de genes. No pool de genes de enterobactérias, *E. coli* atua como doadora e receptora de genes de resistência e, portanto, pode adquirir genes de resistência de outras bactérias, mas também pode transmitir seus genes de resistência a outros microrganismos. Geralmente, a resistência antimicrobiana em *E. coli* é considerada um dos maiores desafios mundiais em humanos e animais e precisa ser considerada como um problema real de saúde pública (POIREL et al., 2019).

Nos achados de Tadess et al. (2012) a resistência a múltiplas drogas (≥ 3 classes de drogas antimicrobianas) em *E. coli* aumentou de 7,2% durante os anos 1950, para 63,6% durante os anos 2000. O fenótipo co-resistente mais frequente observado foi à tetraciclina e estreptomicina (29,7%), seguido pela tetraciclina e sulfonamida (29,0%). Nos isolados de enterobactérias analisadas entre 2015 e 2019, provenientes de um hospital público, Stella e Oliveira (2020), encontraram índices maiores de resistência antimicrobiana entre isolados de *Escherichia coli*, com 20% destes resistentes a quatro ou mais antibióticos. Isolados de *Klebsiella sp* revelaram maior sensibilidade (68,6%) a todos os antimicrobianos estudados. Referente à resistência antimicrobiana individual, os microrganismos testados demonstraram maior resistência à ampicilina (*E. coli* 64,5%, *Enterobacter sp.* 53%, *Proteus sp.* 34,6%, *Klebsiella sp.* 26,4%), amoxicilina (*E. coli* 32,7%, *Enterobacter sp.* 26,6%, *Proteus sp.* 15,4%,

Klebsiella sp. 11,7%) e cefalotina (E. coli 34,4%, Enterobacter sp. 20%, Proteus sp. 15,4%, Klebsiella sp. 8,8%).

Nos últimos anos, a descoberta da terapia combinada “antibiótico associado a outro fármaco agonista”, permite o reaproveitamento de antibióticos que já provaram ser seguros e eficazes para uso clínico. Três tipos principais de compostos foram desenvolvidos para bloquear os principais mecanismos de resistência bacteriana: inibidores da beta-lactamase; permeabilizadores de membrana externa; e inibidores da bomba de efluxo. Esta perspectiva é focada em inibidores de beta-lactamase que desativam a causa mais prevalente de resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas, ou seja, a desativação dos antibióticos mais amplamente usados, beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), e patógenos produtores de beta-lactamases (GONZÁLEZ-BELLO et al., 2019). A minimização da resistência deve, portanto, ser considerada de forma abrangente, considerando o mecanismo de resistência, o microrganismo, o medicamento antimicrobiano, hospedeiro e contexto; paralelamente à descoberta de novos medicamentos, é necessária uma ampla pesquisa multidisciplinar nesses cinco níveis, interligada aos setores de saúde, agricultura e meio ambiente (HOLMES et al., 2016).

Pearson et al. (2019) descreveram um consenso latino-americano para classificação de microrganismos multidroga resistentes, levando em conta apenas os grupos de antibióticos que são comumente testados em laboratórios clínicos da região para monitoramento de fenótipos de resistência e que também são relevantes para o tratamento de infecções causadas pelo patógeno em questão, segundo quadro abaixo.

Quadro 1 - Regras para definição de multirresistência, resistência estendida e panresistência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.

Definição	Grupos de antibióticos
MDR: resistente a 3 dos 12 grupos de antibióticos.	Amoxicilina-ácido clavulânico ou ampicilina-sulbactam
	Piperacilina, tazobactam
	Ceftazidima ou cefotaxima/ceftriaxona ou cefepime
XDR: resistente a 10 ou 11 dos 12 grupos de antibióticos.	Imipenem o meropenem
	Aztreonam
PDR: resistente a todos os grupos de antibióticos.	Gentamicina
	Amicacina
	Ciprofloxacino
	Trimetoprim-sulfametoxazol
	Fosfomicina
	Tigeciclina
	Colistina

Fonte: Adaptado de (PEARSON et al., 2019).

2.4 Polimixinas: o retorno de uma terapia antiga

O aumento da resistência a multidrogas entre os patógenos humanos tem provocado o interesse em reavaliar alguns fármacos para certas infecções graves, como as polimixinas (SORG, 2016). Muitas pesquisas apontam o aumento significativo no número de casos de infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemase (ERC), e o avanço da resistência entre estes microrganismos tem culminado no aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, as quais representam um importante problema de saúde pública em expansão, exigindo esforço multidisciplinar para prevenção e controle, além de uma detecção laboratorial eficiente (PATEL, 2009).

As polimixinas vêm sendo amplamente utilizadas como alternativa terapêutica no tratamento de bactérias Gram-negativas multirresistentes (ARNOLD; FORREST; MESSMER, 2007). O uso dessa classe farmacológica ocorre em infecções na maioria das vezes recorrentes e/ou resistentes devido ao grau de toxicidade neurológico e renal ocasionados por essas drogas. O tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, com polimixinas combinadas obtêm menores taxas de falha no tratamento quando comparadas com a monoterapia. Dentre os casos tratados com combinação à base de polimixina nos Estados Unidos e no Brasil, a maioria obteve sucesso no tratamento, sendo

que os regimes mais utilizados foram: Tigeciclina (TGC) + colistina, carbapenêmicos + Polimixina B (PMB) e aminoglicosídeos + Polimixina B (LEE, 2013; BARTH, 2014).

Apesar dos danos toxicológicos ocasionados pelo uso de polimixina, a baixa resistência a esta droga influenciou no aumento da utilização em todo mundo, entretanto a existência de um gene plasmidial associado a resistência à estas drogas, o *mcr-I* (*mobile colistin resistance*), demonstrou concretamente a existência de cepas mutáveis e resistentes a polimixina, que seria um tratamento bactericida de última escolha (LIU et al., 2015). Além disto, algumas enterobactérias são naturalmente resistentes à polimixinas como: *Proteus*, *Providência*, *Morganella* e *Serratia* (HAYAKAWA ET AL et al., 2012). Os principais mecanismos associados à resistência são devidos a modificações no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular alterando a carga elétrica da mesma e em consequência a ligação da polimixina (MOFFATT et al., 2011). Outro mecanismo envolve alterações no sistema de componentes *phoP/phoQ* e *pmrA/pmrB* através de mutações que alteram a expressão de LPS (MILLER et al., 2011).

2.4.1 Mecanismos de resistência a polimixinas em cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*

A maior incidência de bactérias Gram-negativas multirresistentes, em particular *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli* e a falta de novos antibióticos para combater esses patógenos, vem culminando na reintrodução do grupo das polimixinas, moléculas cíclicas e catiónicas, usadas na prática médica: polimixina B e polimixina E (colistina) (LORENZO; RAMIREZ, 2010). A polimixina B na forma de sulfato tem aplicação tópica (pele, ouvidos e olhos) e por via parenteral (intravenosa e intratecal) (MENDES; BURDMANN, 2009). A polimixina E tem a particularidade de ser um antibiótico com atividade bactericida e um mecanismo de ação dependente de concentração, além de ser um composto bastante estável no plasma, é aplicado de maneira tópica para descontaminação intestinal, e como colestimetato de sódio (CMS), via parental (intravenoso, intramuscular, intratecal e inalatório) (LORENZO; RAMIREZ, 2010; MENDES; BURDMANN, 2009).

Estudos direcionados a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase – KPC e *E. coli* são imprescindíveis devido aos mecanismos de resistência desses patógenos, e têm por finalidade restringir a disseminação, colaborando para a redução dos dados alarmantes de morbidade e mortalidade associados a distintas patologias infecciosas, crucial na vigilância microbiológica, em conjunto com as práticas da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

(CCIH) (DIENSTMANN et al., 2010). As polimixinas apresentam potencial ação sobre inúmeras bactérias Gram-negativas. A sua utilização foi praticamente extinta entre 1970 e 1980, devido ao surgimento de outras drogas consideradas menos tóxicas. É necessário a célere identificação laboratorial destas espécies, seus genes relacionados ao fenótipo de resistência para implementação de estratégias preventivas eficientes de contato, terapia adequada e contenção da disseminação (SEIBERT et al., 2014).

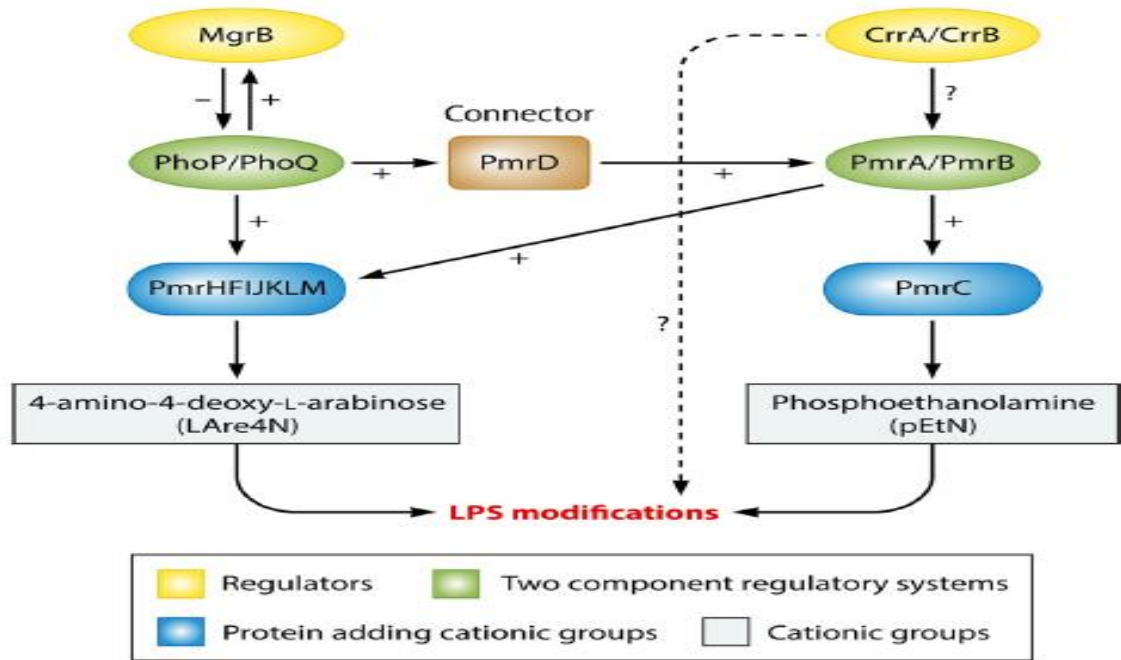
A literatura descreve que os genes *mcr-1* e *mcr-2* mediados pelo plasmídeo em *K. pneumoniae*, as alterações codificadas cromossomicamente do gene *mgrB* e os sistemas de dois componentes *pmrAB* e *phoPQ* são atualmente responsáveis pela aquisição de resistência à polimixina nesta espécie enterobacteriana. Recentemente, mutações no gene *crrB*, pertencentes a um terceiro sistema de dois componentes (chamado *crrAB* para regulação da resistência à colistina) e envolvidas em modificações do lipopolissacarídeo (LPS), foram associadas à resistência à colistina. Mutações no gene *crrB* são responsáveis pelo aumento da transcrição do gene *crrC*, que por sua vez regula a expressão do gene *pmrC* e do operon *pmrHFIJKLM*, através do sistema de dois componentes *pmrAB*. A expressão desses genes leva à adição de grupos catiônicos no LPS e, conseqüentemente, à resistência à colistina. A resistência à Polimixina em *K. pneumoniae* produtora de KPC é provavelmente causada pela perda da função do gene *mgrB* ou por substituições não sinônimas no gene *pmrB* que regulam positivamente os operons *pmrCAB* e *pmrBCADTEF-pmrE*, resultando na modificação do lipídeo A. Todos esses genes estão localizados no cromossomo bacteriano (BARTOLLETTI et al., 2016).

Aires et al. (2016) com o objetivo de investigar a resistência à polimixina B (PMB) e seus mecanismos moleculares avaliaram 126 cepas de *Klebsiella pneumoniae* obtidas de culturas de vigilância no Brasil, e encontraram que os isolados exibiam resistência com interrupção do gene *mgrB* por sequências de inserção/mutações. A maior parte dos isolados resistentes a PMB continha também o gene *blaKPC-2* (n = 8) e pertenciam ao complexo clonal ST 258 (CC258) (n = 7). Esses resultados destacam a importância de monitorar a disseminação de isolados resistentes à polimixina em hospitais, de modo que poucas opções permanecem para o tratamento de cepas multirresistentes.

Em isolados de *E. coli*, os mecanismos de resistência aos antibióticos são adquiridos através de mutações específicas no nível cromossômico ou transferência horizontal de material genético entre espécies relacionadas ou diferentes, facilitada por alguns elementos móveis, como os integrons. Essa transferência horizontal permite que os mecanismos se

movam entre diferentes enteropatógenos e se espalhem rapidamente em escala mundial. Desse modo, conclui-se que a resistência múltipla das bactérias Gram-negativas a antibióticos, é o produto de uma combinação de mecanismos, alguns deles inerentes às espécies e outras adquiridas a partir de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (TORO; CORREA, 2010).

Bactérias Gram-negativas empregam várias estratégias para se protegerem de antibióticos como as polimixinas (polimixina B e colistina), incluindo uma variedade de modificações de lipopolissacarídeo (LPS), como modificações de “lipídeo A” com fosfoetanolamina e 4-amino-4-desoxi-L-arabinose, além do uso de bombas de efluxo, a formação de cápsulas e a superexpressão da proteína da membrana externa (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). As polimixinas atuam nas membranas celulares, de maneira a diminuir a integridade da parede celular e como resultado, a morte celular bacteriana (GIRARDELLO; GALES, 2012). As modificações acontecem a nível do lipopolissacarídeo da parede celular bacteriana, que reduz a atração do antimicrobiano pela superfície celular e são reguladas por distintos sistemas em dois componentes (*pmrA* / *pmrB* e *phoP*/ *phoQ*), que sofrem ativação por força do ambiente na presença de cátions, pH ou do antimicrobiano. Estes componentes suscitam a ação de uma cascata de genes que, conseqüentemente, manifestam o fenótipo de resistência às polimixinas (GIRARDELLO; GALES, 2012). Devido aos componentes destes antimicrobianos, a resistência cruzada pode aparecer entre colistina e polimixina B (LORENZO; RAMIREZ, 2010). Abaixo, verificam-se as vias de regulação do lipopolissacarídeo descritas por Poyrel (2017) em isolados de *Klebsiella pneumoniae*.



Regulation pathways of LPS modifications in *Klebsiella pneumoniae*.

Figura 1 - Vias de regulação do lipopolissacarídeo descritas por Poyrel (2017) em isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Fonte: (POYREL, 2017)

Em 2015, Lyu e colaboradores numa pesquisa inédita demonstraram a resistência às polimixinas mediada pelo gene *mcr-1* carreado em plasmídeo. De acordo com Xu et al. (2018), os dados *in vitro* e *in vivo* permitiram visualizar as semelhanças na atividade catalítica compartilhada entre os genes *EptA* ou *pmrC* e *mcr-1* e *-2*. A expressão de *EptA* ou *mcr-1* ou *-2* é mostrada para remodelar a superfície de bactérias entéricas (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc), tornando-as resistentes à colistina. *EptA* e *mcr-1* e *-2* remodelam a membrana externa, tornando as bactérias resistentes à colistina. As análises estruturais e funcionais de *EptA* e *mcr-1* e *-2* revelam cavidades paralelas que reconhecem o substrato lipídico, o que explica a resistência intrínseca e transferível à colistina em bactérias intestinais. Um mecanismo semelhante é proposto para as atividades catalíticas de *EptA* e *mcr-1* e *mcr-2*. Juntos, eles constituem um mecanismo comum de resistência à polimixina intrínseca e transferível.

Um estudo mais recente avaliou a ocorrência de enterobactérias resistentes à colistina e a presença do gene *mcr* em isolados provenientes de amostras clínicas de pacientes internados no Complexo Hospitalar da UNICAMP. Oliveira (2020) avaliou 103 isolados de amostras biológicas variadas. A detecção dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* foi realizado por PCR multiplex e dos 103 isolados investigados, 07 cepas de *E. coli* foram

positivas para *mcr-1*. Todas as amostras produtoras de ESBL (total de 03) apresentaram no mínimo resistência a duas classes de antibióticos. Foi confirmada a presença de uma linhagem pandêmica de *E. coli* (O15:H1-D-ST393), estudada pela primeira vez na América do Sul. O gene *mcr-1* foi encontrado em plasmídeos do grupo IncX4 e HI2. Os isolados de *E. coli* pertenciam a cinco “*sequence typing*”, o ST393, ST3024, ST354, ST224 e ST624. Das sete amostras, 6 eram provenientes de pacientes com infecções do trato urinário e 1 de infecção da corrente sanguínea, no qual 05 eram imunodeprimidos. Os resultados de análises epidemiológicas recentes indicam que o clone ST 307, produtor de KPC está emergindo em diferentes partes do mundo e é um candidato a se tornar um clone prevalente de alto risco no futuro próximo. As características genéticas identificadas no genoma deste novo clone emergente podem contribuir para o aumento da persistência do ST 307 no ambiente hospitalar e lançar luz sobre seu potencial sucesso epidemiológico (VILLA et al., 2017).

A terapia combinada é uma opção como estratégia de minimização da disseminação da resistência antimicrobiana a polimixina, com base em alguns dados *in vitro* e *in vivo* atualmente disponíveis na literatura (SOBIESZCZYK et al., 2004; HUANG et al., 2017; ZUSMAN et al., 2016; LEE; BURGESS, 2013), mas ainda são necessários mais dados clínicos que elucidem tais recomendações, devido aos possíveis quadros de neurotoxicidade e nefrotoxicidade adquiridos com o uso destes fármacos. Posto que as polimixinas serão cada vez mais usadas para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, estudos clínicos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicodinâmicos que subsidiem o uso ideal dessas drogas são urgentemente necessários (ZAVASCKI et al., 2007).

A heterorresistência aos antibióticos é um fenótipo no qual um isolado bacteriano contém subpopulações de células que mostram uma redução substancial na susceptibilidade aos antibióticos em comparação com a população principal. Trabalhos recentes indicam que a heterorresistência é muito comum para várias espécies bacterianas e classes de antibióticos diferentes (SRINIVAS; RIVARD, 2017). A heterorresistência às polimixinas pode ocorrer devido à exposição prévia às polimixinas e, notadamente, à dosagem terapêutica sub-ótima (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010). Ainda são escassos os estudos demonstrando a heterorresistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, porém, haja vista que a heterorresistência pode dificultar a eficácia do tratamento com polimixina em pacientes, este perfil comportamental de algumas cepas precisa ser avaliado (HALABY et al., 2016).

Heterorresistência de carbapenêmicos entre infecções invasivas por *Escherichia coli* não foi relatada, contudo, um estudo conduzido por Sun et al. (2015) em um hospital universitário de 3.200 leitos em Chongqing, sudoeste da China, entre julho de 2011 a junho de 2013, com isolados da corrente sanguínea, representando 50,6% das cepas coletadas, mostrou que a produção de ESBL foi identificada como o fator de risco independente, comum para heterorresistência. A caracterização de duas cepas sucessivas de *E. coli* isoladas do mesmo paciente indicou que a resistência aos carbapenêmicos evoluiu a partir de heterorresistência.

Avaliando a existência de heterorresistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas em pacientes hospitalizados e em tratamento com polimixina B, na pesquisa de Antochévis (2014), por meio do perfil populacional, avaliou-se 7 isolados de *Klebsiella pneumoniae* (Kp1.1, Kp2.1, Kp2.2, Kp2.3, Kp3.1, Kp3.2 e Kp3.3), de pacientes com infecção em corrente sanguínea, em três diferentes dias. Todas as amostras analisadas através deste perfil revelaram heterorresistência, três se desenvolveram em concentrações superiores ao “breakpoint” para polimixinas (Kp1.1H em 6 µg/mL, Kp2.1H em 16 µg/mL, Kp2.2H em 8 µg/mL e Kp2.3H em 64 µg/mL) e uma se desenvolveu em 1 µg/mL (Kp1.1H).

Um isolado de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente exibindo heterorresistência à colistina foi investigado por Jayoul et al. (2015). A subpopulação resistente à colistina abrigou uma única alteração de aminoácido (Asp191Tyr) na proteína *phoP*, que faz parte do sistema de dois componentes *phoPQ* que ativa a expressão *pmrHFJKLM* responsável pela síntese de l-aminoarabinose e resistência à polimixina. Essa mutação interrompeu o quadro de leitura de *phoP*, levando a uma proteína mais longa e inativa (255 contra 223 aminoácidos de comprimento), sendo este considerado o primeiro estudo envolvendo mutações em *phoP* na resistência à colistina.

Estudando a heterorresistência à colistina entre isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL usando perfis de análise populacional (PAPs), Halaby et al. (2016) encontraram que subpopulações heterorresistentes de *K. pneumoniae* podem ser selecionadas após a exposição à colistina. Mutações em *mgrB* e *phoQ* já foram anteriormente associadas à resistência à colistina, e mais atualmente os papéis de mutações nos genes *yciM* e *lpxM* e suas associações à resistência à colistina em *K. pneumoniae*. Experimentos *in vitro*, modelagem matemática, modelos de infecção animal e estudos clínicos mostram que as subpopulações resistentes podem ser enriquecidas durante a exposição a antibióticos, e evidências crescentes sugerem que a heterorresistência pode levar ao fracasso do tratamento (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

É visível a necessidade urgente de aumentar a vigilância para detectar resistência a estes fármacos, inclusive às polimixinas, e conseqüentemente encontrar opções terapêuticas efetivas. O presente estudo visa atualizar sobre a prevalência e caracterização da resistência as polimixinas de enterobactérias em ambiente hospitalar, no intuito de validar um teste rápido para identificar essa resistência bacteriana que já se tornou um problema de saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Descrever a prevalência e caracterizar os mecanismos de resistência à polimixina em enterobactérias na cidade de Salvador, Bahia.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Determinar a prevalência de resistência à polimixina em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*;
- II. Descrever o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes à polimixina;
- III. Caracterizar o perfil de alteração genética envolvido na resistência à polimixina em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*;
- IV. Validar um teste rápido (teste da gota) para identificação de enterobactérias resistentes à polimixina.

3.3 Hipótese

A hipótese nula (H0) verificaria se os resultados obtidos no grupo de pacientes com isolados sensíveis a polimixina seriam iguais aos resultados dos pacientes infectados por cepas resistentes a este antibiótico e a hipótese alternativa ($p < 0,05$), H1, quando existir diferença significativa na frequência do uso de dispositivos, óbito, internação e eventos clínicos graves como sepse, ao comparar indivíduos com isolados sensíveis e resistentes a polimixinas. A maioria da aquisição de resistência a polimixinas em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. ocorre em genes cromossomais e não plasmidiais. O teste de gota pode ser uma alternativa eficiente ao ensaio de microdiluição ao caldo na detecção de cepas resistentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo e local do estudo

Esta pesquisa trata-se de um estudo de corte transversal realizado em hospitais terciários da cidade de Salvador Bahia, no período de março de 2015 a maio de 2019. As unidades são vinculadas ao serviço de saúde privado do estado da Bahia e foram nomeadas como Hospital A e Hospital B. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente e houve acesso aos prontuários. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética dos hospitais.

4.2 Identificação microbiana

Todas as hemoculturas positivas para as espécies de *K. pneumoniae* e *E. coli* foram identificadas e tiveram seu perfil de sensibilidade caracterizado pelo VITEK® Compact (Biomérieux). As infecções de corrente sanguínea com presença destes microrganismos tiveram suas placas separadas para 2º repique e posterior armazenamento da bactéria. Todo material utilizado neste trabalho foi oriundo de solicitações médicas das próprias unidades, cujo resultado tenha sido positivo após a conclusão das análises laboratoriais. Todas as cepas foram armazenadas em criotubos contendo caldo BHI com adição de 10% de glicerol, posteriormente congelados e enviados semanalmente para o laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular (LPBM) no Instituto de Pesquisa Gonçalo Muniz - Fiocruz Bahia, onde foram acondicionadas em freezer à -70°C até a realização dos testes laboratoriais.

4.3 Aspectos éticos

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) nos hospitais conforme resolução CONEP 466/12. Os números dos Certificados de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) foram emitidos pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) de cada hospital terciário, e estão disponíveis para consulta em qualquer eventual necessidade. (Hospital B: **CAAE:** 30904614.2.3006.5606 e Hospital A: **CAAE:** 79250817.4.0000.0048). A participação dos indivíduos no estudo foi autorizada através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

4.4 Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes

Todos os pacientes que apresentaram hemoculturas positivas para *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* foram incluídos no estudo; o perfil clínico e/ou estado de saúde dos participantes internados; sexo, raça, cor, condição socioeconômica e outras características não foram motivos para exclusão neste estudo. Não foram incluídas amostras de outras espécies, materiais que apresentaram contaminação, ou que não cresceram após armazenamento em freezer a -70 °C.

4.5 Testes de triagem de perfil fenotípico e molecular de resistência à polimixina

4.5.1 Teste da gota (*Drop test*)

Todos os 366 isolados oriundos de pacientes com infecção de corrente sanguínea positiva para *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram submetidos ao teste de triagem da gota para identificação do perfil de sensibilidade, resistência ou heterorresistência, e posteriormente 199 foram testadas através da microdiluição em caldo, diagnóstico padrão ouro para avaliação de resistência a polimixinas, e somente se, resistentes, foram avaliadas quanto expressão de genes cromossomais e plasmidial. A concordância entre os métodos foi realizada em 199 isolados aleatórios com resultado do teste da gota.

O teste da gota é um método de triagem utilizado para detectar cepas resistentes à polimixina. Uma solução do antibiótico (colistina) é preparada numa concentração final de 16 µg/mL, adicionando um total de 8 discos de 10µg de colistina (OXOID™) em 5mL de caldo Mueller Hinton com ajuste de cátions (HIMEDIA®). A solução contendo os discos foi incubada à 35°C por 18 horas, sendo posteriormente retirados os discos e armazenada a solução à temperatura de 8°C (geladeira), para uso por até 12 meses.

O teste foi realizado conforme descrito por Pasteran (2018) e consistiu na aplicação de uma única gota (10 µL) da solução de colistina 16µg / mL na superfície de uma placa de Agar Mueller-Hinton previamente inoculado com suspensão bacteriana na concentração de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU / mL), semeada como um “tapete” (difusão). A bactéria foi considerada resistente à colistina quando não houve formação de uma zona de inibição no local de aplicação da gota e sensível quando houve a formação de uma zona de inibição de 5 mm ou mais.

4.6 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade para penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e gliciliclinas foi realizado por automação no dispositivo VITEK®Compact (Biomérieux) e os critérios de interpretação foram adotados de acordo com o Clinical & Laboratory Standards Institute– CLSI (2020). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das polimixinas foi feita através de dois testes manuais: o uso de um painel disponível comercialmente (Figura 2), o POLICIMBAC (PROBAC®), e microdiluição em caldo, esquematizada a diluição de seus poços na Figura 3, a confecção do antibiótico e preparo da solução de acordo com Pasteran (2018) em seu estudo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a primeira concentração onde não houver crescimento bacteriano. De acordo com o CLSI (2020) enterobactérias são resistentes à polimixina quando a CIM > 2 µg/mL, enquanto nas normas do Comitê Brasileiro Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos (BrCAST, 2022), o critério é CIM ≥ 4 µg/mL, esta interpretação em ambos os comitês não alteram os resultados deste estudo. Para o preparo da suspensão foi utilizado 300µl de água destilada estéril distribuído em tubo tipo eppendorf estéril e em seguida uma pequena quantidade do crescimento bacteriano foi coletada com auxílio de alça bacteriológica e dissolvida na água até alcançar turvação semelhante a escala 0,5 de McFarland.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC	
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC	

Figura 2 - Esquema representativo do painel do teste POLICIMBAC® contendo 12 cavidades por linha, com concentração de antimicrobianos variando de 64 µg/mL à 0,125µg/mL. O poço CC é utilizado para controle positivo de crescimento do inóculo.

Fonte: autor

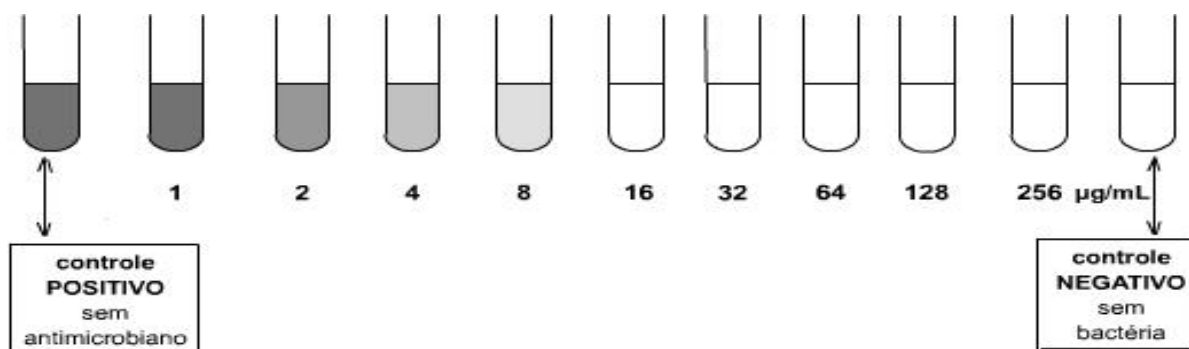


Figura 3 - Representação dos poços na microdiluição em caldo para teste de sensibilidade à polimixina. O controle negativo não possui inóculo bacteriano no poço. O controle positivo possui uma cepa microbiana controle. Neste teste foi utilizada a cepa *mcr-1* como controle positivo e a cepa ATCC2522 como controle negativo.

Fonte: autor

4.7 Extração de DNA e amplificação dos genes codificadores de resistência à polimixina

Todos os isolados resistentes à polimixina foram avaliados quanto a presença do produto do gene plasmidial *mcr-1*, e os genes cromossomais *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, e *mgr*. Os isolados acondicionados a temperaturas de -70°C foram cultivados em ágar Macconkey no primeiro dia. Após 24h, confirmado a pureza do microrganismo, as colônias foram transferidas para uma placa de Tryptic Soy Ágar (TSA) cultivada por 24h a 35°C . No 3º dia a bactéria foi submetida ao processo de extração de DNA. Uma alça calibrada de 1µl ou cinco colônias bacterianas foram suspensas em 100 ml de água miliQ. A suspensão foi incubada em banho-maria à 95°C por 10 minutos (para rompimento das células). Em seguida, foi centrifugada à 12000 rpm por 2 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi recolhido em outro tubo e armazenado à 20°C , até o momento de uso na reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.7.1 Reação em cadeia da polimerase para o gene *mcr-1*

A reação de PCR, foi realizada utilizando os iniciadores, Primer F (CLRS5F) (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') e CLR5-R (5'-CTTGGTCGGTCTGTA GGG-3'), descrito por Liu *et al.* (2015). As condições de ciclagem estão descritas na Tabela I. Os amplicons foram subsequentemente analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. A cepa de *E. coli* utilizada como controle positiva foi cedida pela professora Dra. Beatriz Meurer da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.7.2 Amplificação do gene *mgrB*

Para avaliação da integridade do gene *mgrB*, foi realizada a amplificação por PCR, utilizando os iniciadores e condições descritas na Tabela 1. Os amplicons foram subsequentemente analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. O resultado poderia ser confirmado através da presença de um amplicon de 252 pares de base (pb), ou seja, gene natural sem a mutação, ou um amplicon de 1110 pb, gene truncado contendo a inserção.

Tabela - Lista de iniciadores utilizados e condições das reações de PCR.

Gene	Sequência (5'-3')	Condições de ciclo (Temperatura/Tempo) x N ³	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>mgrB-ext-F1</i> ¹	AAGGCGTTCATTCTACCACC	(94°C - 30s; 54°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	253	Cannatelli <i>et al.</i> 2013
<i>mgrB-ext-R2</i> ²	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	(94°C - 30s; 54°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	253	Cannatelli <i>et al.</i> 2013
<i>phoQ-F</i>	CCACAGGACGTCATCACCA	(95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 25s) x 45	1594	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>phoQ-R</i>	GCAGGTGTCTGACAGGGATT	(95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 25s) x 45	1594	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>phoP-F</i>	GAGCGTCAGACTACTATCGA	(95°C - 30s; 60°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	912	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>phoP-R</i>	GTTTTCCCATCTCGCCAGCA	(95°C - 30s; 60°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	912	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>pmrB-F2</i>	CCCTGAATCAGTTGGTTTC	(95°C - 30s; 60°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	714	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>pmrB-R2</i>	ATCAATGGGTGCTGACGTT	(95°C - 30s; 60°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	714	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>pmrA-F</i>	CGCAGGATAATCTGTTCTCCA	(95°C - 30s; 60°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	808	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>pmrA-R</i>	GGTCCAGGTTTCAGTTGCAA	(95°C - 30s; 60°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	808	Haeili <i>et al.</i> , 2017
<i>mcr1_F</i>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	(94°C - 30s; 50°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	320	Rebelo <i>et al.</i> 2018
<i>mcr1_R</i>	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	(94°C - 30s; 50°C - 90s; 72°C - 60s) x 30	320	Rebelo <i>et al.</i> 2018

¹ Iniciador forward² Iniciador reverse³ Todas as PCR incluem uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 15 minutos e após os ciclos uma etapa a 72° por 10 minutos.**Fonte:** Autor

4.7.2.3 Amplificação do gene *phoQ*, *phoP*, *pmrA* e *pmrB*

As condições de termociclagem para os genes estão descrita na Tabela I. Em todas as reações foi preparada uma mistura (master mix) contendo porções em volume de primers, Go Taq Colorless Master Mix (Promega), água, e DNA bacteriano. O controle negativo correspondeu ao mix sem adição do material genético microbiano. As reações foram executadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) em diferentes condições de temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão.

4.8 Eletroforese dos produtos de PCR (*phoQ*, *phoP*, *pmrA* e *pmrB*)

Todos os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 1X por uma hora a 100v. Em cada gel, foi aplicado nas extremidades o marcador de peso molecular 100bp (Promega) para todos os genes.

4.9 Análise Estatística

Os dados foram coletados em questionários padronizados (ANEXO A e C) e armazenados no programa Epi-Info versão Windows 2000 para posterior análise. A identificação dos genes de resistência foi estratificada de acordo com a bactéria isolada. A associação entre os genes e a cepa e desfecho clínico foi realizada pelo teste estatístico X^2 , teste exato de Fisher ou a razão de odds (intervalo de confiança de 95%); os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os mesmos testes foram aplicados para análise de variáveis clínicas (escore de gravidade, presença de choque séptico, comorbidades, esquemas antimicrobianos utilizados) e sua associação com desfecho. Para avaliar a associação entre os ensaios de microdiluição e da gota foi utilizado o teste de coeficiente *Kappa de Cohen*. O cálculo amostral foi calculado sendo convenientes 385 ou mais isolados para ter um nível de confiança de 95% a partir da população da cidade de Salvador-Bahia, segundo o censo do Instituto Brasileiro de Geografia do ano de 2022.

5 RESULTADOS

A população estudada foi composta de 366 pacientes com hemocultura positiva para *Escherichia coli* (n=198) e *Klebsiella pneumoniae* (n=168). As características demográficas e clínicas da população do estudo estão apresentadas na Tabela II. A população do estudo teve uma mediana de idade de 67 anos e 53,7% foram do sexo masculino. Um total de 86,4% dos pacientes apresentaram algum tipo de comorbidade e 65% estavam em uso de cateter venoso.

O número de isolados utilizados no estudo de comparação entre os testes de microdiluição e gota, bem como das correlações entre resistência e clínica foi de 199, devido à restrição de materiais para os testes de microdiluição, para verificação da resistência à polimixina. Nos outros ensaios utilizamos 366 isolados. Este número tem uma boa representatividade da população soteropolitana, e é próximo do valor mínimo amostral (N=385) para representar toda cidade.

Tabela 2 - Características demográficas e clínicas de pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* em hospitais privados de Salvador, Bahia (2015-2019). (n =366)

Características demográficas e Clínicas	Total Nº (%) (N=366)
Idade (anos), mediana (IQT)	67 (53-80)
Idade ≥65 anos n=366 (100%)	201 (54,8)
Sexo masculino, n= 366 (100%)	197 (53,7)
Comorbidades, n= 360 (98,1%)	311 (86,4)
Diabetes mellitus (doença grave) n= 360 (98,1%)	43 (11,9)
Tumor sólido n= 360 (98,1%)	51 (14,2)
Malignidade hematológica n= 360 (98,1%)	96 (26,7)
Insuficiência cardíaca crônica n= 360 (98,1%)	30 (8,3)
Insuficiência renal crônica n= 360 (98,1%)	76 (21,1)
Insuficiência hepática crônica n= 360 (98,1%)	21 (5,8)
Acidente vascular cerebral n= 359 (98,1%)	52 (14,4)
Imunossupressão (SIDA), n= 356 (97,0%)	2 (0,56)
Internação hospitalar anterior(dias), mediana (IQR)	13 (5-30)
Ventilação mecânica, n= 192 (52,3%)	42(21)
Cateter urinário de demora, n= 193 (52,6%)	46(23,8)
Cateter venoso central, n= 193 (52,6%)	126(65,3)
Cirurgia n= 193 (52,6%)	63(32,64)
Uso prévio de antibiótico*, n= 193 (52,6%)	35(18,1)
Local de internação no início da bacteremia, n= 365 (99,5%)	
Enfermaria	100(27,4)
UTI	132(36,2)
Outros	133(36,4)
Infecções associadas aos cuidados de saúde, n= 214 (%)	188(87,9)

SD: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil; UTI: unidade de terapia intensiva. *Durante 30 dias antes da infecção de corrente sanguínea.

Fonte: Autor

5.1 Triagem do Perfil de Resistência (Teste da Gota e Microdiluição em Caldo)

5.1.1 Teste da gota

Avaliação do perfil de sensibilidade das cepas como resistente, sensível ou heterorresistente foi verificada no teste da gota, através da observação de um halo no ágar Muller Hinton, conforme figuras 4 e 5. Um total de 209 dos 366 (57,1%) isolados testados foi sensível à polimixina, sendo 161 (77,0%) *E. coli* e 48 (23,0%) *K. pneumoniae*. Um total de 81 (22,0%) isolados foi resistente a polimixina, sendo 22 (27,2%) *E. coli* e 59 (72,8%) *K. pneumoniae*. Heteroresistência foi identificada em 76 (20,7%) dos isolados, sendo 15 (19,7%) *E. coli* e 61 (80,3%) *K. pneumoniae*.

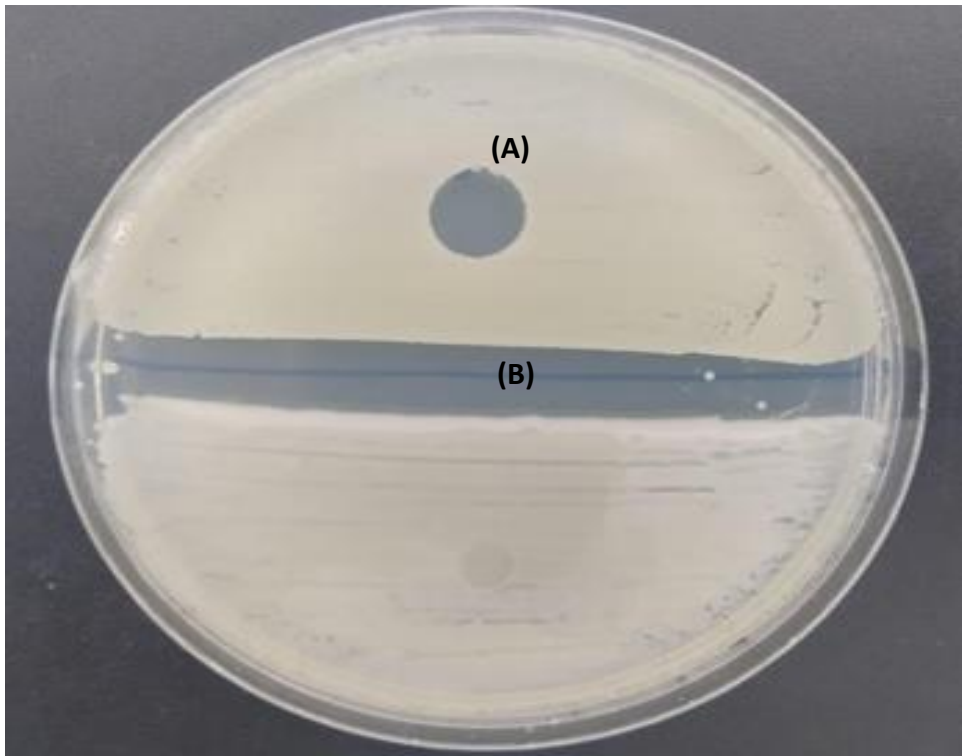


Figura 4 - Placa de Agar Muller Hinton com cultura de *Klebsiella pneumoniae* submetida à triagem com o teste da gota de polimixina. Na semeadura (A) existe halo totalmente limpo, onde a gota da solução do antibiótico inibiu o crescimento da bactéria (cepa sensível). Em (B) há crescimento bacteriano no local em que foi gotejada a solução de polimixina (cepa resistente).

Fonte: Autor



Figura 5 - Placa de Agar Muller Hinton com cultura de *Klebsiella pneumoniae* submetida à triagem com o teste da gota de polimixina. Dentro do halo observam-se pequenas colônias resistentes, evidenciando o fenômeno de heterorresistência.

Fonte: Autor

5.1.2 Teste de sensibilidade à polimixina por microdiluição em caldo

Entre todos os 366 isolados submetidos ao teste da gota, a microdiluição em caldo foi realizada para 199 isolados escolhidos de forma aleatória, sendo 78 *E. coli* e 121 *K. pneumoniae*. Foram analisados 91, 81 e 27 isolados que demonstraram sensibilidade, resistência e heteroresistência no teste da gota, respectivamente. Os valores de CIM das cepas controles e cepas selvagens utilizadas nos testes de microdiluição variaram de 0,125 a 128,0 $\mu\text{g/mL}$, conforme demonstrado na Figura 6 e 7. Os testes de microdiluição em caldo foram aplicados para análise destes 81 isolados resistentes pelo teste de triagem da gota e confirmou resistência para 44 isolados, ou seja, tiveram uma concentração inibitória mínima (CIM) maior ou igual a 4,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo 4 isolados de *Escherichia coli* e 40 isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Adicionalmente, 4 isolados classificados como heterorresistentes tiveram CIM de 4,0 $\mu\text{g/mL}$. O BrCAST (2022) considera o ponto de corte maior ou igual 4,0 $\mu\text{g/mL}$ para uma enterobactéria ser considerada resistente a polimixina, o teste de triagem pela gota comparado com as diluições em caldo teve uma sensibilidade de 100%, todos os 91 isolados sensíveis no teste da gota tiveram uma CIM < 4,0 $\mu\text{g/mL}$.

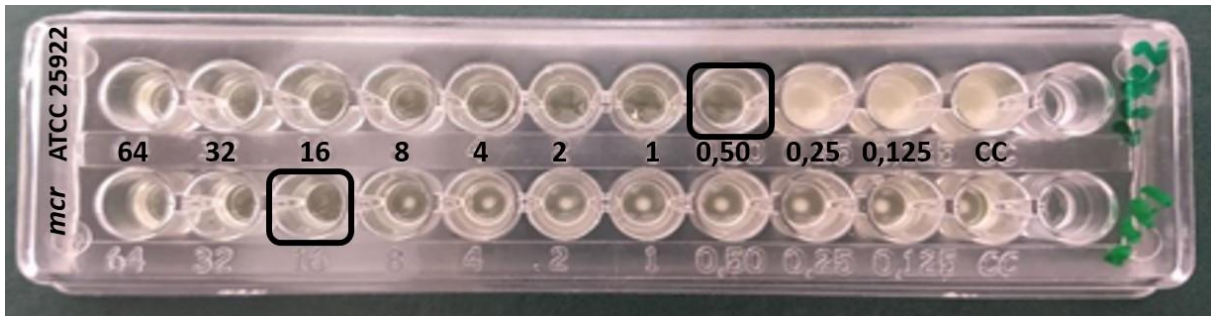


Figura 6 - Placa de POLICIMBAC (microdiluição) demonstrando o crescimento da cepa sensível a polimixina (CIM 0,50 µg/mL), com ausência de crescimento a partir do 4º poço (ATCC 25922) e, uma cepa resistente, demonstrando crescimento até 8º poço, caracterizando um CIM de 16,0 µg/mL .

Fonte: Autor

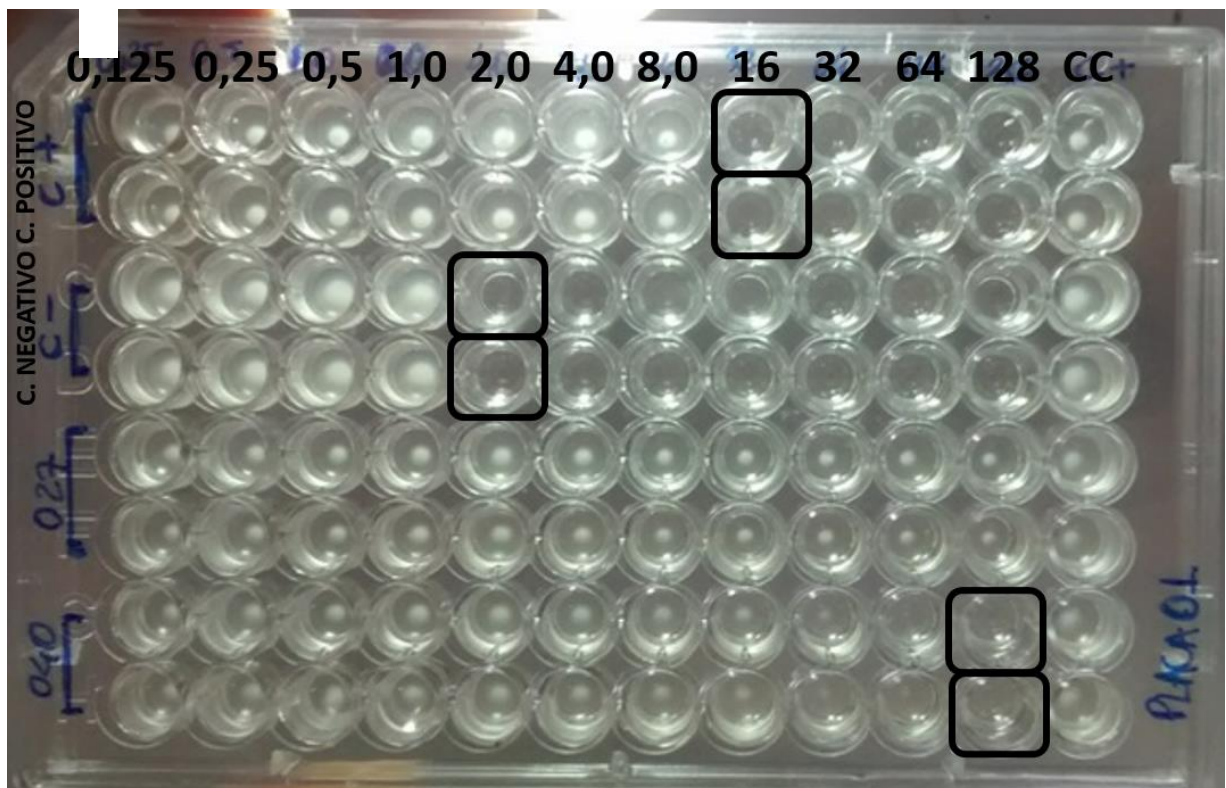


Figura 7 - Placa de 96 poços utilizada para microdiluição em caldo no teste de sensibilidade à polimixina. Todos os isolados foram testados em duplicata. É possível visualizar com sinalização a ausência de crescimento do controle positivo (*mcr-1*/cepa resistente) no poço com CIM: 16,0 µg/mL. Apresentando controle de crescimento em todos os poços com visualização de botões (CC), e controle negativo (ATCC25922/cepa sensível) com valores de CIM: 2,0 µg/mL, dentro da faixa de sensibilidade. Também há duas cepas selvagens (027 e 040) caracterizadas resistentes, sendo possível visualizar crescimento bacteriano representado com botões em todos os poços do teste em 027, e CIM:128 µg/MI em 040.

Fonte: Autor

Os valores de CIM para *Klebsiella pneumoniae* são maiores do que aqueles observados para *E.coli*, como demonstrado na Figura 8. Adicionalmente foram identificados três isolados de *K. pneumoniae* e um isolado de *E. coli*, os quais foram classificados como heterorresistentes no teste da gota.

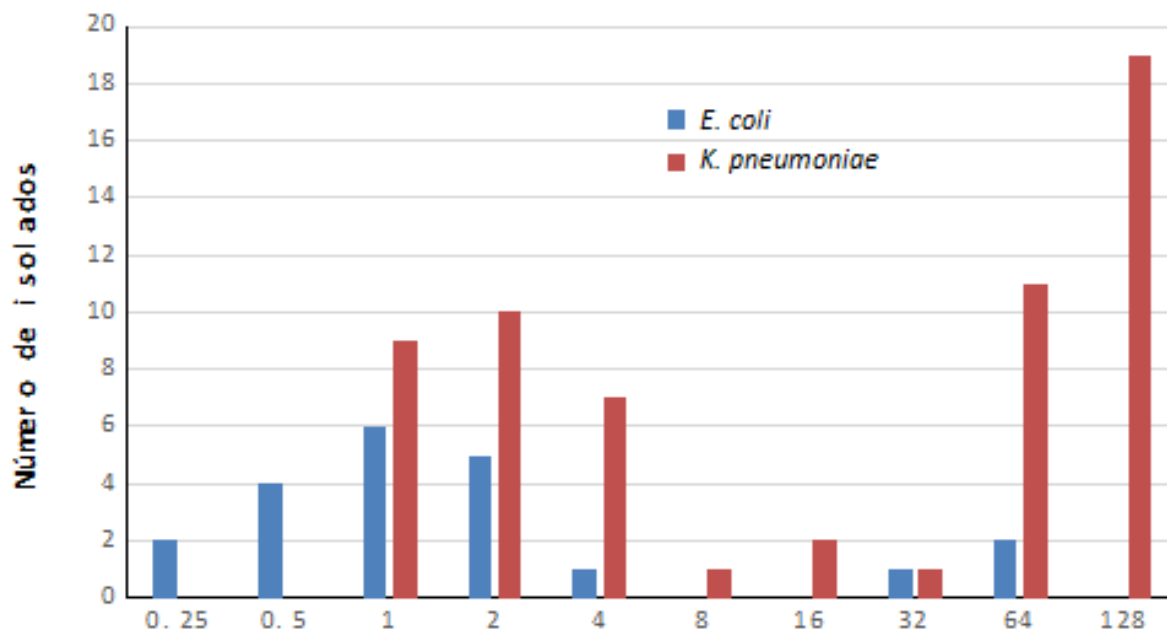


Figura 8 - Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima de polimixina (CIM) entre os 81 isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* que apresentaram resistência na triagem com o teste da gota.

Fonte: Autor

A especificidade do teste da gota foi de 76,1% em relação a microdiluição. A tabela III mostra as características do teste da gota frente ao teste de microdiluição em caldo. Todos isolados sensíveis foram confirmados como sensíveis, resultando em uma sensibilidade de 100%. Se considerarmos os quatro casos heterorresistentes que foram resistentes na microdiluição em caldo, a sensibilidade será de 90,9%.

Tabela 3 - Caracterização do perfil de sensibilidade à polimixina dos isolados avaliados no teste da gota e na microdiluição em caldo (n= 199)

Bactéria	TESTE DA GOTA			MICRODILUIÇÃO EM CALDO		TOTAL
	Sensível N (%)	Heteroresistente N (%)	Resistente N (%)	Sensível N (%)	Resistente e N (%)	
<i>K. pneumoniae</i>	47 (51,6)	15 (55,5)	59(72,8)	81 (52,2)	40(90,9)	121(60,8)
<i>E.coli</i>	44 (48,3)	12 (44,4)	22(27,1)	74 (47,8)	4 (9,1)	78(39,2)
TOTAL	91 (45,7)	27(13,5)	81(40,7)	155(77,8)	44 (22,2)	199(100,0)

Fonte: Autor

Os parâmetros de avaliação do teste de triagem pela gota encontram-se na Tabela IV, sendo que os quatro isolados heterorresistentes na gota foram considerados como resistentes na avaliação da acurácia.

Tabela 4 - Valores de sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e negativo para o teste de triagem da gota

CIM				Parâmetro	Estimado (%)	IC (95%)	
	R	S	Total	Sensibilidade	100	91,9 – 100,0	
Teste da Gota	R	44	37	81	Especificidade	76,1	68,8% - 82,1%
	S	0	118	118	VPP	54,3%	43,5 – 64,7%
Total		44	155	199	VPN	100	-
				Acurácia	81,41	75,4 – 86,2	

CIMs: considerando pontos de corte do BrCAST 2022 – (Resistente ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$); R= resistente; S= Sensível

*VPP: Valor preditivo positivo

**VPN: Valor preditivo negativo

Fonte: Autor

O teste de coeficiente *Kappa de Cohen* foi aplicado a partir dos resultados obtidos na microdiluição e teste da gota, o número de concordâncias observadas foi de 162 (81,41% das observações), o número de concordâncias esperadas por acaso foi de 109,8 (55,19% das observações), com valores de Kappa= 0,59. Intervalo de confiança de 95% compreende valores dentro da faixa de 0,475 a 0,695. A capacidade do teste da gota detectar corretamente uma amostra resistente foi 100% e excluir corretamente um isolado sensível foi 76,1%. A probabilidade de um isolado de *K. pneumoniae* ou *E. coli* resistente à polimixina receber uma avaliação de sensibilidade correta apenas utilizando o teste da gota é de 54%. Sumarizando, entre os 121 isolados de *K. pneumoniae* e as 78 cepas de *E. coli*, o teste da gota identificou um total de cepas resistentes à polimixina sendo 59 (72,8%) isolados de *K. pneumoniae* e 22 (27,1%) isolados de *E.coli*. O teste de microdiluição confirmou resistência em 40 isolados de *K. pneumoniae* entre os 59 considerados resistentes no teste da gota (67,8%), enquanto para *E. coli*, dos 22 isolados identificados como resistentes no teste da gota, somente quatro isolados (18%) tiveram a resistência confirmada pela microdiluição em caldo.

Para identificar fatores de riscos associados à resistência a polimixina, os dados demográficos e clínicos foram estratificados de acordo com a sensibilidade a este antimicrobiano para todos os 44 casos classificados como resistentes pelo teste de microdiluição em caldo (Tabela V).

Tabela 5 - Características demográficas e clínicas de pacientes com infecção da corrente sanguínea devido a *K. pneumoniae* e *E. coli* estratificada por sensibilidade à polimixina, conforme determinado pelo teste de microdiluição em caldo ($n = 199$)¹

Características	PR (n=44)	PS (n=155)	P-value
Idade (anos), mediana (IQT)	68 (61-82)	66 (51-79)	0,07
Idade ≥ 65 anos	36 (63,2)	113 (53,1)	0,174
Sexo masculino	30 (52,6)	109 (51,2)	0,845
Comorbidades			
Diabetes mellitus (doença grave)	10 (22,7)	12 (7,7)	0,0009
Tumor sólido	8 (18,2)	23 (14,8)	0,577
Malignidade hematológica	10 (22,7)	44 (28,4)	0,382
Insuficiência cardíaca crônica	7 (15,9)	9 (5,8)	0,011
Insuficiência renal crônica	12 (27,3)	28 (18,1)	0,105
Doença hepática crônica	2 (4,5)	11 (7,1)	0,263*
Acidente vascular cerebral	8 (18,2)	17 (10,1)	0,205
Internação hospitalar anterior (dias), mediana (IQR)	20,5 (8,5-40,5)	10 (4-25)	0,0583
Intervenção hospitalar anterior*			
Ventilação mecânica	13 (29,5)	8 (5,2)	0,000001
Cateter urinário de demora	15 (34,1)	9 (5,8)	<0,000001
Cateter venoso central	25 (56,8)	33 (21,3)	<0,000001
Cirurgia	18 (40,9)	15 (9,7)	<0,000001
Uso prévio de antibióticos*	5 (11,4)	13 (8,4)	0,361
Sepse	31 (70,4)	41 (26,5)	<0,000001
Choque séptico	7 (15,9)	17 (10,1)	0,322
Infecção associada aos cuidados de saúde	35 (79,5)	57 (36,8)	<0,000001
Óbito	23 (52,3)	25 (16,1)	<0,000001

SD: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil; *Trinta dias antes da bacteremia; PS: Polimixina sensível; PR: Polimixina resistente segundo a análise da microdiluição.¹ 83 isolados heteroresistentes não foram incluídos nesta análise.

Fonte: Autor

Os pacientes com isolados resistentes à polimixina apresentaram maior frequência de comorbidades como diabetes e também insuficiência cardíaca crônica. Além disso, observa-se que os pacientes resistentes fizeram uso de dispositivos com maior frequência e apresentaram gravidade das infecções, principalmente concomitantes aos quadros de sepse, e são mais susceptíveis ao desfecho de óbito.

Quanto ao perfil de sensibilidade, *E. coli* foi bastante sensível aos antimicrobianos testados, com 23% dos isolados resistentes às cefalosporinas e 1% de resistência aos carbapenêmicos, enquanto a espécie *K. pneumoniae* teve 55% de resistência às cefalosporinas e 22% de resistências aos carbapenêmicos (Tabela VI).

Tabela 6 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* submetidos a avaliação de sensibilidade à polimixina pelo teste da gota

Antibiótico	<i>Escherichia coli</i> N=198(%)			<i>K. pneumoniae</i> N= 168(%)		
	S	I	R	S	I	R
Amicacina	198 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	153 (91,1)	0 (0,0)	15 (8,9)
Gentamicina	175 (88,4)	0 (0,0)	23 (11,6)	103 (61,3)	2 (1,2)	63 (37,5)
Ceftazidima	152 (76,8)	0 (0,0)	46 (23,2)	76 (45,2)	0 (0,0)	92 (54,8)
Ceftriaxona	152 (76,8)	0 (0,0)	46 (23,2)	76 (45,2)	0 (0,0)	92 (54,8)
Cefepime	152 (76,8)	0 (0,0)	46 (23,2)	76 (45,2)	0 (0,0)	92 (54,8)
Piperaciclina\tazobactam	187 (94,5)	0 (0,0)	11 (5,5)	90 (53,6)	15 (8,9)	63 (37,5)
Ciprofloxacina	120 (60,6)	0 (0,0)	78 (39,4)	81 (48,2)	10 (5,9)	77 (45,8)
Meropenem	196 (99,0)	0 (0,0)	2 (1,0)	132 (78,6)	2 (1,2)	34 (20,2)
Imipenem	196 (99,0)	0 (0,0)	2 (1,0)	128 (76,2)	3 (1,8)	37 (22,0)
Ertapenem	196 (99,0)	0 (0,0)	2 (1,0)	129 (76,8)	2 (1,2)	37 (22,0)
Tigeciclina	196 (99,0)	2 (1,0)	0 (0,0)	158 (94,0)	2 (1,2)	8 (4,8)

S = Sensível; I = Sensível Dose Dependente; R = Resistente.

Fonte: Autor

Na Tabela VII, encontra-se representado o perfil de resistência a outros antibióticos pelas bactérias resistentes à polimixina, e neste cenário, identificamos que 75% dos isolados de *E. coli* resistentes à polimixina são também resistentes a Ciprofloxacina e Gentamicina. Os isolados de *K. pneumoniae* com resistência à polimixina, apresentam em sua maioria resistência às cefalosporinas (77%), e em 50% de resistência aos carbapenêmicos também apresentam o perfil de resistência a outros fármacos.

Tabela 7 - Perfil de resistência a outros antibióticos entre as 44 cepas confirmadas como resistentes à polimixina, através do teste de microdiluição em caldo.

Tratamento	Espécies	
	<i>E.coli</i> (n=4 [%])	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=40 [%])
Amicacina	0(0,0)	4(10,0)
Ampicilina + Sulbactam	3(75,0)	30(90,0)
Cefepime	1(25,0)	31(77,5)
Ceftazidima	1(25,0)	31(77,5)
Ceftriaxona	1(25,0)	32(80,0)
Cefuroxima	1(25,0)	32(80,0)
Ciprofloxacino	3(75,0)	29(72,5)
Gentamicina	3(75,0)	20(50,0)
Piperaciclina + Tazobactam	1(25,0)	26(65,0)
Imipenem	0(0,0)	20(50,0)
Meropenem	0(0,0)	20(50,0)
Tigeciclina	0(0,0)	3(7,5)

Fonte: Autor

A Tabela VIII apresenta o perfil de multirresistência das 44 cepas resistentes à polimixina, através do teste de microdiluição em caldo. Amicacina e Tigeciclina são as drogas em que os isolados resistentes a polimixinas são mais sensíveis. Relativo à espécie *Escherichia coli*, das quatro cepas resistentes à polimixina, dois isolados foram também resistentes a Ciprofloxacina e Gentamicina. Dentre os isolados da espécie *K. pneumoniae*, 15 (37,5%) isolados foram sensíveis aos carbapenêmicos, e destes, cinco isolados (12,5%) foram sensíveis a todos os outros antibióticos testados. Entre todas as cepas testadas, 37 (84,1%) apresentaram o perfil MDR. Sete (15,9%) isolados possuíam perfil de resistência estendida (XDR), sensível apenas a Amicacina ou Tigeciclina. Quatro isolados (10%) de *K. pneumoniae* foram resistentes a todos os antibióticos testados, com exceção da Tigeciclina, para os quais três isolados foram SDD (sensível dose dependente) e um isolado foi sensível.

Tabela 8 - Perfil de multirresistência entre os isolados de enterobactérias resistentes à polimixina em casos de infecção de corrente sanguínea em Salvador, Bahia.

Grupos de fármacos	<i>E. coli</i> N=4 (%)	<i>K. pneumoniae</i> N=40 (%)
AMC, ASB, PPT, CAZ, CTX, CRO, CPM, CIP ^a	1 (25,0)	15 (93,7)
CAZ, CTX, CRO, CPM, CIP, GEN ^a	2 (50,0%)	10 (87,5)
IMP, MER, GEN, AMC, ASB, PPT ^a	0 (0,0)	9 (100,0)
AMI, CAZ, CTX, CRO, CPM, AMC, CIP ^b	0 (0,0)	4 (100,0)
TIG, AMI, IMP, MER, AMC, ASB, PPT ^b	0 (0,0)	3 (100,0)
AMI, CFM, CAZ, CRO, CRX, CIP, GEN, PPT, IMP, MER	0 (0,0)	4 (10,0)
CFM, CAZ, CRO, CRX, CIP, GEN, PPT, IMP, MER ^{&}	0 (0,0)	4 (10,0)

^aMDR. ^bXDR

[&] Todos os isolados são SDD para Amicacina e um isolado foi sensível a Gentamicina, todos os 4 isoaldos foram sensíveis a tigeciclina.

Fonte: Autor

5.2 Pesquisa de Genes de Resistência às Polimixinas (*mcr-1*; *mgrB*; *phoP/Q* e *PmrA/B*)

A pesquisa do gene plasmidial e dos genes cromossomais foi realizada em diferentes isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

5.2.1 Detecção do gene *mcr-1*

A busca do gene plasmidial *mcr-1* foi realizada em 110 isolados avaliados pelo teste da gota, incluindo cepas resistentes e suscetíveis. Assim, foram utilizadas duas cepas sensíveis à polimixina (uma *K. pneumoniae* e uma *E. coli*), 27 heterorresistentes (12 *E. coli* e 15 *K. pneumoniae*) e 81 isolados, resistentes. Somente um isolado de *E. coli* foi positivo (HB234) para o gene *mcr-1*, este isolado apresentou uma CIM de 16 µg/ml. O perfil eletroforético da reação de PCR para o gene *mcr-1* pode ser visualizado na Figura 9.

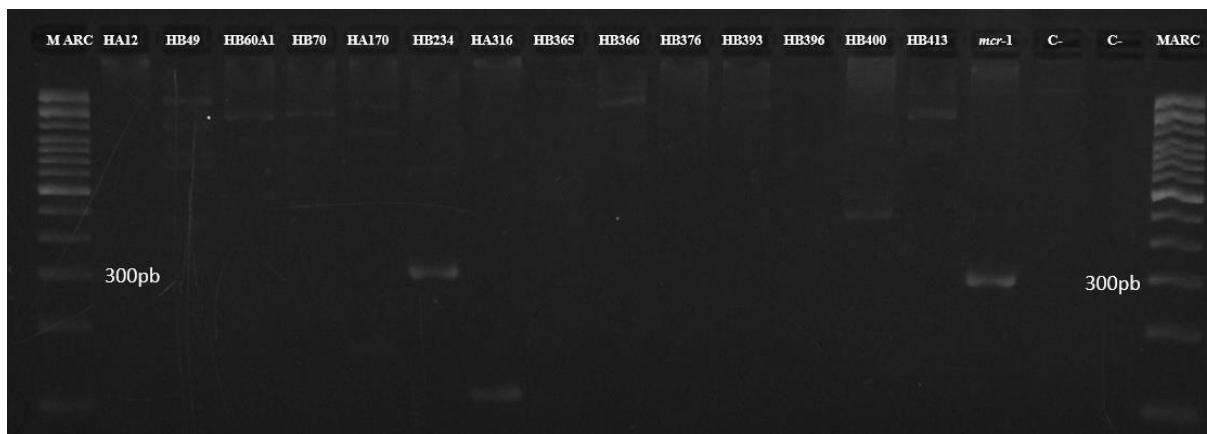


Figura 9 - Eletroforese em agarose a 1% do produto de PCR para detecção do gene plasmidial *mcr-1* com identificação do produto com 320 pares de base.

Fonte: Autor.

5.2.2 Detecção do gene *mgrB*

O gene *mgrB* foi investigado para os mesmos 110 isolados descritos no item anterior. A detecção do gene *mgrB*, foi positiva em apenas um isolado (HA19) de *K. pneumoniae* (Figura 10), considerado então positivo para expressão deste gene. As bandas em HA01, HA07, HA35, HA103 refletem a marcação de 253 pb que corresponde ao gene *mgrB* sem mutação, com 47 aminoácidos.

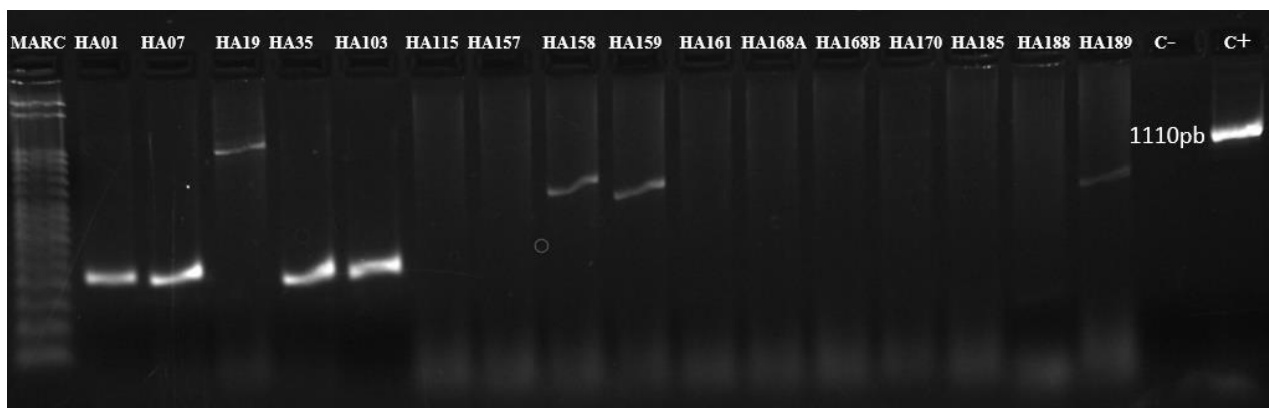


Figura 10 - Gel da PCR para detecção do gene *mgrB* mutado/truncado. A banda em HA19 indica que esta amostra expressa este gene sugerindo a possibilidade de gene *mgrB* mutado gerando proteínas truncadas, com tamanho semelhante ao controle positivo.

Fonte: Autor

5.2.3 Detecção do gene *phoQ/P*

A presença do gene *phoQ* (Figura 11) foi identificada em 78 cepas, sendo 7 de *E. coli* e 71 de *K. pneumoniae*. Dos 78 isolados com detecção do gene *phoQ*, 22 (28,2%) expressaram resistência à polimixina pelo método de microdiluição em caldo. As demais 56 cepas positivas no PCR foram resistentes (n=7) ou heteroresistentes (n=49) no teste da gota.

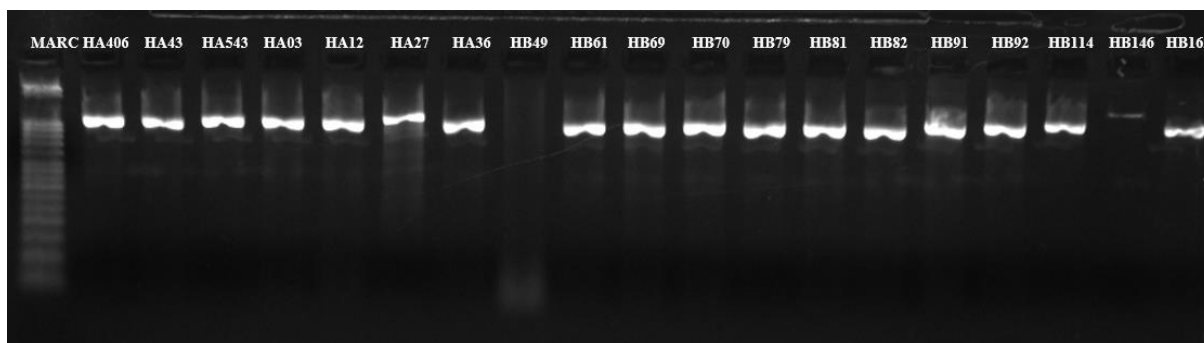


Figura 11 - Perfil de eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de PCR para detecção do gene cromossomal *phoQ*, com detecção de fragmento de 1594pb.

Fonte: Autor

A detecção de *phoP* foi observada em 88 amostras resistentes, sendo 80 (90,9%) em *K. pneumoniae*. Destas 88 cepas, apenas 36 (40,9%) tiveram a resistência confirmada pela microdiluição em caldo. Um total de 47 (53,4%) foram heteroresistentes no teste da gota. Entre as 70 amostras heteroresistentes, 48 foram positivas para o gene *phoQ* e 47 foram positivas para o gene *phoP*. (dados não mostrados)

5.2.4 Detecção dos genes *pmrA/B*

O gene *pmrA* foi detectado em 86 isolados, sendo 30 (68%) dentre as 44, resistentes pelo teste de microdiluição e as demais 56 foram resistentes (n=3) ou heteroresistentes (n=53) no teste da gota. O gene *pmrB* foi detectado em 68 isolados, sendo 4 isolados de *E. coli* heteroresistentes e *K. pneumoniae* foram 15 resistentes e 49 heteroresistentes. Em 58 cepas de *K. pneumoniae* foi identificada a presença de ambos os genes *pmrA/pm rB*. A figura 12 mostra o padrão eletroforético de produtos de PCR com amplificação do gene *pmrA*.

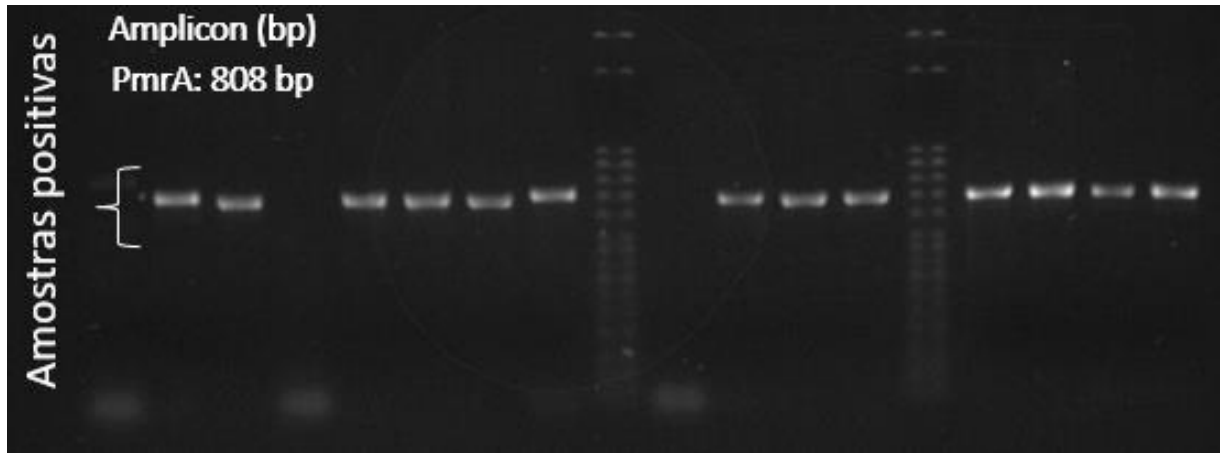


Figura 12 - Perfil de eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de PCR para detecção do gene cromossomal *pmrA*, com detecção de fragmento de 808 pares de bases.

Fonte: Autor

Entre 41 amostras que foram resistentes no teste da gota e sensíveis no teste de microdiluição, identificamos genes de resistência em 12 (29,0%), sendo a seguinte distribuição: *phoQ* foi detectado em 4 isolados, *mgrB* em 1, *phoP* em 1, *pmrA* em 1, *phoQ/phoP* em 1, *phoP/pmrB* em 1, *phoP/pmrA/pmrB* em 1, *phoQ/phoP/pmrA* em 1, e *phoQ/phoP/pmrA/pmrB* em 1 isolado.

6 DISCUSSÃO

Caracterizada como um problema de saúde pública, a resistência microbiana está altamente relacionada à morbidade, mortalidade e elevação dos custos durante a assistência à saúde, o que colabora com o agravamento das infecções (NETO, 2020). As infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos se disseminaram globalmente, deixando as polimixinas, como "tratamento de último recurso" devido a agravos clínicos como neurotoxicidade e nefrotoxicidade. Entretanto, esta resistência aos carbapenêmicos aumenta a probabilidade de eventos como sepse e óbito, observado neste estudo. No presente estudo a frequência de isolados resistentes a polimixinas foi 22,1%, o que está de acordo com o estudo realizado em São Paulo, Brasil, Silva et al. (2022) com isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases, cujo índice de resistência à polimixina vem crescendo, variando de 1% em 2011 a 27% em 2015. Na China, os resultados encontrados por Zhang et al. (2021) em um estudo envolvendo hospitais terciários com isolados resistentes de *K. pneumoniae* e *E. coli* determinou a prevalência e mecanismos moleculares de enterobactérias resistentes à polimixina, encontrando um total de 3,8%, demonstrando que a frequência de cepas resistentes pode variar segundo a localidade.

No presente estudo a maioria dos pacientes que fizeram uso de polimixinas apresentava um isolado resistente a um ou mais carbapenêmicos, sendo então a resistência a esta classe terapêutica um limítrofe importante na inclusão de terapias de última escolha como as polimixinas. O uso irracional de carbapenêmicos deveu-se ao surgimento de cefalosporinases resultando em resistência aos carbapenêmicos (COSTA JUNIOR et al., 2022). A resistência a polimixinas tem ocorrido também devido à pressão seletiva causada pelo uso inadequado desses antibióticos. Os mecanismos de resistência são mediados por alterações intrínsecas, mutacionais ou genéticas em genes cromossômicos. O mecanismo inclui as modificações químicas da rede reguladora de controle da porção lipídica A do lipopolissacarídeo, reduzindo a carga negativa e sua afinidade pelas polimixinas (RAY et al., 2022). As polimixinas (colistina e polimixina B) tornaram-se o antibiótico de último recurso e foram reclassificadas como criticamente importantes para a medicina humana pela Organização Mundial da Saúde em 2011 (XIE et al., 2022).

Os mecanismos de resistência a polimixinas podem ser plasmidiais ou, na maioria dos casos, cromossomais, como observado inclusive neste estudo. Além dos mecanismos cromossomais, o único gene móvel de resistência à colistina/polimixina B (*mcr*) relatado em enterobactérias e encontrado em uma das cepas de *E. coli* deste estudo é responsável pela

propagação horizontal da resistência às polimixinas, levando a uma necessidade urgente de aumentar a vigilância para detectar resistência a estes fármacos (RAY et al., 2022). A transferência horizontal mediada por plasmídeo resulta na rápida disseminação de genes de resistência entre várias espécies bacterianas, que é responsável por uma ampla variedade de fenótipos multidroga resistente em bactérias que podem causar infecções em humanos. A existência de *mcr-1* e outros genes de resistência sugere a presença de diferentes vias para a transmissão horizontal (SILVA et al., 2022), como foi descrito neste trabalho com a detecção de diversos genes não só plasmidiais como cromossomais.

Desde a descoberta da resistência à colistina mediada por plasmídeo pela primeira vez na China em 2015, o *mcr-1*, foi detectado em mais de 50 países e regiões em todo o mundo. É interessante saber que, apesar desta pesquisa ser direcionada a amostras clínicas humanas e ser comparada a trabalhos semelhantes na maior parte desta discussão, atualmente cepas portadoras de *mcr-1* foram isoladas de animais, carne crua e água de ambientes. Devido à transferibilidade do plasmídeo que abriga *mcr-1*, quinze espécies bacterianas foram relatadas como positivas para este gene, culminando em desafios para a saúde pública em todo o mundo (XIE et al., 2022). Nas cepas dos dois hospitais terciários deste estudo, uma *E. coli* possuía o gene, que já está disseminado em países como Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, Chile, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (DAZA CARDONA, 2022). O trabalho de Costa Junior et al (2022) descreveu que relatos iniciais da presença de *mcr-1* no Brasil foram baseados em 16 amostras de *E. coli* isoladas de aves e suínos, o primeiro caso de isolados clínicos e amostras ambientais carregando *mcr-1* foi relatado em 2016, e atualmente, existem vários relatos de isolados produtores de *mcr-1* relacionados a infecções hospitalares em todo o país.

Apesar dos dados esparsos, a resistência à polimixina foi documentada em oito de 11 países asiáticos já estudados, tendo o gene *mcr-1* como o marcador genético predominante. Nesta casuística foi encontrado apenas um isolado, entre os 110 avaliados, positivo para o gene plasmidial *mcr-1*. A presença generalizada de resistência a carbapenêmicos e polimixina, incluindo sua disseminação em oito países asiáticos, representa um risco contínuo e aumenta a ameaça de infecções resistentes a ambas as classes antimicrobianas (MALCHIONE et al., 2019). Girardello et al. (2021) isolaram 490 bastonetes Gram-negativos resistentes à colistina de infecções humanas em um ambiente hospitalar na região Nordeste do Brasil, dos quais oito eram *Escherichia coli mcr-1* positivo. O estudo de Elaskary e Badawy (2023) ao investigarem as carbapenemases e determinar a suscetibilidade à colistina encontraram o gene *mcr1* em 9,1% dos isolados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmico. Cerca de 16,3% destas cepas

eram resistentes à colistina. No nosso estudo entre as 44 cepas confirmadas resistentes a polimixina, 20 também apresentavam resistência a algum carbapenêmico, mas não apresentavam o gene *mcr-1*. Cordeiro-Moura et al. (2022) detectaram a presença de *mcr-1* em uma cepa de *E. coli* isolada de uma amostra de rio em João Pessoa, Paraíba, a cepa isolada com o gene apresentou MIC de 4 µg/mL, dado que confirma os achados do presente estudo, demonstrando que a frequência deste gene está muito mais associada a espécie de *E. coli*, e o isolado geralmente apresenta valores de MIC baixos, quando comparados a isolados que expressam genes cromossômicos. Da mesma forma, Fernandes et al. (2016) detectaram a presença do gene *mcr-1* em cepas de *E. coli* isoladas de águas costeiras da cidade de São Paulo. No estudo conduzido por Bir et al. (2022) foram testados um total de 100 isolados de enterobacterales resistentes a carbapenêmicos, 15% eram resistentes à colistina, e uma cepa de *K. pneumoniae* abrigava o gene *mcr-1*, demonstrando que mesmo sendo mais provável encontrar este gene em espécies de *E. coli*, onde inclusive foi detectado neste trabalho, também é possível encontrá-lo em outros bacilos. Lorenzoni et al. (2018) investigaram a presença do gene *mcr-1* em 340 isolados clínicos de bacilos Gram-negativos resistentes à polimixina coletados entre agosto de 2015 e janeiro de 2018 em um hospital universitário localizado em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, e uma *E. coli* abrigou o gene *mcr-1*, confirmando também os dados deste estudo. Rocha et al. (2020) também descreveram os mecanismos moleculares da resistência às polimixinas envolvendo a expressão de *mcr-1* em cinco isolados clínicos de enterobacterales, 2 isolados de *Escherichia coli*, 2 de *Klebsiella pneumoniae* e 1 isolado de *Citrobacter freundii*, todas as cepas eram oriundas de um hospital terciário, localizado em Recife, Brasil, confirmando que o envolvimento do gene *mcr-1* na transmissão de resistência à colistina em bacilos representa uma séria ameaça ao manejo clínico atual de infecções adquiridas na comunidade humana.

Reddy et al (2022), semelhante aos resultados do nosso estudo, determinou a prevalência de isolados clínicos resistentes à colistina obtidos de pacientes de UTIs e enfermarias de um hospital terciário. Entre 31 BGN resistentes à colistina, 41,94% (13/31) eram *K. pneumoniae*, 25,81% (8/31) eram *E. coli*. Na microdiluição, a maioria das *E. coli* e *K. pneumoniae* foram confirmadas como resistentes à colistina apresentando MIC \geq 4 µg/ml. *K. pneumoniae* apresentou maior prevalência de resistência à colistina do que *E. coli* (0,71% vs 0,42%, p<0,05), como relatado também neste estudo, reafirmando a resistência à colistina como situação relevante para saúde pública mundial. No trabalho de El-Mokhtar et al. (2021) foi investigado o surgimento de resistência à colistina em 140 isolados nosocomiais de *E. coli*, estes pacientes apresentavam pneumonia e estavam internados na UTI com dor torácica

durante 36 meses. Os resultados apontaram que a resistência à colistina foi observada em 21/140 (15%) dos isolados de *E. coli*, frequência próxima da observada neste trabalho, que foi 9,1% (4/44).

O mecanismo de resistência à polimixina pode ser mediado cromossomicamente devido à redução na afinidade da polimixina após as modificações do lipídio A por um sistema regulador de dois componentes, e um isolado resistente pode apresentar mutações cromossômicas específicas em genes que controlam o sistema de dois componentes *phoP/Q* e *pmrA/B*, como observado em muitas cepas resistentes e até sensíveis deste estudo. O sistema *phoPQ* codifica uma pequena lipoproteína transmembranar que é responsável pela regulação negativa do sistema *phoPQ*. Como os dois sistemas regulam a resistência alterando a carga catiônica e o padrão iônico da membrana externa, mudanças em sua função podem levar a uma diminuição da carga aniônica e, conseqüentemente, impedir a interação eletrostática da célula bacteriana com moléculas de drogas (COSTA JUNIOR et al., 2022). Outro exemplo de mutação cromossômica, relatado neste trabalho e nos resultados de Silva et al. (2020) são as alterações no gene *mgrB*, caracterizadas na obra destes autores como a fonte mais comum de resistência à polimixina no ambiente clínico brasileiro em isolados de *K. pneumoniae*. Entretanto, neste estudo o gene *mgrB* foi detectada em apenas um isolado de *K. pneumoniae*.

As infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos representam um enorme desafio de saúde em todo o mundo, e são muito frequentes em hospitais terciários, como foi destacado também neste estudo. Na China, o estudo de Chein et al. (2022) avaliou a incidência de resistência à polimixina em isolados clínicos de KPC e caracterizou os mecanismos moleculares subjacentes a esses isolados. Um total de 493 destas cepas foi coletado em seis hospitais terciários durante os anos de 2017 e 2018. Observou-se uma taxa de resistência à polimixina de 2,2% (11/493), bem menor quando comparada a este trabalho. As MICs de polimixina variaram de 4 a 128 µg/mL, semelhante ao presente estudo, em 11 isolados de KPC. As principais variações genéticas identificadas envolveram uma deleção em *mgrB* e três mutações sem sentido em *pmrA*, *pmrB* e *phoP*. Além disso, foi relatada uma nova mutação em *pmrB* que pode conferir resistência à polimixina em *K. pneumoniae*. Além dos genes *mcr* mediados por plasmídeos, mutações envolvendo genes cromossomais, como *mgrB*, *phoP/phoQ*, *pmrA* e *pmrB*, são as principais causas de resistência à colistina, como foi confirmado neste estudo.

Ao realizar uma caracterização molecular dos genes de resistência associados a polimixinas, Pancotto et al. (2020) avaliaram 35 isolados de *K. pneumoniae* e detectaram 11 (32,4%) positivos para *mgrB* truncado, todos expressavam os genes correspondentes aos

sistemas *phoP/Q* e *pmrA/B*, o que corrobora os dados encontrados neste estudo com alta frequência da expressão de genes destes dois componentes e, maior incidência pela expressão de *phoP*.

O surgimento de resistência à polimixina B entre *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos torna o tratamento clínico mais difícil. Assim, Xu et al. (2022) investigaram os fatores de risco e os mecanismos de resistência nestas cepas. De janeiro de 2021 a janeiro de 2022, foram selecionados 239 isolados, todos analisados por meio de testes de suscetibilidade antimicrobiana e dados clínicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para a detecção de genes de resistência. A taxa de resistência da polimixina foi de 5,02%. Em todas as cepas de KPC 41,84% vieram da UTI, dado que também corrobora aos achados deste trabalho, onde o percentual de pacientes oriundos de UTI foi aproximadamente 36%; estes indivíduos mais manipulados tendem a apresentar cepas com perfil de resistência a um maior número de fármacos. Nas 12 cepas de KPC rastreadas, *pmrB* e *pmrA* foram superexpressos em todas as amostras que estavam ligadas à resistência à polimixina B, diferente do que foi observado neste estudo, em que entre as KPC resistentes no teste da gota, detectamos um número maior da presença de *pmrA* e *pmrB*, sendo em 30 e 15 isolados, respectivamente.

Liu et al. (2022) identificaram os fatores de risco para mortalidade em 30 dias em pacientes de unidade de terapia intensiva pediátrica (UTIP) com infecções por enterobactérias e compararam os resultados clínicos de diferentes regimes antimicrobianos. Para os 56 pacientes, a mortalidade geral em 30 dias foi de 50%. Não houve diferença significativa na mortalidade em 30 dias (42,9% versus 45,5%, $p = 0,854$) ou na taxa de eficiência clínica (53,4% versus 40,9%, $P = 0,374$) entre aqueles que foram ou não tratados com polimixina B, ou seja, o tratamento com polimixina B não conseguiu reduzir a mortalidade em 30 dias. Nosso estudo evidenciou que os pacientes que são resistentes a polimixina, apresentam também resistência a outros fármacos, sendo que este é um fator de risco para o óbito, lembrando que as polimixinas são terapias de última escolha no tratamento das enterobactérias.

Outro estudo, com o objetivo de identificar preditores para o isolamento de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos e polimixina entre pacientes hospitalizados foi o de Teo et al. (2019), que encontraram entre 33 casos analisados 43,2% isolados eram de *K. pneumoniae*, percentual semelhante ao achado deste trabalho. Pacientes imunocomprometidos com diabetes mellitus são particularmente propensos a infecções nos pés por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, que pode ser agravada por osteomielite crônica (TAHA et al.,

2018). Essa característica pode explicar a diferença significativa encontrada neste estudo em pacientes portadores desta disfunção glicêmica e apresentar isolado resistente às polimixinas. Os indivíduos com diabetes têm risco 10 vezes maior de serem hospitalizados por infecções de tecidos moles e ossos do pé, do que indivíduos sem diabetes. Outros estudos demonstram que a resistência aos antibióticos em pacientes diabéticos aumentou dramaticamente, sendo assim, testes de sensibilidade aos antibióticos, como o teste da gota para polimixina, são requisitos importantes para o manejo de infecções, o que pode auxiliar em melhores escolhas terapêuticas, principalmente quando estes doentes são propensos ao uso contínuo de antibioticoterapias, como acometidos por situações crônicas (ANVARINEJAD et al., 2015). Diversas pesquisas relataram a bacteriologia das infecções do pé diabético nos últimos 25 anos com presença de bacilos MDR (PRIYADARSHINI SHANMUGAM et al., 2020). Rawat et al. (2012) também trazem informações sobre infecções entre pacientes diabéticos e altas taxas de resistência a vários antibióticos entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A resistência a múltiplas drogas foi encontrada em 82,5% (33/40) entre bactérias Gram-negativas e 60,8% (14/23) em bactérias Gram-positivas. O baixo nível de resistência a Piperacilina/Tazobactam e o alto nível de resistência a Ceftazidima/Clavulanato também foram encontrados, o que pode ser atribuído à hiperprodução de AmpC ou à presença de beta-lactamases resistentes a inibidores (especialmente em *E. coli*) mascarando a detecção de ESBL por Clavulanato, mas permanecendo suscetível à inibição por Tazobactam. Interessantemente, houve também uma maior frequência de resistência a polimixinas em pacientes com insuficiência crônica, fato pouco explorado na literatura, mas que pode ser explicado pelo maior tempo de internamento em hospitais terciários.

Ainda considerando os fatores de risco para resistência contra antimicrobianos, o estudo de Tian et al. (2023) investigou a prevalência, fatores de risco e características epidemiológicas moleculares de enterobactérias em pacientes com doença hepática. A população foi composta por 574 pacientes adultos internados, a resistência à maioria dos antimicrobianos foi independente da espécie, diferente do que foi observado neste trabalho, no qual a espécie de *K. pneumoniae* demonstrou maior gravidade nos pacientes infectados. Vale ressaltar também que no presente estudo a doença hepática crônica não foi fator agravante para os indivíduos apresentarem isolados sensíveis ou resistentes a polimixina, mas pode ser uma característica clínica relevante segundo outros autores.

Pacientes na unidade de terapia intensiva (UTI) têm risco aumentado de infecção por *K pneumoniae* adquirida no hospital, especialmente KPC (QIN et al., 2020). Silva et al. (2020) avaliaram o impacto clínico e os potenciais fatores de risco associados a cepas de

enterobacterales resistentes à polimixina isoladas de pacientes internados em unidades de terapia intensiva neonatal e adulta. Encontraram que pacientes adultos, com uso de um cateter e procedimento cirúrgico foram considerados fatores de risco para aquisição de cepas resistentes a polimixina, situação também encontrada neste estudo. Em pacientes neonatais o uso de um cateter venoso central foi o único fator de risco associado à aquisição de cepas resistentes à polimixina. A análise dos resultados revelou que a taxa de mortalidade foi significativamente maior em pacientes adultos (66,6%) e neonatais (23,5%) com cepas resistentes à polimixina do que naqueles com cepas suscetíveis à polimixina, corroborando também os dados deste estudo. Além disso, a exposição a terapias de última escolha foi fortemente associada à mortalidade, confirmando que a aquisição dessas cepas é um preditor de desfechos desfavoráveis como foi relatado neste estudo. O tratamento combinado com um aminoglicosídeo e polimixina pode ser uma alternativa mais eficaz para melhorar os resultados dos pacientes, fato também confirmado neste estudo já que as cepas resistentes a polimixina na maioria dos casos não era resistente a Amicacina (SILVA et al, 2020).

Dentre as infecções associadas à assistência à saúde, as relacionadas a dispositivos constituem situações bastante comuns entre pacientes internados em unidade de terapia intensiva. Assim como neste trabalho, no estudo de Ávilla-Torres et al. (2021), foi determinada a distribuição de infecções associadas a dispositivos, seu perfil microbiológico e resistência bacteriana em unidades de terapia intensiva. As infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres foram as mais frequentes com 84%, seguidas pelas infecções sintomáticas do trato urinário associadas a cateter com 12% e em menor grau pneumonia associada ao ventilador mecânico com 4%, confirmando também os achados deste estudo, em que foi encontrada uma frequência de 65%, 23% e 21% quanto ao uso de dispositivos como cateter venoso central, urinário, e ventilação mecânica, respectivamente. Menlendéz et al. (2023) também realizou um estudo semelhante, analisando 308 culturas bacterianas obtidas de 188 pacientes, principalmente de origem respiratória, urinária e fluxo sanguíneo (76,7%), de origem nosocomial (65,3%), com predominância de Gram-negativos (65%) multirresistentes, diferente do que foi observado neste trabalho, a origem comunitária foi mais associada à infecção do que a nosocomial, garantindo também a necessidade de trabalhos com isolados oriundos de pacientes não internados, apesar da dificuldade neste processo, já que o acompanhamento de um paciente fora da unidade fechada é bastante desafiador.

Neste estudo, 21% dos pacientes faziam uso de ventilação mecânica, e a maioria destes apresentavam infecções por isolados resistentes a polimixina, com diferença significativa quando comparado ao grupo de isolados sensíveis. No estudo observacional

conduzido por Hasan e Rabbani (2020) com 121 pacientes, a ventilação mecânica também foi um fator agravante nos indivíduos com infecção por *K. pneumoniae* MDR, resistentes a penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, mas apenas sensível à polimixina B.

Contudo, sabe-se que infecções associadas a ventilação mecânica (VM) causada por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos estão se tornando mais prevalentes, afetando seriamente os desfechos de cura dos pacientes. Gao et al. (2019), assim como neste trabalho, estudaram o mecanismo de resistência aos medicamentos e as características epidemiológicas destas cepas, analisaram os fatores de infecção por ventilação oriundas de isolados MDR em 58 cepas, para fornecer evidências para o controle eficaz da infecção hospitalar em pacientes ventilados entre 2016 a 2018. Os isolados mais comuns incluíram *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Todas foram sensíveis à polimixina B, uma alta taxa de resistência de *K. pneumoniae* MDR isolado de pacientes com dispositivos de ventilação indicou que os infectados apresentavam maior mortalidade e maior tempo de internação do que o grupo controle. Estes achados corroboram com a frequência e significância dos dados apresentados neste estudo ao comparar internados com cepas resistentes a polimixina em processo de VM.

Estudando os preditores para aquisição e infecção de enterobactérias em receptores de transplante renal, Freire et al. (2021) identificou fatores de risco em 331 pacientes colonizados por enterobactérias multidroga resistentes envolvendo pacientes renais crônicos. Pacientes com uso de carbapenêmicos e colonização por cepa resistente à polimixinas tiveram 93,8% de probabilidade de desenvolver infecção. Neste trabalho, insuficiência renal crônica não foi relevante em adquirir cepas resistentes a polimixinas, sendo necessários outros estudos.

Sodhi et al. (2020), avaliaram a prevalência e o padrão de resistência à colistina em espécies de *Klebsiella spp* em um hospital terciário na Índia, as cepas foram isoladas de sangue e os pacientes eram internados em unidades de terapia intensiva (UTIs). Identificamos em nosso estudo em 5,6% dos pacientes internados, cepas de *K. pneumoniae* PoliR em (40/199) 20,1% dos indivíduos, muitos também acometidos em unidade intensiva, frequentemente manipulados e com clínica mais grave, reforçando que isolados de *Klebsiella* resistentes à colistina se tornaram uma ameaça nestas unidades fechadas.

Ergönül et al. (2016) descreveram a prevalência de resistência a antibióticos e preditores de mortalidade para infecções Gram-negativas da corrente sanguínea associadas aos cuidados de saúde. No total, foram incluídos 831 casos de 17 unidades de terapia intensiva em diferentes centros na Turquia; a taxa de mortalidade por todas as causas foi de 44%. A resistência ao carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* foi de 38% e a taxa de

resistência à colistina foi de 6%. A análise multivariada mostrou que uso de cateter venoso central, pneumonia associada ao ventilador foram significativamente associados à mortalidade. Neste estudo foi encontrado um percentual superior (20,1%) devido utilização de metodologias padronizadas pelo BrCAST (2022) em identificação de resistência a classe de polimixinas. Contudo, apesar dos achados do presente trabalho, no estudo de meta-análise desenvolvido por Uzairue et al. (2022) relacionando a resistência a colistina em isolados de *Klebsiella pneumoniae* estudados em 2015 e em 2016–2019 foi encontrada uma taxa agrupada de resistência à colistina de 2,89% (48/1661) e 2,95% (28/948), respectivamente, dados bem diferentes ao deste trabalho. A maior resistência à colistina foi encontrada em isolados de *Klebsiella pneumoniae* da Tailândia (19,2%), enquanto a menor resistência agrupada foi em *Klebsiella pneumoniae* da Coreia do Sul (0,8%). A prevalência agrupada de multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* de infecção da corrente sanguínea variou de 80,1%, 95% CI (65,0–95,2%). Foi observada também resistência significativa à polimixinas em isolados de *Klebsiella pneumoniae* em infecções da corrente sanguínea da unidade de terapia intensiva (UTI) em comparação com aqueles de não UTIs, corroborando os dados deste estudo ao comparar perfil de resistência e ocupar unidades de cuidados acentuados. Porém, hoje, ainda há uma escassez de estudos abordando o tratamento com polimixina B (PMB) para infecções por produtores de carbapenemases por *K. pneumoniae* (KPC).

Neste estudo grande parte dos isolados resistentes a polimixinas não eram resistentes a Amicacina, sendo então esta droga uma importante alternativa nestas cepas ou, inclusive, como auxílio na terapia combinada com polimixina, demonstrando um benefício nestes padrões terapêuticos, informações confirmadas no estudo de coorte retrospectivo de Medeiros et al. (2019), que avaliou o desfecho primário em 30 dias de pacientes com infecções da corrente sanguínea (ICS) por KPC. Um total de 82 indivíduos com estas cepas oriundas de ICS foram identificados; 40 (48,8%) faleceram nos primeiros 30 dias. A mortalidade dos pacientes tratados com a combinação de dois agentes antimicrobianos, principalmente Polimixina B e Amicacina, foi significativamente menor (37,5%) em comparação com a monoterapia (64,7%) (P=0,01).

O presente estudo também confirmou fatos descritos em outras fontes primárias como de Finello et al. (2021), que determinaram as características epidemiológicas e microbiológicas dos episódios de infecções da corrente sanguínea (ICS) em pacientes oncológicos neutropênicos; 74,1% dos isolados eram bacilos Gram-negativos e *Escherichia coli* foi o microrganismo mais frequente (32,1%), assim como também entre os 366 pacientes avaliados neste estudo. Nesse mesmo sentido, Amanati et al. (2021) investigaram a

epidemiologia, a microbiologia e os fatores de risco associados à mortalidade e infecções bacterianas da corrente sanguínea resistentes a múltiplas drogas entre pacientes adultos com câncer. Em torno de 2.393 hemoculturas foram testadas durante o período de estudo de quatro anos. Foram incluídas 414 culturas positivas. *Escherichia coli* foi o microrganismo Gram-negativo mais comum, responsável por 47% (123/262) dos resultados positivos. No estudo de Ariza et al. (2021) a espécie isolada com maior frequência também foi a *E. coli*, seguido pela *K. Pneumoniae*.

Do mesmo modo, apesar de *Escherichia coli* ser a espécie mais frequente, Liang et al. (2019) confirmaram que os casos de ICS mais severos devem-se a infecções ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae*, corroborando aos achados desse estudo. Estes autores coletaram 40 casos de infecções da corrente sanguínea por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos tratados com combinações baseadas em polimixina B ao longo de 30 meses. O desfecho primário foi a taxa de mortalidade em 30 dias igual a 52,5% (21/40).

Grande parte das pneumonias relacionadas a ventilação mecânica em pacientes criticamente enfermos de unidades de terapia intensiva (UTI) estão associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade, esse processo quando causado por bactérias Gram-negativas (BGN) multirresistentes (MDR), como *Klebsiella pneumoniae*, é um evento infeccioso com risco de vida, principalmente quando estes isolados também são resistentes a polimixinas, como descrito nesse trabalho, porém, muitas destas infecções, causadas por esta espécie, o paciente também pode apresentar uma cepa sensível a estas drogas de última escolha (HASAN; RABBANI, 2020), ou aminoglicosídeo; entre os 44 isolados resistentes a polimixina confirmados na microdiluição em caldo, quatro também eram resistentes a amicacina, e 23 a gentamicina, evidenciando grandes diferenças entre os fármacos da classe dos aminoglicosídeos. Três cepas eram resistentes a tigeciclina, 20 a carbapenêmicos, e 33 a cefalosporinas de terceira geração.

De acordo com Abboud et al. (2014) a mediastinite é uma das complicações mais temidas após a cirurgia cardíaca, resultando em altas taxas de mortalidade (10% a 47%) e aumento do tempo de internação e dos custos hospitalares. Estes autores conduziram um estudo retrospectivo de pacientes de cirurgia cardíaca que desenvolveram mediastinite devido a infecções por Enterobacteriaceae resistente a carbapenem, de dezembro de 2010 a março de 2014. Os pacientes foram agrupados em suscetíveis ou resistentes para polimixina. Nos 33 pacientes que desenvolveram infecção durante o período do estudo, vinte (61%) foram isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Os pacientes iniciaram empiricamente a terapia combinada (n = 30, 91%); para a terapia direcionada, 10 (30%), foram tratados com cobertura

dupla, 14 (42%) cobertura tripla e 9 (27%) com quatro ou mais antibióticos. Quinze (45%) pacientes estavam infectados com cepas resistentes à polimixina; 18 (55%) estavam infectados com cepas sensíveis à polimixina. Pacientes com infecção resistente à polimixina tiveram mortalidade significativamente maior em 60 dias em comparação com pacientes portadores de infecção suscetível à polimixina, afirmando a relação também encontrada neste trabalho associada ao risco de doença cardíaca crônica e utilização de polimixinas.

Dubrovskaya et al. (2013) descrevendo os resultados de pacientes com infecções por KPC tratados com monoterapia de polimixina B, em que foi realizada revisão retrospectiva de prontuários médicos e recebendo monoterapia entre 2007 a 2011, verificaram que 53% dos pacientes com dados de cultura alcançaram cura microbiológica. A mortalidade no final do tratamento foi de 10% e a mortalidade em 30 dias foi de 28%, provando que quanto mais tempo o paciente fica internado em unidades fechadas maior chance de gravidade destas infecções, afirmação também encontrada neste estudo e outros trabalhos deste grupo de pesquisa. Nesse mesmo sentido, Boszczowski et al. (2019) observaram resistência à polimixina a *Klebsiella pneumoniae* em pacientes gravemente enfermos, principalmente de unidades de terapia intensiva e/ou pacientes imunossuprimidos com altas taxas de mortalidade. Foram apresentados os resultados clínicos de 28 pacientes infectados por PoliR em um hospital terciário. Infecções da corrente sanguínea associada a cateter central, além de episódios de bacteremia por outras fontes, foram as mais frequentes (61%), como encontrado nesse estudo.

Neste trabalho aproximadamente 70% dos pacientes com isolados resistentes a polimixinas apresentaram sepse, enquanto apenas 26% dos internados com cepas sensíveis, confirmando que este evento era diretamente associado ao perfil de sensibilidade dos microorganismos causadores da infecção nas duas unidades fechadas em análise e, embora as infecções relacionadas a bactérias Gram-positivas sejam mais prevalentes em ambiente hospitalar, a maior taxa de mortalidade está associada a microrganismos Gram-negativos, especialmente enterobacterales como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp (ALHASHEM et al., 2017), espécies objeto deste estudo. Apesar dos pacientes infectados com isolados resistentes a polimixinas apresentarem mais frequentemente o quadro séptico, o uso das polimixinas é fundamental na terapêutica destes indivíduos, inclusive na pesquisa realizada por Esteban et al. (2013) diversos benefícios da hemoperfusão de Polimixina em pacientes sépticos foram relatados, incluindo melhora hemodinâmica, aumento da proporção de oxigênio arterial de pressão parcial e fração de oxigênio inspirado (PaO₂ / FiO₂), diminuiu a mortalidade em 28 dias e diminuiu os níveis de endotoxina.

Neste estudo foi confirmado o teste da gota sendo uma ótima opção de triagem à resistência a polimixina em isolados de *K. pneumoniae*, principalmente para locais onde a realização de microdiluição em caldo é inviável pelos custos e rotina trabalhosa. Perez et al. (2021) também avaliaram o desempenho do teste de gota para detecção de resistência à polimixina B entre enterobactérias e bastonetes Gram-negativos não fermentadores resistentes a carbapenêmicos. Foram testados 715 isolados, destes: 628 espécies de enterobacterales e 87 bastonetes Gram-negativos não fermentativos. Para o teste de gota de polimixina, as concentrações variam de 0,25 a 8,0 µg/mL, diferente deste estudo que foi utilizada uma concentração de 16,0 µg/mL. O teste de gota verificado por estes autores apresentou uma concordância maior que 95%, sem erros muito importantes, para isolados de *K. pneumoniae*, porém neste trabalho a concordância obtida segundo o coeficiente Kappa de Cohen foi próxima de 60%. Ambos os dados confirmam os benefícios de utilizar o teste, porém como já descrito nesta tese, este ensaio é muito positivo na detecção de amostras sensíveis, porém a microdiluição é mais efetiva em detectar cepas resistentes.

A determinação da sensibilidade às polimixinas sempre foi um desafio, principalmente na rotina do laboratório clínico. O estudo de Shinohara et al. (2022), assim como Perez e colaboradores, também avaliaram dois métodos fenotípicos rápidos, simples e baratos para testar a suscetibilidade à polimixina B (PMB) em enterobacterales e bacilos Gram-negativos não fermentadores. Foram testados 100 isolados de três hospitais no sul e sudeste do Brasil de 1995 a 2019. O teste da gota utilizou uma concentração de 12 µg/ml, os valores de concordância categórica ultrapassaram 90% demonstrando ser excelente para triagem inicial de resistência à polimixina em rotinas laboratoriais pela simplicidade na realização e uso de insumos baratos, podendo otimizar as decisões terapêuticas. Iglesias Llorente et al. (2022) em seu trabalho também descreve o teste da gota como uma alternativa eficaz para testar a suscetibilidade antimicrobiana da colistina contra *K. pneumoniae* e *E. coli*, podendo inclusive testar vários isolados em um curto período de tempo, reafirmando a praticidade deste ensaio. Portanto, apesar do teste da gota não substituir completamente o padrão ouro, é um teste fácil e viável, reduz o tempo de resposta para detecção de resistência à polimixina e pode impactar na implementação precoce de intervenções terapêuticas precisas.

7 CONCLUSÕES

A resistência à polimixina é mais frequente entre isolados de *K. pneumoniae* do que de *E. coli*, afirmando os isolados de *K. pneumoniae* mais susceptíveis a infecções multidroga resistente. O teste da gota mostrou ser uma boa opção para triagem de resistência à polimixina entre isolados de *K. pneumoniae*, principalmente quando a cepa é caracterizada como sensível, sendo um teste excelente para confirmação de sensibilidade descrita na automação e rotina diária dos laboratórios clínicos. Por outro lado, esta técnica superestima o número de isolados verdadeiramente resistentes, logo, não é um parâmetro adequado em caracterizar os isolados resistentes, isto ocorre com mais frequência entre isolados de *E. coli*. Entre os 76 isolados com heterorresistência, 71 (93,4%) apresentaram alguma alteração genética cromossomal responsável pela resistência à polimixina, garantindo que este perfil se aproxima mais das cepas resistentes, que as com perfil sensível, embora outras pesquisas devam acontecer para melhor elucidação da heterorresistência. Os riscos de infecção por isolados resistentes aumentam quando o paciente possui faixa etária acima dos 50 anos, e se for submetido a cuidados de saúde e uso de dispositivos hospitalares em unidade fechada, pois estes indivíduos apresentam um sistema imune mais debilitado, e quando manipulados objetos que transmitem e acumulam microorganismos; assim a hipótese H1 foi confirmada, já que pacientes com isolados resistentes apresentam maiores chances de desenvolver quadros clínicos graves que pacientes com cepas de bacilos sensíveis. Entre as cepas resistentes, a expressão do gene *phoP* foi a mais frequente, seguido do gene *phoQ*, sugerindo que o componente *phoP/Q* é o mais associado a resistência a polimixina em isolados de *K. pneumoniae*. Apenas uma cepa de *Escherichia coli* estava expressando o gene plasmidial *mcr-1*, sinalizando para o risco de disseminação desta resistência, através da transferência de material genético para outros bacilos.

Contudo, estratégias antimicrobianas capazes de contornar o desenvolvimento de resistência são urgentemente necessárias. Assim, utilizar o teste da gota pra uma considerável escolha de tratamento é uma excelente opção, sendo importante também, aprofundar estudos para melhor compreensão dos fatores críticos que contribuem para a persistência e agravamento da resistência antimicrobiana visando desenvolver perspectivas inovadoras sobre este cenário desafiador que acomete a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, Cely Saad et al. 487 Infections Caused by Enterobacteriaceae Species following Cardiac Surgery: Impact of Polymyxin Resistance on Treatment Outcomes. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2014. p. S180.
- AIRES, Caio Augusto Martins et al. mgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6969-6972, 2016.
- ALHASHEM, Fatema et al. Treatment of sepsis: what is the antibiotic choice in bacteremia due to carbapenem resistant enterobacteriaceae? **World journal of clinical cases**, v. 5, n. 8, p. 324, 2017.
- ALVIM, A.L.S.; COUTO, B.R.G.M.; GAZZINELLI, A. Epidemiological profile of healthcare-associated infections caused by Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Ver EscEnferm USP.**, São Paulo, v.53, p.1-6, julho 2019.
- ANVARINEJAD, Mojtaba et al. Isolation and antibiotic susceptibility of the microorganisms isolated from diabetic foot infections in Nemazee Hospital, Southern Iran. **Journal of pathogens**, v. 2015, 2015.
- ANTOCHEVIS, Laura Czekster. **Avaliação da presença de heterorresistência à polimixina B em *Klebsiella pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) isolada em hemoculturas de paciente em tratamento com este antibiótico.** Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Curso de Farmácia, Porto Alegre, 2014.
- ARAÚJO, Lorena Galvão de. **Infecções de corrente sanguínea causadas por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em hospitais terciários de Salvador, Bahia: caracterização epidemiológica e clínica.** 2019. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.
- ARNOLD, T. M.; FORREST, G. N.; MESSMER, K. J. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. **American Journal of Health-System Pharmacy**. 2007.
- BARTH, N. **Avaliação do sinergismo entre polimixina B com tigeciclina, imipenem e meropenem em isolados de enterobactérias produtoras de KPC.** 59 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, 2014.
- BARTOLLETI, Flávia et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849, 2016.
- BABAY, Hanan A. et al. Bloodstream infections in pediatric patients. **Saudi medical journal**, v. 26, n. 10, p. 1555, 2005.
- BELLIER, Claire et al. Risk factors for Enterobacteriaceae bacteremia after liver transplantation. **Transplant International**, v. 21, n. 8, p. 755-763, 2008.

BONVENTO, Marcelo. Acessos vasculares e infecção relacionada à cateter. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 19, n. 2, p. 226-230, 2007.

BOOLCHANDANI, Manish; D'SOUZA, Alaric W.; DANTAS, Gautam. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**, v.20, p. 356-370, march 2019.

BORDIGNON, Jardel Cristiano; LIMA, L. R. Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 283-8, 2017.

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

CAL, R.G.R.; CAMARGO, L.F.A.; KNOBEL, E. Infecção da Corrente Sangüínea Relacionada a Cateter: Infectologia e Oxigenoterapia Hiperbárica. Rio de Janeiro, **Atheneu**, v.4, p.49-64, 2003.

CARNEIRO, Marcelo. **Terapia com polimixina B em infecção de corrente sanguínea por bacilos gram-negativos multirresistentes**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina, Ciências Médicas: Porto Alegre, RS, 2015.

CARRIZO, AV Ocaña et al. Bacteriemia por enterobacterias en adultos en un hospital universitario: análisis de cinco años. **Revista argentina de microbiología**, v. 39, n. 1, p. 38-43, 2007.

CLEGG, St; GERLACH, G. F. Enterobacterial fimbriae. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 934, 1987.

CHOTIPRASITSAKUL, Darunee et al. Comparing the outcomes of adults with Enterobacteriaceae bacteremia receiving short-course versus prolonged-course antibiotic therapy in a multicenter, propensity score-matched cohort. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 2, p. 172-177, 2018.

COSTA, Fernanda SL et al. Identification of resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multivariate analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

DIENSTMANN, Rosabel et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

DUBROVSKAYA, Yanina et al. Polymyxin B monotherapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: risk factors for treatment failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013.

DUGUID, J. P.; OLD, D. C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. In: **Bacterial adherence**. Springer, Dordrecht, p. 185-217, 1980.

ELIAS, Laura S. et al. The impact of polymyxin B dosage on in-hospital mortality of patients treated with this antibiotic. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 10, p. 2231-2237, 2010.

ERGÖNÜL, Önder et al. Healthcare-associated gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 381-385, 2016.

ESTEBAN, Elisabeth et al. Immunomodulation in sepsis: the role of endotoxin removal by polymyxin B-immobilized cartridge. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

FALAGAS, Matthew E.; RAFAILIDIS, Petros I.; MATTHAIYOU, Dimitrios K. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. **DrugResistance Updates**, v. 13, n. 4-5, p. 132-138, 2010.

FERNANDES, Ana Paula et al. Incidência Bacteriana em Hemoculturas no Hospital das Clínicas Samuel Libânio de Pouso Alegre MG. **REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.2, p.122-133, 2011.

GAO, Bo et al. Molecular epidemiology and risk factors of ventilator-associated pneumonia infection caused by carbapenem-resistant enterobacteriaceae. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 262, 2019.

GIRARDELLO, Raquel; GALES, Ana Cristina. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle da Infecção**, v. 2, n. 2, p. 66-9, 2012.

GONZÁLEZ-BELLO, Concepción et al. β -Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1859-1881, 2019.

GUERRERO, P. Pérez et al. Infecciones por enterobacterias. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 55, p. 3276-3282, 2014.

GUIMARÃES, Aline Caixeta et al. Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 5, p. 864-869, 2011.

HALABY, Teysir et al. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6837-6843, 2016.

HASAN, M. J.; RABBANI, R. Dual-route-administration versus single-route-administration of polymyxin B in VAP caused by MDR *Klebsiella pneumoniae*: An observational study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 130, 2020.

HAYAKAWA, K. et al. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. **Int. J. Infect. Dis.** 2012.

HOLANDA, Cecília Maria de Carvalho Xavier. **Manual de bacteriologia e de enteroparasitos**. Natal, RN: EDUFRN, 2017, 134 p.

HUANG, Dennis et al. In vitro assessment of combined polymyxin B and minocycline therapy against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, 2017.

HOLMES, Alison H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

HOLT, John G. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th. **Baltimore: William & Wilkins**, 1994.

HOLT, Kathryn E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. 3574-3581, 2015.

ISMAIL, Bahiah et al. Predictors of polymyxin B treatment failure in gram-negative healthcare-associated infections among critically ill patients. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 6, p. 763-769, 2018.

JAYOL, Aurélie et al. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the *phoPQ* regulatory system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2780-2784, 2015.

JOHN, Josiane F. et al. Severe infusion-related adverse events and renal failure in patients receiving high-dose intravenous polymyxin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, 2018.

KAYSER, Daniela Fonseca Lisboa. **Análise da taxa de mortalidade entre pacientes com infecção da corrente sanguínea por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* multissensíveis versus multirresistentes internados em unidades de terapia intensiva**. 33 f. Trabalho de conclusão de curso (Medicina) – Faculdade da Saúde e Ecologia Humana – FASEH, Vespasiano, 2018.

LAVAGNOLI, Lilian Silva et al. Fatores associados à aquisição de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 25, e2935, 2017.

LEE, G.C.; BURGESS, D.S. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **J. Clin. Med Res.** 2013.

LEE, Yi-Chien et al. Bacteremic urinary tract infection caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae are associated with severe Sepsis at admission: implication for empirical therapy. **Medicine**, v. 95, n. 20, 2016.

LIU, Y.Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 2015.

LORENZO, José de Jesús Coria; RAMIREZ, Alfredo Morayta; MUÑOZ, Yetzamin Gutiérrez. Polimixinas na era de lamultidrogorresistencia. **Revista de Enfermedades Infecciosas em Pediatria**, v. 24, n. 98, p. 66-70, 2011.

MAGALHÃES, Vanessa Caroline Randi; SOARES, Valéria Martins. Análise dos mecanismos de resistência relacionados às enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas em um hospital de referência em doenças infecto-contagiosas. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 278-81, 2018.

MALCHIONE, Marissa D. et al. Carbapenem and colistin resistance in Enterobacteriaceae in Southeast Asia: review and mapping of emerging and overlapping challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 4, p. 381-399, 2019.

MARSTON, Hilary D. et al. Antimicrobial resistance. **Jama**, v. 316, n. 11, p. 1193-1204, 2016.

MENDES, Carlos Alberto Caldeira; BURDMANN, Emmanuel A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 752-759, 2009.

MILLER, A.K. et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother**. 2011.

MOFFATT, J.H.; et al. Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2011.

MOSQUITO, Susan et al. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, v. 28, p. 648-656, 2011.

NETO, Guilherme Tude Coelho et al. Detecção de enterobactérias em superfícies de uma unidade mista de saúde no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista de Investigação Biomédica do Uniceuma**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.

NETO, Carlos Alberto Medeiros. Perfil de resistência a antimicrobianos de Enterobacteriaceae isoladas de secreção traqueal e hemocultura de pacientes em uma Unidade de Terapia Intensiva. **RBAC**, v. 52, n. 3, p. 264-9, 2020.

NETO, Rodrigo Antônio Brandão. **Enterobactérias**. MedicinaNet, maio 2019. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/7722/enterobacterias.htm>>. Acesso em: 11 out 2020.

NOGUEIRA, Paula Sacha Frota et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev. enferm. UERJ**, v.17, n.1, p. 96-101, 2009.

NORCIA, Bruna Maria de M. et al. Pacientes pediátricos portadores de enterobactéria resistente aos carbapenêmicos em um hospital escola do Sul do Brasil. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 1, 2015.

NORDMANN, Patrice; NAAS, Thierry; POIREL, Laurent. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

OCAÑA CARRIZO, A.V. et al. Bacteremia by enterobacteria in adults from a university hospital: a five-year analysis. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 39, n. 1, p. 38-43, 2007.

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.

OLIVEIRA, Flávio Andrade. **Deteccção do gene "mcr"-1 em enterobactérias resistentes à colistina isoladas de amostras clínicas provenientes do complexo hospitalar da UNICAMP**. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP, 2020.

ORDÓÑEZ, García; COLMENERO CASTILLO, J. D. Modelos pronósticos en bacteriemia y sepsis. In: **Anales de Medicina Interna**. Arán Ediciones, SL, p. 53-55., 2006.

PASTERAN, F. et al. **Development and validation of simple tests (agar spot, colistin drop, 1ml-broth disk elution MIC and tablet pre-diffusion) as an alternative to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in gram-negative bacilli**. 28^o European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 2018.

PATEL J. B. et al. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clin. Microb. News**. 2009.

Pearson, M. A. J. et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. **Rev Panam Salud Publica**. 2019

POIREL, Laurent et al. Antimicrobial resistance in Escherichia coli. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 289-316, 2018.

PRIYADARSHINI, SHANMUGAM, Jeya M. et al. The bacteriology of diabetic foot ulcers, with a special reference to multidrug resistant strains. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 3, p. 441, 2013.

QUAN, Jingjing et al. High prevalence of ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in community-onset bloodstream infections in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 273-280, 2016.

RAWAT, Vinita et al. Bacteriological and resistance profile in isolates from diabetic patients. **North American journal of medical sciences**, v. 4, n. 11, p. 563, 2012.

RAMOS, P. I. P.; CUSTÓDIO, M. G. F.; QUISPESAJI, G. D. The polymyxin B-induced transcriptomic response of a clinical, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* involves multiple regulatory elements and intracellular targets. *BMC Genomics* 17, 737. 2016.

ROCK, C.; DONNENBERG, M. S. **Human Pathogenic Enterobacteriaceae. Reference Module in Biomedical Sciences**, 2014. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/290907123_Human_Pathogenic_Enterobacteriaceae>. Acesso em: 03 out 2020.

ROMANELLI, R.M.C et al. Fatores de risco e letalidade de infecção da corrente sanguínea laboratorialmente confirmada, causada por patógenos não contaminantes da pele em recém-nascidos. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 2, p. 189-196, 2013.

SABATIER, C.; PEREDO, R.; VALLÉS, J. Bacteriemia em paciente crítico. **Medicina Intensiva**, v. 33, n. 7, p. 336-345, 2009.

SEIBERT, Gabriela et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SILVA, Gabriela J. da; MENDONÇA, Nuno. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3, n. 1, p. 18-28, 2012.

SILVA, Ketrin Cristina da; LINCOPAN, Nilton. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 91-99, Apr. 2012.

SILVA, Kesia Esther da et al. Risk factors for polymyxin-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in critically ill patients: An epidemiological and clinical study. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 3, p. 105882, 2020.

SILVA, Kesia Esther da et al. Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Brazil with multiple *mgrB* gene mutations. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 7, p. 151448, 2020.

SILVA, Thays Viana da; ESTEVES, Deigilam Cestari. Infecção hospitalar: a emergência da *Klebsiella pneumoniae*. **Revista Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, v.14, n.1, 2017.

SOBIESZCZYK, Magdalena E. et al. Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant gram-negative respiratory tract infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 566-569, 2004.

SORG, R.A.; LIN L.; VAN DOORN, G.S.; SORG, M.; MOLSON J.; NIZET V. et al. Collective Resistance in Microbial Communities by Intracellular Antibiotic Deactivation. **PLoS Biol.**, 2016.

SRINIVAS, Pavithra; RIVARD, Kaitlyn. Polymyxin resistance in gram-negative pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, p. 38, 2017.

STELLA, Ariel Eurides; DE OLIVEIRA, Angélica Franco. Padrões de resistência a antibióticos em enterobactérias isoladas de infecções do trato urinário em gestantes. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e862986337-e862986337, 2020.

SUN, J. D. et al. Impact of carbapenem heteroresistance among clinical isolates of invasive *Escherichia coli* in Chongqing, southwestern China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 469. e1-469. e10, 2015.

TADESSE, Daniel A. et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 5, p. 741, 2012.

TANSARLI, Giannoula S. et al. A systematic review and meta-analysis of antibiotic treatment duration for bacteremia due to Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 5, 2019.

TENOVER, Fred C. et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of clinical microbiology**, vol. 33, p. 2233–2239, 1995.

TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006.

TORO, Lina MaríaEcheverri; CORREA, Juan Carlos Cataño. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. **Iatreia**, v. 23, n. 3, p. 240-249, 2010.

URBAN, Carl et al. Polymyxin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 388-389, 2011.

VILLA, Laura et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. **Microbial genomics**, v. 3, n. 4, 2017.

TEO, Jocelyn Qi-Min et al. Risk factors and outcomes associated with the isolation of polymyxin B and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae spp.: A case-control study. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 5, p. 657-662, 2019.

XU, Yongchang et al. An evolutionarily conserved mechanism for intrinsic and transferable polymyxin resistance. **MBio**, v. 9, n. 2, 2018.

YAN QI, ZE QING WEI, SHUJUAN JI, XIAOXING DU, PING SHEN, YUNSONG YU, ST, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 66, 2011.

YONEKURA, Márcia Yumi; ABRAMCZYK, Marcelo Luiz; LAPCHIK, Milton Soibelman. Utilização de cateter central de inserção periférica e ocorrência da infecção da corrente sanguínea em uma unidade de terapia intensiva neonatal. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 93-96, 2015.

ZAVASCKI, Alexandre Prehn et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1206-1215, 2007.

ZUSMAN, Oren et al. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 29-39, 2016.

WERTHEIM, Heiman et al. Global survey of polymyxin use: a call for international guidelines. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 1, n. 3, p. 131-134, 2013.

Anexo A - Questionário epidemiológico

Perfil de resistência e padrão genético entre patógenos gram negativos isolados em infecções de corrente sanguínea (ICS) de origem comunitária e hospitalar na região metropolitana da cidade de Salvador, Bahia

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO CASO

1. IDENTIFICAÇÃO		
1.1	Nº de Identificação no estudo:	NIE _____
2. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA		
2.1	Data do internamento: ___/___/___	DI ___/___/___
2.2	Local do internamento: 1 Enfermaria 2 UTI Adulta 3 UTI pediátrica 4 UCO 4 UTI neurológica 6 Outro	LINT __
2.3	Se enfermaria ou outro, qual? _____	QENF __
2.5	Local de aquisição de infecção: _____ * O local de aquisição da infecção é aquele no qual o paciente encontra-se a mais de 48h no ambiente hospitalar. Caso o paciente seja transferido para outra unidade onde faça uso de dispositivos médico-cirúrgicos invasivos, a ICS pode ser relacionada à nova unidade. Desconsiderar o item caso a infecção seja de origem comunitária.	LINF _____ __
2.6	Data da coleta da hemocultura: ___/___/___	DDIAGH ___/___/___
3. HISTÓRICO CLÍNICO		
3.1	Foi internado nos últimos 6 meses? 1 Sim 2 Não 9 Não sabe	INT __
3.2	Se sim, qual a hospital? _____	QHOSP _____
3.3	Quantos dias ficou internado no outro hospital: __ __ __	DIOH _____
3.4	O paciente utilizou algum serviço de saúde nos últimos 06 meses (excluída internação hospitalar)? 1 Sim 2 Não 9 Não sabe	AAS __
3.4.1	Se sim, qual? _____	QAAS _____
3.5	Infecções agudas nos 30 dias anteriores a internação? 1 Sim 2 Não 9 Não sabe	INFA __
	Se sim, qual?	
3.5.1	Gripe	GRI __
3.5.2	Faringite	FARI __
3.5.3	Otite aguda	OTIA __
3.5.4	Sinusite aguda	SINUA __
3.5.5	Diarréia	DIR __
3.5.6	Abscesso dentário	ADENT __
3.5.7	Conjuntivite	CONJ __
3.5.8	Pneumonia	PNEUMO __
3.5.9	Infecção Urinária	IURO __
3.5.10	Infecção cutânea	ICUT __
3.5.11	Infecção intra-abdominal	IINTRAAB __
3.5.12	Endocardite infecciosa	ENDO __
3.5.13	Outros	OINFA __
3.5.14	Se outros, qual? _____	QOINFA _____
3.6	Surgiu outra infecção após 72 horas de internamento? 1 Sim 2 Não	SOI72H __
3.6.1	Se sim, qual data do diagnóstico, sítio de infecção e agente etiológico?	
3.6.1.1	Infecção 1:	SIT1 _____
3.6.1.2	_____	SIT2 _____
	_____	SIT3 _____
3.6.1.3	_____	SIT4 _____
	_____	SIT5 _____
3.6.1.4	Infecção 2:	AESIT1 _____
	_____	AESIT2 _____
	_____	AESIT3 _____
3.6.1.5	_____	AESIT4 _____
	_____	AESIT5 _____
	Infecção 3:	

<p>3.6.1.6</p> <p>3.7</p> <p>3.7.1</p> <p>3.7.2</p> <p>3.7.3</p> <p>3.7.4</p> <p>3.7.5</p> <p>3.7.6</p> <p>3.7.7</p> <p>3.7.8</p> <p>3.7.9</p> <p>3.7.10</p> <p>3.7.11</p> <p>3.7.12</p> <p>3.7.13</p> <p>3.7.14</p> <p>3.7.15</p> <p>3.7.16</p> <p>3.7.17</p> <p>3.7.18</p> <p>3.7.19</p> <p>3.7.20</p> <p>3.7.21</p> <p>3.7.22</p> <p>3.7.23</p> <p>3.8</p> <p>3.9.1</p> <p>3.9.1.1.</p> <p>3.9.2</p> <p>3.10</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>—</p> <p>_____</p> <p>Infecção 4:</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>Presença de co-morbidades? 1 Sim 2 Não</p> <p>Classificação das co-morbidades apresentadas pelo índice de Charlson:</p> <p>Peso I:</p> <p>3.7.14 Infarto do miocárdio</p> <p>3.7.15 Insuficiência cardíaca congestiva</p> <p>3.7.16 Doença vascular periférica</p> <p>3.7.17 Doença cérebro-vascular</p> <p>3.7.18 Demencia</p> <p>3.7.19 Doença pulmonar crônica</p> <p>3.7.20 Doença de tecido conjuntivo (reumatológica)</p> <p>3.7.21 Úlcera</p> <p>3.7.22 Doença crônica do Fígado e cirrose</p> <p>3.7.23 Diabetes sem complicação</p> <p>Peso II:</p> <p>3.8 Hemiplegia ou paraplegia</p> <p>3.9.1 Doença renal moderada</p> <p>3.9.1.1. Diabetes com complicação</p> <p>3.9.2 Tumor, leucemia, linfoma</p> <p>Peso III:</p> <p>3.10 Doença de fígado moderada ou severa</p> <p>Peso VI:</p> <p>Tumor maligno, metástase</p> <p>Síndrome da Imunodeficiência Adquirida</p> <p>Outras</p> <p>Se outras, qual? _____</p> <p>Paciente onco-hematológico? 1 Sim 2 Não</p> <p>Se sim, qual a doença? _____</p> <p>Paciente neutropênico 1 Sim 2 Não</p> <p>Se sim, quantos neutrófilos na data da coleta da hemocultura? __ __ __ </p> <p>Qual motivo do internamento _____</p>	<p>DDIAGSIT1 _____</p> <p>DDIAGSIT2 _____</p> <p>DDIAGSIT3 _____</p> <p>DDIAGSIT4 _____</p> <p>DDIAGSIT5 _____</p> <p>CM __ </p> <p>IM __ </p> <p>ICC __ </p> <p>DVP __ </p> <p>DCV __ </p> <p>DME __ </p> <p>DPC __ </p> <p>DTC __ </p> <p>ULC __ </p> <p>DFCIR __ </p> <p>DSC __ </p> <p>PARA __ </p> <p>DRM __ </p> <p>DCC __ </p> <p>TLF __ </p> <p>DFMS __ </p> <p>TMM __ __ </p> <p>SIDA __ </p> <p>OCM __ </p> <p>QOCM _____</p> <p>POH __ </p> <p>QOH _____</p> <p>PNT __ </p> <p>QNEUTRO __ __ __ </p> <p>QMINT _____</p>
<p>4. EPISÓDIO INFECCIOSO E FATORES DE RISCO PARA BACTEREMIA</p>		
<p>4.1</p> <p>4.2</p> <p>4.3</p> <p>4.2.3</p> <p>4.2.4</p> <p>4.2.5</p> <p>4.2.6</p> <p>4.2.7</p>	<p>A ICS classifica-se como IRAS ou Infecção comunitária? 1 IRAS 2 IC</p> <p>*ICS adquirida na comunidade = cultura microbiana obtida até 48 horas da admissão hospitalar, não tendo sido o paciente submetido, nos 6 meses anteriores à hospitalização, a serviços de cuidados à saúde. No momento do diagnóstico os pacientes não devem estar sob o uso de dispositivos médicos invasivos. Também são classificados como portadores de IC aqueles com evidência de doença clínica antes do internamento. Os pacientes que não atendem aos referidos critérios são classificados como portadores de ICS relacionada aos cuidados à saúde (IRAS).</p> <p>A infecção caracteriza-se como primária ou secundária? 1 Primária 2 Secundária</p> <p>* Primária= Não possui foco primário identificável. Secundária = possui foco primário identificável; derivada de infecção em outro sítio.</p> <p>O Paciente apresentou fatores de risco para infecção?</p> <p> 1 Sim 2 Não 8 Não se aplica</p> <p>Se sim, qual?</p> <p>Entubação</p> <p>Traqueostomia</p> <p>Cateter</p>	<p>IRASIC __ </p> <p>INFPS __ </p> <p>PFRIS __ </p> <p>ETB __ </p> <p>TRAQ __ </p> <p>CAT __ </p>

4.2.8	Sonda urinária	SURO <input type="checkbox"/>
4.2.9	Ventilação Mecânica	VM <input type="checkbox"/>
4.2.10	Cirurgia	CIR <input type="checkbox"/>
4.2.11	Derivação ventricular interna	DVI <input type="checkbox"/>
4.2.12	Derivação ventricular externa	DVE <input type="checkbox"/>
4.2.13	Outros	QOFR _____
4.2.14	Se outros, qual? _____	SEPT _____
4.2.15	Se cateter, qual tipo? _____	QCAT <input type="checkbox"/>
4.3	Se secundária, qual sítio anatômico de origem?	SECORI _____
4.4	Qual a gravidade da ICS segundo Escore de Pitt:	ESPITT <input type="checkbox"/>
4.4.1	Pontuação +4	PC <input type="checkbox"/>
4.4.2	Parada cardíaca	COMA <input type="checkbox"/>
4.4.3	Nível de consciência comatoso	TEMP40 <input type="checkbox"/>
4.4.3	Pontuação +2	TEMP35 <input type="checkbox"/>
4.4.4	Temperatura \geq 40 °C	QPA <input type="checkbox"/>
4.4.5	Temperatura $\leq 35^\circ$ C	PA90 <input type="checkbox"/>
4.4.6	Queda de PA > 30mmHg sistólica e > 20mmHg diastólica	VASO <input type="checkbox"/>
4.4.7	PA sistólica < 90mmHg	VM <input type="checkbox"/>
4.4.8	Necessidade de vasopressor	TORP <input type="checkbox"/>
4.4.9	Ventilação mecânica	TEMP39 <input type="checkbox"/>
4.4.10	Estado de consciência torporoso	TEMP35 <input type="checkbox"/>
4.4.10	Pontuação +1	TEMP36 <input type="checkbox"/>
4.4.11	Temperatura 39 – 39,9 °C	ALERTA <input type="checkbox"/>
4.4.11	Temperatura 35,1-36°C	SINDS <input type="checkbox"/>
4.4.12	Pontuação 0	
4.4.13	Temperatura 36, 1 -38,9 °C	SOFAPAS <input type="checkbox"/>
4.4.13	Nível de consciência alerta	SOFAEKG <input type="checkbox"/>
4.5	O paciente apresentou alguma das síndromes sistêmicas? 1 Sepses 2 Choque séptico 3 Não	
4.5.1	Screening Sepses (≥ 2 pontos no qSOFA)	
4.5.2	Frequência respiratória ≥ 22 ipm 1 Sim 2 Não	
4.5.3	PAS ≤ 100 mmHg 1 Sim 2 Não	
4.5.3	Escala de Coma de Glasgow < 15 ou rebaixamento do nível de consciência 1 Sim 2 Não	
4.6		SOFA <input type="checkbox"/>
4.6.1	SOFA pré-infecção	PAOFI <input type="checkbox"/>
4.6.2	PaO2/FiO2	PLAQ <input type="checkbox"/>
4.6.3	Plaquetas x 10 ³	BILI <input type="checkbox"/>
4.6.4	Bilirrubina total	PAM <input type="checkbox"/>
4.6.5	Pressão arterial média	CHOQUE <input type="checkbox"/>
4.6.5.1	Em uso de vasopressor? 1 Sim 2 Não	VPSQ _____
4.6.5.2	Se sim, qual? _____	VPSQD _____
4.6.6	Se sim, qual dose? _____	ECGSOFA <input type="checkbox"/>
4.6.7	Escala de Coma de Glasgow	CRSOFA <input type="checkbox"/>
4.6.8	Creatinina (mg/dL)	DUSOFA <input type="checkbox"/>
4.6.8	Débito urinário (mL/d)	
4.7		SOFA2 <input type="checkbox"/>
4.7.1	SOFA infecção	PAOFI2 <input type="checkbox"/>
4.7.2	PaO2/FiO2	PLAQ2 <input type="checkbox"/>
4.7.3	Plaquetas x 10 ³	BILI2 <input type="checkbox"/>
4.7.4	Bilirrubina total	PAM2 <input type="checkbox"/>
4.7.5	Pressão arterial média	CHOQUE2 <input type="checkbox"/>
4.7.5.1	Em uso de vasopressor? 1 Sim 2 Não	VPSQ2 _____
4.7.5.1	Se sim, qual? _____	VPSQD2 _____
4.7.6	Se sim, qual dose? _____	ECGSOFA2 <input type="checkbox"/>
4.7.7	Escala de Coma de Glasgow	CRSOFA2 <input type="checkbox"/>
4.7.8	Creatinina (mg/dL)	DUSOFA2 <input type="checkbox"/>
4.7.8	Débito urinário (mL/d)	
4.8	Choque séptico: Sepses com hipotensão persistente necessitando de uso de vasopressores para manter PAM > 65mmHg E lactato > 2 mmol/L (18mg/dL) após ressuscitação volêmica adequada 1 Sim 2 Não	CHOQUE <input type="checkbox"/>
4.9.1		EPC <input type="checkbox"/>
4.9.2	Paciente com histórico de colonização por gram negativo resistente a Carbapenêmicos? 1 Sim 2 Não	EPCD ____/____/____
4.9.3	Se sim, qual a data do exame positivo mais recente? ____/____/____	EPCQ _____
4.9.3	Se sim, qual a bactéria? _____	

6. FATORES DE RISCO PARA RESISTÊNCIA BACTERIANA		
6.1	Uso prévio de ATB profilático nos últimos 15 dias? 1 Sim 2 Não Se _____ sim, _____ qual?	ATBP __ QATBP _____ ATBT __ ATBT1 _____ ATBT2 _____ ATBT3 _____ ATBT4 _____ ATBT5 _____ TEMP __ EMATB1 _____ EMATB2 _____ EMATB3 _____ EMATB4 _____ TCULT __ CULATB1 _____ CULATB2 _____ CULATB3 _____ CULATB4 _____ CULATB5 _____ DINTER __/__/__ DATBG __/__/__ DFTER __/__/__
6.2	Uso prévio de ATB terapêutico? 1 Sim 2 Não Se sim, qual? 1. _____ QND1 __/__/__ a __/__/__ 2. _____ QND2 __/__/__ a __/__/__ 3. _____ QND3 __/__/__ a __/__/__ 4. _____ QND4 __/__/__ a __/__/__ 5. _____ QND5 __/__/__ a __/__/__	
6.3	Foi empregada terapia empírica? 1 Sim 2 Não Se sim, qual ATB? 1. _____ QND6 __/__/__ a __/__/__ 2. _____ QND7 __/__/__ a __/__/__ 3. _____ QND8 __/__/__ a __/__/__ 4. _____ QND9 __/__/__ a __/__/__ 5. _____ QND10 __/__/__ a __/__/__	
6.3.1	Após o resultado da cultura o ATB foi trocado? 1 Sim 2 Não 8 Não se aplica Se sim, quais antibióticos foram utilizados? 1. _____ QND11 __/__/__ a __/__/__ 2. _____ QND12 __/__/__ a __/__/__ 3. _____ QND13 __/__/__ a __/__/__ 4. _____ QND14 __/__/__ a __/__/__ 5. _____ QND15 __/__/__ a __/__/__	
6.4	Data de início do tratamento: __/__/__ Data do início do tratamento guiado por cultura __/__/__ Data do término do tratamento: __/__/__	
6.4.1		
6.5		
6.6		
6.7		
8. EVOLUÇÃO CLÍNICA - (DESFECO DE 30 DIAS)		
7.1	Data do desfecho: __/__/__ Tipo do desfecho: 1 Curado/Melhorado 2 Transferido 3 Outro desfecho _____ 4 Óbito 9 Não se sabe	DDEF __/__/__ TDEF _____ __ COBT _____
7.2	Se óbito, causa da morte: _____	
7.3		
8.0	Paciente permaneceu internado em unidade semi-intensiva ou intensiva? 1 Sim 2 Não	UTI __ UTIA __ __ __ UTID __ __ __
8.1	Se sim, quanto tempo antes da cultura positiva? __ __ __	
8.2	Se sim, quanto tempo depois da cultura positiva? __ __ __	

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: Perfil de resistência e padrão genético entre patógenos gram negativos isolados em infecções de corrente sanguínea (ICS) de origem comunitária e hospitalar na região metropolitana da cidade de Salvador, Bahia

Pesquisador Responsável: Dra. Joice Neves Reis Pedreira **Telefone:** (071) 3283-6958

Paciente: _____ **No. de estudo:** _____

Para ser lido a todos os pacientes/responsáveis: As informações que se seguem descrevem a nossa pesquisa e o seu papel/do seu parente/cônjuge como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre esta pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo desta Pesquisa:

Você/seu parente/seu cônjuge está sendo convidado a participar de um estudo que estamos realizando no Hospital Geral Roberto Santos (HGRS), em parceria com a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Nós convidamos você/seu parente/seu cônjuge a participar deste estudo porque os seus sintomas e os seus resultados de exames laboratoriais indicam que você tem infecção de corrente sanguínea ou você/seu parente/seu cônjuge pode estar carregando uma bactéria resistente a antibióticos. A infecção de corrente sanguínea é uma infecção generalizada no sangue e pode ser muito grave. Estas infecções podem ser causadas por bactérias resistentes aos antibióticos, que são medicamentos utilizados para combater a doença. Isto significa que as opções de medicamentos são mais limitadas quando a infecção é causada por bactérias resistentes. Para identificar o agente causador da doença, o médico solicitou alguns exames de rotina, sendo os principais a cultura de sangue (hemocultura). O médico pode também ter solicitado uma cultura de outra área do corpo para verificar se você/seu parente/seu cônjuge carrega alguma bactéria resistente. Nenhuma amostra será coletada só para o estudo. Utilizaremos apenas a bactéria que já foi isolada de seu exame/de seu parente/de seu cônjuge para realizar alguns testes mais detalhados e o estudo não vai interferir no seu tratamento. O objetivo de nosso estudo é conhecer mais esta infecção na nossa população, estudando a forma como ela é transmitida; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas as adquiram e como elas respondem aos tratamentos; quais as melhores formas de tratamento, e os testes de diagnóstico. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro de orientar melhor os tipos de tratamentos utilizados para estas infecções.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo de pesquisas após ter lido este formulário de consentimento, o investigador coletará informações no prontuário médico seu/de seu parente/de seu cônjuge relacionado ao local onde moram, sua idade, sua história médica e os medicamentos já utilizados durante o tratamento. Poderá ainda obter informações através dos resultados de seus exames realizados no Laboratório. Nenhum material será coletado exclusivamente por conta da pesquisa, vamos analisar apenas o que já foi feito para seu diagnóstico.

Sigilo:

As informações obtidas feitas durante a coleta de dados do prontuário e as informações dos seus exames serão confidenciais e apenas você/seu parente/seu cônjuge e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento do estudo de pesquisa se você quiser. Caso não deseje ou se sinta desconfortável, você não precisa autorizar o acesso às informações no prontuário. Sua recusa em participar no estudo de pesquisas ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com o HGRS ou a Faculdade de Farmácia agora ou no futuro. Você poderá ter uma cópia deste formulário. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo, nem receberá compensação financeira.

Benefícios: Não haverá de imediato benefício para você. Mas, indiretamente os participantes estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das infecções hospitalares e de corrente sanguínea, que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Joice Pedreira, Pesquisadora responsável por este estudo na Faculdade de Farmácia, Av. Barão de Jeremoabo, Ondina Salvador, telefone (071) 3283-6958.

Consentimento:

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhado, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos.

Assinatura do paciente



Data

Hora

Impressão datiloscopia do sujeito da pesquisa (caso necessário)

Assinatura do Investigador

Data:

Hora:

