



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação de alterações ultraestruturais com o uso de antimicrobianos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*.

Alexsandra Maria Lima Scavuzzi

Recife

2015

Alexsandra Maria Lima Scavuzzi

Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação de alterações ultraestruturais com o uso de antimicrobianos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC}.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de doutor em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Co-orientador: Prof.^o Dr.^o Fábio André Brayner

Recife

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S288i Scavuzzi, Alexandra Maria Lima.
Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação de alterações ultraestruturais com o uso de antimicrobianos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *blaKPC* / Alexandra Maria Lima Scavuzzi. – Recife: O autor, 2015.
180 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Inclui referências e apêndices.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Fluoroquinolonas. 3. Resistência. 4. Microscopia eletrônica I. Lopes, Ana Catarina de Souza (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-111)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

ALEXSANDRA MARIA LIMA SCAVUZZI

No dia 27 de fevereiro de 2015, às 08h30, na Sala Prof. Murillo La Greca - no 3º. and. do CCS/UFPE, os Membros Doutores: a Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel (Presidente da Banca – UFPE), a Profa. Dra. Janete Magali de Araújo (UFPE), a Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (UFPE), a Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (UFPE) e a Profa. Dra. Nilma Cintra Leal (CPqAM/FIOCRUZ), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda ALEXSANDRA MARIA LIMA SCAVUZZI sobre a sua Tese intitulada “INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS COM O USO DE ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORES DO GENE bla_{KPC}”, a qual foi orientada pela Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE) e co-orientada pelo Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Prof. Dr. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Profa. Dra. Nilma Cintra Leal

Aprovada
Aprovada
Aprovado
Aprovado
Aprovada

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Profa. Dra. Nilma Cintra Leal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Prof.^o Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Prof.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Prof.^a Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Prof.^a Ana Catarina de Souza Lopes

Prof.^a Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof.^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof. Fábio André Brayner dos Santos

Prof.^a Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof.^a Maria Amélia Vieira Maciel

Prof.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof.^a Marli Tenório Cordeiro

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof.^a Vera Magalhães da Silveira

Prof.^a Vláudia Maria de Assis Costa

DEDICO,

A Deus primeiramente, por sempre me proteger, guiar e iluminar.

Aos meus pais Ednaldo Lima (in memoriam) e Alice Lima, e a minha irmã Enalice Lima por todo o amor, educação e incentivo, alicerces da minha formação.

Ao meu esposo João Scavuzzi e a meu filho João Pedro por todo amor, carinho, paciência, força e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar minha trajetória de vida, me dando sabedoria e me protegendo sempre;

Aos meus pais, minha irmã e toda a minha família, pelo amor, carinho e incentivo;

Ao meu Esposo João Scavuzzi e a meu filho João Pedro pelo companherismo, pela paciência, pelo amor e por toda alegria que trazem pra minha vida;

A Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes pelos ensinamentos, orientação, dedicação e incentivo a minha carreira científica;

Ao Prof^o. Dr^o. Fábio André Brayner, pela ajuda prestada, orientação e ensinamentos;

Ao Prof^o. Dr^o. Luiz Carlos Alves e a Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel, pela ajuda prestada, dedicação, colaboração, orientação e ensinamentos transmitidos;

A Prof^a. Dra. Eulália Ximenes por ter cedido antimicrobianos para as CIMs, sendo de grande importância para os experimentos de microscopia eletrônica.

A Dr^a. Dyana Leal Veras, pela contribuição nos experimentos de microscopia eletrônica e por toda ajuda prestada;

A amiga Msc. Adriane Borges Cabral, por toda ajuda e contribuição nos depósitos das sequências ao GenBank;

Aos amigos de laboratório, Lílian Rodrigues, Waldemir Júnior, Armando Monteiro, Paula Jácome, Rita de Cássia, Ana Paula Sampaio, Grazielle Vaz e Eduarda Manguiera, pela amizade, compartilhamento de conhecimentos e por toda a ajuda prestada;

Aos amigos da pós-graduação, professores e a todos que fazem o Departamento de Medicina Tropical, pela contribuição na minha formação; em especial a Walter Leite, por toda a prestatividade;

A todos os professores e funcionários da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Medicina Tropical – UFPE, pelo apoio e amizade de todos esses anos;

Ao Laboratório Central do CCB/UFPE- LABCEN pelo seqüenciamento, especialmente ao Prof. Dr. Marcos Morais Júnior e a Msc. Heidi Lacerda.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), pela utilização das instalações dessa instituição;

A todos que fazem o LIKA e o Centro de pesquisa Aggeu Magalhaes (CPqAM-Fiocruz), que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho;

A todos os professores, pelos ensinamentos e pela grande contribuição na minha formação;

A FACEPE, pelo suporte financeiro em todos os anos na minha trajetória acadêmica.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes forem necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga das conquistas. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz.”

Bill Gates

RESUMO

Foi investigada a ocorrência de genes de resistência a quinolonas (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*), a presença de mutações em *gyrA*, *gyrB* e *parC*, a expressão de bombas de efluxo (*acrB* e *acrF*) e mutações no gene *ramR*, como também foi avaliado alterações ultraestruturais provocadas pela polimixina B, meropenem e pela associação entre polimixina B e meropenem em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores de *bla*_{KPC-2} provenientes de infecção e colonização, em pacientes de hospitais de Recife-PE, Brasil. Trinta isolados de *K. pneumoniae* foram selecionados para este estudo, destes, seis isolados foram selecionados para seqüenciamento de DNA e dois foram selecionados para detecção de alterações ultraestruturais. A detecção dos genes *qnr*, *acrB* e *acrF* foram realizadas por PCR seguidas por sequenciamento de DNA. As mutações em *ramR* e nas QRDRs de *gyrA*, *gyrB* e *parC* foram detectadas por sequenciamento, a expressão das bombas de efluxo foi determinada por RT-PCR e as alterações ultraestruturais foram detectadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Dos isolados analisados, 73,3% (n=22) apresentaram o gene *qnrB*, sendo detectadas por seqüenciamento as variantes *qnrB1* e *qnrB12*. Esse é o primeiro relato publicado da presença de genes *qnrB1* e *qnrB12* com *bla*_{KPC-2} em *K. pneumoniae*, como também o primeiro relato mundial da presença do gene *qnrB12* em *K. pneumoniae*. Foram observadas mutações em *gyrA* S83 em dois isolados e mutação em *ramR* em um isolado. Todos os isolados apresentaram genes para as bombas de efluxo *acrB* e *acrF*. A RT-PCR realizada mostrou que as bombas estavam sendo expressas. Quando submetidos à concentração clinicamente relevante para meropenem, a análise de microscopia eletrônica mostrou que os isolados apresentaram alterações morfológicas, retração do material citoplasmático, incapacidade de divisão celular, rompimento da parede celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Quando submetidos à concentração

cl clinicamente relevante de polimixina B os isolados apresentaram perda de membrana celular, retração do material citoplasmático, extravasamento do conteúdo citoplasmático e presença de compartimento membranares. Quando submetidos à concentração clinicamente relevante de meropenem associado com polimixina B, os isolados apresentaram uma maior intensidade das alterações ultraestruturais visualizadas. Portanto, foi observada uma maior alteração celular quando os isolados eram submetidos à associação de meropenem e polimixina. Os resultados obtidos são preocupantes porque foram detectados isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2}, *qnrB*, mutação em *gyrA*, expressão de bombas de efluxo *acrB* e *acrF* e mutação em *ramR*, infectando e colonizando pacientes, podendo ser importantes reservatórios para disseminação de diversos mecanismos de resistência no ambiente hospitalar.

Palavras-chaves: *Klebsiella pneumoniae*; *qnrB1*; *qnrB12*; Bomba de efluxo; *gyrA*; *ramR* e alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

The occurrence was investigated of genes resistant to the quinolones (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*), the presence of mutations in *gyrA*, *gyrB* and *parC*, the expression of efflux pumps (*acrB* and *acrF*), mutations in the *ramR* gene. Also assessed were ultrastructural changes provoked by polymyxin B, meropenem and by the association between *polymyxin B and meropenem* in isolated *Klebsiella pneumoniae* isolates carriers of *bla*_{KPC-2} coming from infection and colonization, in patients of hospitals in Recife, Brazil. Thirty isolates of *K. Pneumoniae* were selected for this study. Of these, six isolates were selected for DNA sequencing and two were selected to detect ultrastructural changes. The detection of the *qnr*, *acrB* and *acdF* genes were performed by PCR followed by DNA sequencing. Mutations in *ramR* and in the QRDRs of *gyrA*, *gyrB* and *parC* were detected by sequencing. The expression of efflux pumps was determined by RT-PCR and the ultrastructural changes were detected by transmission electron microscopy and scanning. Of the isolates analyzed, 73.3% (n=22) presented the *qnrB* gene, which was detected by sequencing the *qnrB1* and *qnrB12* variants. This is the first published account of the presence of *qnrB1* and *qnrB12* genes with *bla*_{KPC-2} in *K. Pneumoniae*, as well as being the first report in the world of the presence of the *qnrB12* gene in *K. Pneumoniae*. Mutations were observed in *gyrA* S83 in two isolates and mutation in *ramR* in one isolate. All the isolates presented genes for *acrB* and *acrF* efflux pumps. The RT-PCR performed showed that the pumps were being expressed. When subjected to the clinically relevant concentration for meropenem, the electron microscopy analysis showed that the isolates presented morphological changes, retraction of the cytoplasmic material, inability of cell division, rupture of the cell wall and extravasation of the cytoplasmic content. When submitted to the clinically relevant concentration for polymyxin, the isolates showed loss of cell membrane, retraction of the cytoplasmic material, extravasation of the cytoplasmic content and presence of membrane compartments. When submitted clinically relevant concentration for meropenem associated with polymyxin B, the isolates presented a higher intensity of the ultrastructural changes visualized. Therefore, a greater cellular change was observed when the isolates were submitted to the association of meropenem and polymyxin B. The results obtained are disturbing because what were detected were *K. Pneumoniae* isolates carriers of the *bla*_{KPC-2} gene, *qnrB*, mutation in *gyrA*, expression of

acrB and *acrF* efflux pumps and mutation in *ramR*, infecting and colonizing patients and may be important reservoirs for disseminating several resistance mechanisms in hospitals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Isolamento de <i>K. pneumoniae</i> em Agar MacConkey.....	27
Figura 2. Estrutura química dos β -lactâmicos.....	30
Figura 3. Estrutura química representativa das quinolonas.....	34
Figura 4. (a) Eletromicrografia demonstrando estrutura conservada de bactérias antes do uso de um β -lactâmico ; (b) Eletromicrografia demonstrando alterações ultraestruturais provocadas após o uso de um β -lactâmico.	40
Figura 5. Sítio de ação e mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	42
Figura 6. Desenho esquemático do sistema da bomba de efluxo AcrAB-Tolc.....	51
Figura 7. Diagrama esquemático da região compreendendo <i>ramR</i> a <i>ramA</i> de <i>K. pneumoniae</i> com a localização das mutações identificadas.....	54
Figura 8. (A-G): Eletromicrografias do isolado K3-A2 de <i>K. pneumoniae</i>	89
Figura 9. (A-I): Eletromicrografias do isolado K12-A2 de <i>K. pneumoniae</i>	91
Figura 10. (A-D): Eletromicrografias do isolado K3-A2 de <i>K. pneumoniae</i>	93
Figura 11. (A-D) Eletromicrografias do isolado K12-A2 de <i>K. pneumoniae</i>	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais testes bioquímicos para identificação de enterobactérias.	28
Tabela 2: Primers utilizados na PCR e seqüenciamento de DNA para detecção dos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>acrB</i> , <i>acrF</i> , <i>ramR</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	69
Tabela 3. Origem, presença dos genes <i>qnrB</i> , <i>acrB</i> , <i>acrF</i> , perfil da ERIC-PCR e perfil de resistência dos isolados hospitalares de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores do gene <i>bla</i> _{KPC} do Recife-Brasil	86
Tabela 4. Características dos isolados selecionados.....	87
Tabela 5. Origem, presença e expressão dos genes <i>acrB</i> , <i>acrF</i> , mutação em <i>ramR</i> , perfil da ERIC-PCR e perfil de resistência pelo método de difusão em disco dos isolados hospitalares selecionados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores do gene <i>bla</i> _{KPC} do Recife-Brasil.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP binding cassette
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
Ala	Alanina
ATM	Aztreonam
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BHI	Caldo Infuso de Cérebro e Coração
Ca ⁺⁺	Cálcio
CAMHB	Caldo Müeller-Hinton Cation ajustado
CAZ	Ceftazidima
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Clofanfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ESBL	Extended-Spectrum β -lactamase
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ERIC-PCR	PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias
ERT	Ertapenem
FDA	Food and Drug Administration

genes <i>bla</i>	Genes de β -lactamases
GEN	Gentamicina
Gli	Glicina
Glu	Glutamina
GyrA	DNA girase A
h	Horas
I	Intermediário
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IMP	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LABCEN	Laboratório Central
LEV	Levofloxacina
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídeo
LTACH	Cuidados agudos de curta duração
Lys	Lisina
mA	Miliampere
MBLs	Metalo- β -lactamases
MDR	Multi-droga resistente
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg ⁺⁺	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MFS	Major facilitator superfamily
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
MPM	Meropenem
NAL	Ácido Nalidíxico
ng/ μ L	Nanograma por microlitros
OXA	Oxacilinase
PBPs	Proteínas de ligação à Penicilina

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIT	Piperacilina/Tazobactam
PMQR	Plasmídeos de resistência a quinolonas
POL	Polimixina B
q.s.p	Quantidade suficiente para
RND	Resistance nodulation division
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
Ng	Nanograma
NOR	Norfloxacino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMR	staphylococcal multiresistance
SIM	H ₂ S/indol/motilidade
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SUT	Trimetropim/sulfametoxazol
SHV	Sulfidril variable
STE	Tampão SDS-Tris-EDTA
TBE	Tris-borato, ácido bórico, EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Referência à Temoniera
Temp.	Temperatura
TET	Tetraciclina
TSI	Tríplice sugar/iron
U	Unidade
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidades de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
V	Volts
Val	Valina
VIM	Verona integron-encoded metalo- β -lactamase
Zn	Zinco

°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
2.2. Antimicrobianos	28
2.2.1 β -lactâmicos.....	29
2.2.2 Carbapenêmicos	31
2.2.3 Quinolonas	32
2.2.4 Polimixinas.....	37
2.3. Alterações ultraestruturais provocadas por antimicrobianos.....	39
2.4. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	41
2.4.1 β -lactamases	43
2.4.2 Carbapenemases	45
2.5. Mecanismos de resistência as quinolonas	47
2.5.1 Mutações em DNA girase e topoisomerase IV	48
2.5.2 Bombas de efluxo.....	49
2.5.3 Reguladores da bomba de efluxo	53
2.5.4 Genes <i>qnr</i>	55
3. OBJETIVOS	58
3.1. OBJETIVO GERAL	59
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	60
4.1. Isolados bacterianos	61
4.2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	61
4.3. Extração de DNA total	62
4.4. Condições da PCR para amplificação da região QRDR dos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> e <i>parC</i>	62
4.5. Condições da PCR para amplificação dos genes <i>acrB</i> e <i>acrF</i>	63
4.6. Condições da PCR para amplificação do gene <i>ramR</i>	63
4.7. Condições da PCR para amplificação dos genes <i>qnr</i>	63

4.8. Eletroforese em gel de agarose.....	64
4.9. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciamento de DNA	64
4.10. Extração de RNA total	65
4.11. Condições da RT-PCR para os gene <i>acrB</i> e <i>acrF</i>	65
4.12. Determinação das Concentrações inibitórias mínimas (CIMs).....	66
4.13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	67
4.14. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67
4.15. Considerações éticas.....	68
5. RESULTADOS.....	70
5.1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	71
5.2. Análise de mutação nas QRDRs dos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> e <i>parC</i>	71
5.3. Presença e expressão de Bombas de efluxo <i>acrAB</i> e <i>acrEF</i> e análise de mutação do gene regulador <i>ramR</i>	72
5.4. Presença e variantes de genes <i>qnr</i>	72
5.5. Análises ultraestruturais e morfológicas.....	73
6. DISCUSSÃO.....	76
6.1. Ocorrência de genes <i>qnrB1</i> , <i>qnrB12</i> , mutação em <i>gyrA</i> e <i>ramR</i> , e expressão de bombas de efluxo em isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores de <i>bla_{KPC-2}</i>	77
6.2. Alterações ultraestruturais provocadas por polimixina B e meropenem em isolados multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores do gene <i>bla_{KPC-2}</i> e bombas de efluxo.....	81
7.CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE.....	120

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae são bacilos gram-negativos associados a uma variedade de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), que afetam as vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas e a via sistêmica, causando bacteremia, pneumonia, abscesso hepático e infecções do trato urinário (Siu *et al.*, 2012 e Chiu *et al.*, 2013). Essa espécie bacteriana vem se destacando pelo desenvolvimento de diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Pacientes com infecção ou pacientes crônicos colonizados necessitam de cuidados médicos em longo prazo, podendo desempenhar um importante papel na disseminação desses patógenos extremamente resistentes (Lin *et al.*, 2013).

Os carbapenêmicos tornaram-se o tratamento de escolha para infecções graves causadas por patógenos hospitalares gram-negativos, incluindo a família Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). O aumento do uso dos carbapenêmicos foi previsivelmente seguido pelo aparecimento da resistência a estes antimicrobianos (Cabral *et al.*, 2012 e Jain *et al.*, 2013). A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) confere resistência a todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (Lolans *et al.*, 2010). Neste caso, o uso de fluoroquinolonas tem sido considerado uma opção terapêutica adequada, no entanto, vários estudos indicam um aumento percentual de cepas de enterobactérias resistentes a esta classe de antimicrobianos (Yang *et al.*, 2010, Padilla *et al.*, 2010 e Paiva *et al.*, 2012).

A alta prevalência de pacientes colonizados em UTI e mortalidades significativas associadas com a infecção de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC} demonstram a importância da identificação, isolamento e tratamento precoce destes pacientes (Lin *et al.*, 2013; Papadimitriou-Olivgeris *et al.*, 2013).

As fluoroquinolonas tornaram-se os antimicrobianos mais prescritos em todo o mundo devido ao seu amplo espectro de ação (Aldred *et al.*, 2014), sendo as enzimas bacterianas, DNA girase e topoisomerase IV seu alvo de ação (Fábrega *et al.*, 2009). Diferentes mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento de resistência às fluoroquinolonas: mutações nas subunidades da DNA girase (genes *gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (genes *parC* e *parE*), presença do gene *qnr* em elementos genéticos móveis, hiperexpressão de bomba de efluxo e perda ou redução de porinas (Guan *et al.*, 2013).

As mutações pontuais cromossômicas nos genes que codificam a DNA girase e topoisomerase IV são clinicamente relevantes quando combinados com bombas de efluxo, o que contribuem para altos níveis de resistência a fluoroquinolona em *K. pneumoniae*

(Takatsuka *et al* 2010). O sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC é um dos mais envolvidos nessa resistência (Padilla *et al.*, 2010). AcrAB-TolC e AcrEF-TolC estão presente na maioria das enterobactérias e o aumento da expressão dessas bombas resulta em redução das concentrações intracelulares de vários antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas, β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol e tigeciclina (Zheng *et al.*, 2009 e Bialek-Davenet *et al.*, 2011),

A expressão do operon *acrAB* é regulada pelo seu repressor local *acrR* e também é influenciada por vários ativadores globais de transcrição. O gene *ramR* é um repressor transcricional do gene *ramA*, sendo esse último um regulador positivo do sistema de efluxo AcrAB, ou seja, controla aumentando a expressão de *acrAB* (Bialek-Davenet *et al* 2011). O gene *ramR* é um fator importante na redução da multirresistência, pois reprime *ramA* diminuindo a expressão dos genes do sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC. Portanto, mutações em *ramR* pode resultar em superexpressão de *acrAB* (Bialek-Davenet *et al* 2011). No entanto, estes reguladores têm sido estudados principalmente em *Escherichia coli* e *Salmonella entérica* e pouco é conhecido sobre o seu papel em *K. pneumoniae* (Bialek-Davenet *et al* 2013).

Além de mutações cromossômicas em DNA girase e Topoisomerase IV, supressão de bombas de efluxo e ação de seus reguladores, os genes *qnr* presentes em plasmídeos mediando resistência a quinolonas (PMQR), podem também reduzir os níveis de sensibilidade a esses antimicrobianos, (Paiva *et al* 2012). A presença de genes plasmidiais *qnr*, transferíveis horizontalmente, pode ser responsável pela relativa facilidade com que a resistência a fluoroquinolonas desenvolve-se (Kim *et al.*, 2009). Atualmente, pelo menos, cinco grupos principais de determinantes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*) foram relatados em enterobacteriaceae e *qnrCV* em *Vibrio cholerae* (Yang *et al.*, 2010, Fonseca *et al.*, 2012, Ferrari *et al.*, 2013, Ferjani *et al.*, 2014).

Alguns organismos produtores de KPC usualmente apresentam também resistência associada às fluoroquinolonas, o que pode ser justificado pela presença do gene *qnr* acompanhados pelo gene *bla*_{KPC} no mesmo plasmídeo (Mendes *et al.*, 2008 Endimiani *et al.*, 2008, Chmelnitsky *et al.*, 2008). Essa ligação pode ser uma das razões para a alta frequência de resistência à quinolonas observada em bactérias produtoras de KPC.

As polimixinas são reservadas para a terapia remanescente de infecções causadas por bactérias produtoras de KPC, pois a maioria destes organismos manteve susceptibilidade a esses antimicrobianos (Dubrovskaya 2013). A modalidade de tratamento

mais usual para organismos produtores de KPC, inclusive no Brasil, é o uso da terapia combinada, por exemplo, a polimixina B ou o polimixina E, em associação com carbapenêmico, aminoglicosídeos ou tigeciclina (Nota técnica da Anvisa nº01/2013). Essas associações foram recentemente associadas com melhora da sobrevida de pacientes com bacteremia (Muoz-price *et al.*, 2013 e Lee *et al.*, 2013). Na era da crescente resistência associada a uma diminuição do arsenal de antibióticos, a atenção deve ser levada ao papel da terapia combinada (Lee *et al.*, 2013). Concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos pode afetar a produção dos componentes da parede celular bacteriana, resultando em sua redução significativa. Estudos realizados com *K. pneumoniae* multi-resistentes e produtoras de β -lactamases, determinaram que bactérias tratadas com CIM de β -lactâmicos respondem com uma significativa alteração da morfologia celular e grandes distúrbios metabólicos (Veras *et al.*, 2014).

Até o presente momento não existem estudos brasileiros publicados que avaliem a presença dos genes *qnr*, como também a presença de mutações em *gyrA*, *gyrB* e *parC*, nos isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*, adicionalmente, não existe no Brasil, relatos na literatura pesquisada do sistema de efluxo *acrAB-TolC*, *acrEF-TolC* e seus reguladores em *K. pneumoniae*. Considerando que o Brasil tem um das mais altas percentagens de resistência às quinolonas dentre os países da América Latina, é relevante detectar quais mecanismos genéticos de resistência a quinolonas estão presentes em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecção e colonização de pacientes de Recife-PE, como também são necessários estudos que possibilitem avaliar e comparar alterações ultraestruturais provocados por polimixina B, meropenem e combinações de polimixina B com meropenem em isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é representado por bacilos gram-negativos, fermentadores de carboidratos, que fazem parte da microbiota entérica comensal, como também podem ser encontrados na água, nos vegetais e no solo. Esses bacilos estão associados a uma variedade de infecções, principalmente hospitalares, que afetam as vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas e, algumas vezes, causam septicemia e meningite (Pan *et al.*, 2008 e Padilla *et al.*, 2010). A fonte de infecção imediata na maioria dos casos é a microbiota endógena do paciente. As infecções causadas por *Klebsiella* acometem principalmente portadores de diabetes mellitus, neonatos e imunocomprometidos (Fang *et al.*, 2004).

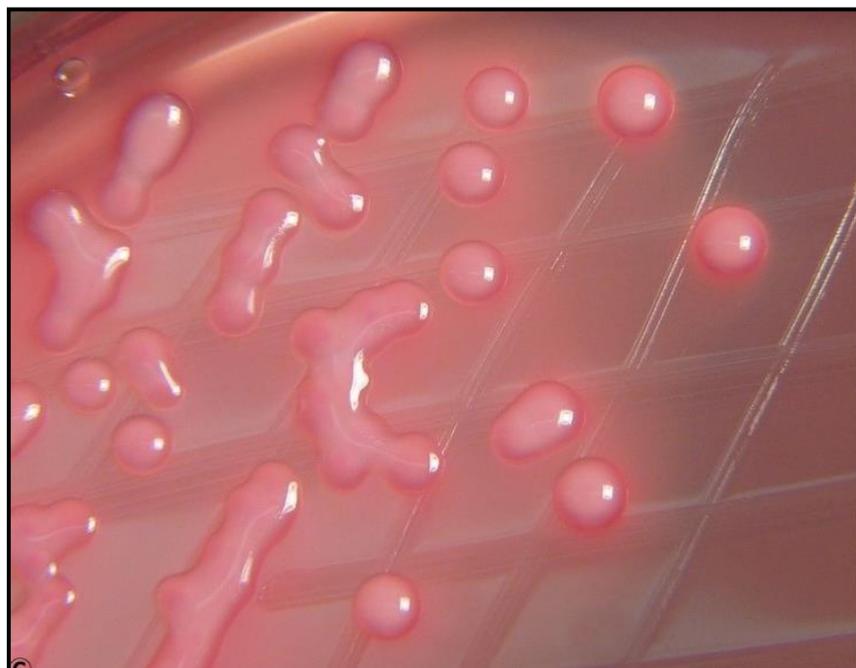
O gênero *Klebsiella* foi descrito pela primeira vez em 1885 por Trevisan e foi designado em homenagem ao famoso microbiologista alemão Edwin Kleb, sendo dois anos mais tarde (1887) descrita a espécie *K. pneumoniae* (Koneman *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2014). Taxonomicamente, as espécies do gênero *Klebsiella* são classificadas em *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* (Orskov&Orskov, 1984). Usualmente refere-se à espécie *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* como *K. pneumoniae*, e às outras duas subespécies como *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* (Brisse e Verhoerf, 2001). *Klebsiella ozaenae* é isolada do nariz em casos de ozena (atrofia fétida das mucosas) e *K. rhinoscleromatis* é isolada de lesões granulomatosas destrutivas do rinoscleroma (Brisse e Verhoerf, 2001 e Alterthum, 2008).

As espécies *K. terrigena*, *K. planticola* e *K. ornithinolytica* foram reclassificados taxonomicamente, em um novo gênero chamado *Raoutella* (Drancourt *et al.*, 2001). A estrutura filogenética do gênero *Klebsiella* foi reanalisada (Brisse; Verhoef, 2001; Boye; Hansen, 2003; Rosenblueth *et al.*, 2004; Drancourt *et al.*, 2005). Esses estudos mostram a complexidade taxonômica deste organismo. Duas novas espécies foram descritas: (1) *Klebsiella variicola* foi considerada uma nova espécie baseando-se principalmente na análise das seqüências dos genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB*, *phoE* e *nifH*, (Rosenblueth *et al.*, 2004) e (2) *Klebsiella singaporensis*, baseado nas sequências dos genes de RNAr 16S e do gene *rpoB*. Tanto *K. pneumoniae*, quanto *K. oxytoca* são as principais espécies do gênero responsáveis por infecções hospitalares, sendo a *K. pneumoniae* a espécie clinicamente mais importante, devido à associação com altas taxas de mortalidade e por ser

frequentemente envolvida em surtos nosocomiais (Haryani *et al.*, 2007 e Oliveira *et al.*, 2010).

As espécies de *Klebsiella* são imóveis, não esporuladas, e geralmente exibem colônias mucóides e de consistência viscosa quando encontradas em placas com meios de isolamento (Figura 1). Este microrganismo é envolvido por cápsulas polissacarídicas que são consideradas o maior fator de virulência em *K. pneumoniae*, nas quais estão presentes diferentes antígenos que permitem a diferenciação da *Klebsiella* em diversos sorotipos (Lawlor *et al.*, 2006 e Tu *et al.*, 2009). Muitas cepas hidrolisam uréia lentamente e produzem uma cor rosa-pálida na superfície inclinada do ágar uréia de Christensen. A produção de indol a partir do triptofano pode ser utilizada para separar as duas espécies principais: *K. pneumoniae* é indol-negativa e *K. oxytoca* é indol-positiva (Tabela 1). Algumas espécies do gênero *Enterobacter* podem ser muito similares a espécies do gênero *Klebsiella* em muitas provas bioquímicas, podendo ser diferenciadas basicamente pela motilidade e ornitina descarboxilase, nas quais espécies de *Enterobacter* são positivas e espécies de *Klebsiella* são negativas (Koneman *et al.*, 2008).

Figura 1. Isolamento de *Klebsiella pneumoniae* em ágar MacConkey.



(Fonte: <http://www.bacteriainphotos.com>)

Tabela 1: Principais testes bioquímicos para identificação de enterobactérias.

Testes bioquímicos	<i>E. coli</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
Lactose	+	+	+	+	+	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	-	+
Sulfeto de hidrogênio	-	-	-	-	-	-	+
Urease	-	-/+	+	+	+/-	-	-
Motilidade	+/-	-	-	-	+	-	+
Indol	+	-	-	+	-	+/-	-
Lisina	+	+	+	+	+/-	-	+
Citrato de Simmons	-	+	+	+	+	-	+

Fonte: Adaptado de Koneman *et al.* (2008)

De acordo com o “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” (Biedenbach *et al.*, 2004) no Brasil dentre as bactérias gram-negativas mais envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) de acordo com o mesmo programa, destacam-se: *Pseudomonas aeruginosa* (30.3%), *Escherichia coli* (18.6%), *Klebsiella pneumoniae* (16.9%), *Acinetobacter baumannii* (8.8%) e *Enterobacter cloacae* (7.1%). Apesar dos avanços da terapia antimicrobiana, a mortalidade e morbidade associadas a casos de IRAS continuam significantes mundialmente.

De acordo com Lin *et al.*, (2013) a distribuição de Enterobacteriaceae produtoras de KPC foi semelhante entre os pacientes colonizados que permaneceram longo tempo em cuidados hospitalares agudos como em pacientes em cuidados agudos de curta duração na UTI dos hospitais- LTACHs. Entre 149 pacientes colonizados com KPC 87% (n = 129) foram espécies de *K. pneumoniae* as espécies restantes produtoras de KPC incluíram *Enterobacter aerogenes* (6%), *E. coli* (4%), *E. cloacae* (0,7%), e co-colonização por *K. pneumoniae* mais *E. coli* ou *E. cloacae* (2,7%).

2.2 Antimicrobianos

Em 1928, Alexander Fleming observou que o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* foi inibido em uma área que circundava a colônia de um fungo que havia contaminado a placa de Petri. O fungo foi identificado como *Penicillium notatum*, e

seu composto ativo, isolado logo em seguida, foi chamado de penicilina. Quando as defesas normais do organismo não são capazes de impedir ou derrotar uma doença, ela frequentemente pode ser tratada pelo uso das drogas antimicrobianas, que são drogas que agem matando ou interferindo no crescimento dos micro-organismos e que precisam agir dentro do hospedeiro, sem causar dano a ele (Tortora *et al.*, 2012).

Os antibióticos estão entre as mais importantes descobertas da medicina moderna, ainda no início do século XX pouco podia ser feito para tratar muitas doenças infecciosas letais. A introdução de agentes antimicrobianos, como penicilinas e sulfanilamidas, para atuar no tratamento de um apêndice supurado ou uma sepse resultou em curas que pareciam impossíveis (Tortora *et al.*, 2012).

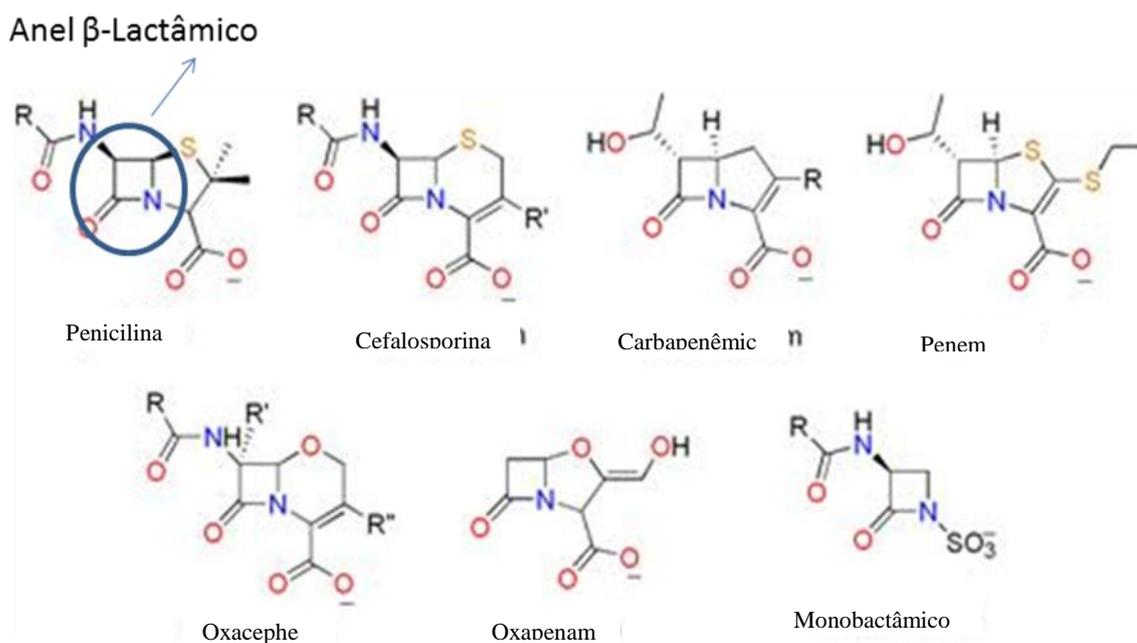
As drogas antimicrobianas podem funcionar de cinco modos: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de ácidos nucleicos, dano à membrana plasmática ou inibição da síntese de metabólitos essenciais. Penicilina e alguns outros antibióticos inibem a síntese de peptidoglicanos intactos ocasionando graves alterações ultraestruturais, a parede celular fica enfraquecida e a célula sofre lise (Tortora *et al.*, 2012)..

2.2.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são os antimicrobianos mais prescritos mundialmente, devido a sua boa atividade, baixa toxicidade, baixo custo e grande variedade dos compostos disponíveis (Denisuik *et al.*, 2013). O grande número de antimicrobianos β -lactâmicos naturais, semi-sintéticos e sintéticos pode ser subdividido em seis diferentes subtipos estruturais: (1) penams que incluem os derivados de penicilinas (por exemplo, ampicilina e benzilpenicilina), (2) cephems que incluem as cefalosporinas clássica, cefalosporinas de 2^a geração (cefuroxima e cefotiam, por exemplo) e também representantes das cefalosporinas de 3^a geração (por exemplo, ceftazidima, cefotaxima, oxacephem como o flomoxef), (3) cefamicinas como 7-metoxi-cefalosporinas (por exemplo, cefoxitina), (4) monobactâmicos como moléculas monocíclica (por exemplo, aztreonam), (5) penems com uma ligação dupla 2,3 no anel thiazoline (Faropenem, por exemplo) e (6) carbapenêmicos (imipenem, por exemplo) diferindo da estrutura dos penems pela posse de um átomo de carbono na posição 1 (Pfeifer; Cullik; Witte, 2010) (Figura 2).

As penicilinas constituem o primeiro grupo de antimicrobianos indicado para uso na terapia clínica, possibilitando um tratamento seguro e eficaz para infecções de origem bacteriana (Tang *et al.*, 2014). Todos estes antimicrobianos são portadores de um anel β -lactâmico, formado de três átomos de carbono e um de nitrogênio, interferindo na síntese da parede celular bacteriana, após a fixação da droga aos sítios de ligação na bactéria, denominados proteínas de ligação da penicilina (PBPs), os β -lactâmicos inibem a enzima de transpeptidação interferindo na síntese e ancoragem da parede celular (Petrella *et al.*, 2008). Entre os agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana, os antibióticos beta-lactâmicos surgiram como agentes de amplo espectro para inibir bactérias patogênicas (Bush, 2012).

Figura 2: Estrutura química dos β -lactâmicos.



Fonte: adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>

Nota: Em destaque o anel β -lactâmicos, estrutura comum a todos os antimicrobianos desta classe.

Os danos causados pelos β -lactâmicos às bactérias especialmente no estado de crescimento vêm da sua capacidade de se ligar as transpeptidases e inativá-las. Este processo de inativação interrompe a constituição fisiológica normal do peptidoglicano da parede celular produzindo uma morfologia indefinida o que induz a lise e morte celular (Rang *et al.*, 2006). Uma vez que os β -lactâmicos agem sobre o processo de síntese do peptidoglicano, somente células que estejam crescendo ativamente são afetadas por esses antibióticos, e devido ao fato de que as células humanas não possuem parede celular constituída por peptidoglicano, os β -lactâmicos apresentam pouca toxicidade para as células do hospedeiro (Tortora *et al.*, 2012).

Os β -lactâmicos exercem actividade bactericida por ligação covalente e por inativação das PBPs, resultando em interferência com a síntese e remodelação do peptidoglicano bacteriano (Tang *et al.*, 2014).

As PBPs variam em suas afinidades pelos diferentes β -lactâmicos, embora as ligações se tornem covalentes. Algumas PBPs de bactérias gram-negativas são responsáveis pela síntese do peptidoglicano, outras são necessárias para a manutenção da forma de bastonetes da bactéria, ou para a formação de septos durante a divisão bacteriana (Brunton; Chabner; Knolman, 2012). Cada PBP tem um papel específico na proliferação e na manutenção da morfologia bacteriana, onde o bloqueio da PBP-1 leva a rápida lise bacteriana, da PBP-2 a formação de células esféricas e da PBP-3 a formação de longos filamentos, cusados pela incapacidade de formação de septos de divisão após a duplicação da massa celular bacteriana (Buijs *et al.*, 2008).

Os β -lactâmicos pertencem a uma classe extremamente importante de antimicrobianos, por serem amplamente utilizados para tratamento de infecções graves adquiridas em hospitais e na comunidade (Denisuik *et al.*, 2013). As cefalosporinas e os carbapenêmicos estão inclusos nos regimes de tratamento de escolha para muitas doenças infecciosas, incluindo as provocadas por *K. pneumoniae* (Bush; Jacoby, 2010).

2.2.2 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem e doripenem) difundem-se facilmente dentro da bactéria e tem um vasto espectro de atividade contra muitos gram-negativos, gram-positivos e bactérias anaeróbicas (Walther-Rasmussen e Hoiby, 2007). Além disso, apresentam os componentes necessários para a clínica médica: amplo espectro

de atividade, rápida ação bactericida, propriedades que limitam a promoção da resistência e boa tolerabilidade (Rodloff *et al.*, 2006). Os carbapenêmicos são antimicrobianos que contêm um anél pirrolidínico compartilhando uma molécula de nitrogênio, sendo considerado β -lactâmicos de maior espectro de ação (Maryn; Gudiol, 2003).

Semelhante à penicilina e as cefalosporinas, os carbapenêmicos são agentes bactericidas que se ligam as PBPs inibindo à síntese da parede celular bacteriana. Eles mostram menos resistência do que outros antibióticos β -lactâmicos por causa da sua estabilidade à hidrólise por β -lactamases incluindo as ESBL (Basseti *et al.*, 2013). A eficiência dos carbapenêmicos deve-se a elevada afinidade pelas PBPs-2, estabilidade frente a micro-organismos produtores de AmpC cromossomal e/ou β -lactamases plasmidiais (Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007; Peirano *et al.*, 2009).

Os carbapenêmicos tiveram seu uso aumentado nas últimas duas décadas e estão sendo amplamente usados no tratamento de patógenos nosocomiais gram-negativos multirresistentes (Papp-walace *et al.*, 2011), são considerados como as drogas de escolha para graves infecções com enterobactérias produtoras de ESBLs (Wirth *et al.*, 2009). Como essas drogas têm amplo espectro de atividade, elas são frequentemente utilizadas para terapia empírica de infecções potencialmente letais, tais como sepse, carbapenêmicos também são utilizados para infecções com bacilos gram-negativos multirresistente, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (Patel; Rasheed; Kitchel, 2009; Lee; Doi, 2014).

Isolados produtores de carbapenemases tornaram-se um problema significativo em termos de saúde pública e evolução clínica, devido frequentemente serem capazes de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, azetreonam como também os carbapenêmicos, tornando o tratamento clínico um desafio para os médicos (Tumbarello *et al.*, 2012).

2.2.3 Quinolonas

Os antimicrobianos sintéticos da classe das quinolonas apresentam potente atividade contra grande número de bactérias gram-positivas e gram-negativas e ainda apresentam conveniência quanto ao seu uso e à sua biodisponibilidade (Arsene *et al.*, 2007).

Ácido nalidíxico, que pode ser considerado como a primeira geração de quinolonas, foi introduzido para utilização clínica em 1962 (Leshner *et al.*, 1962) e foi administrada

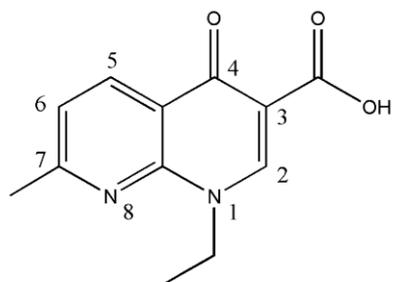
inicialmente para tratar infecções do trato urinário causadas por gram-negativos em seres humanos e animais (Suh e Lorber, 1995). O ácido nalidíxico é um subproduto resultante da síntese e purificação da cloroquina (composto antimalárico), a primeira geração das quinolonas teve seu uso limitado pois mostrou estreito espectro de atividade (Guan *et al.*, 2013).

A evolução das quinolonas para moléculas mais potentes foi baseado em alterações nas posições 1, 6, 7 e 8 da estrutura química do ácido nalidíxico. As estruturas moleculares das quinolonas foram modificadas para melhorar as suas propriedades antimicrobianas e perfis farmacocinéticos (Figura 3) (Fábrega *et al.*, 2009).

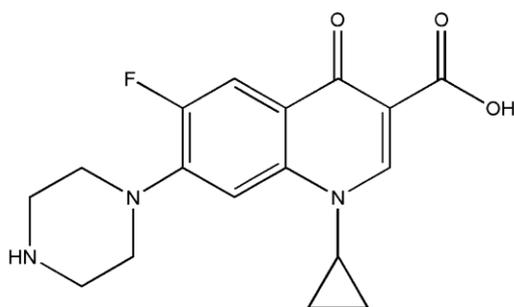
Com base principalmente nos espectros antibacterianos, medicamentos do grupo das quinolonas foram classificados em gerações. A segunda geração de quinolonas começou com fluoroquinolonas obtidas pela halogenação da molécula de quinolonas na posição C6 (Guan *et al.*, 2013). Ciprofloxacina, uma das fluoroquinolonas mais utilizados, foi introduzida no mercado clínica em 1987, o antimicrobiano ciprofloxacina é considerado, dentre a classe das quinolonas, o agente antimicrobiano mais utilizado em todo mundo (Chenia *et al.*, 2006).

Fluoroquinolonas são drogas ativas contra uma vasta gama de bactérias gram-negativas e gram-positivas e demonstram uma melhor absorção oral e distribuição sistêmica. Assim, as aplicações terapêuticas destes compostos foram estendidos para o tratamento de infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, infecções oftálmicas, doenças sexualmente transmissíveis e infecções do trato urinário (Moellering, 2005; Fábrega *et al.*, 2009). Como resultado de seu amplo espectro de ação, as fluoroquinolonas têm sido extensivamente prescritas como terapia empírica em muitos casos de infecções e na comunidade devido à alta frequência de patógenos com elevada percentagem de resistência a várias classes de antimicrobianos e à severidade da doença (Chenia *et al.*, 2006). No entanto, esta segunda geração de quinolonas tem uma atividade clinicamente limitada contra um número relevante de bactérias gram-positivas e anaeróbios (Zhanel *et al.*, 2002).

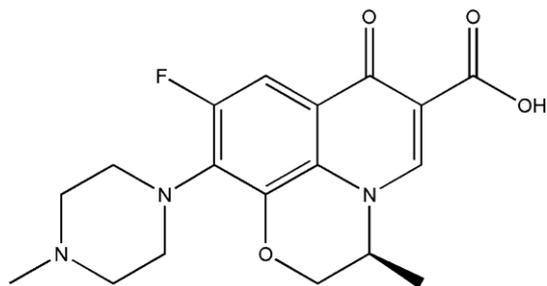
Figura 3: Estrutura química representativa das quinolonas.



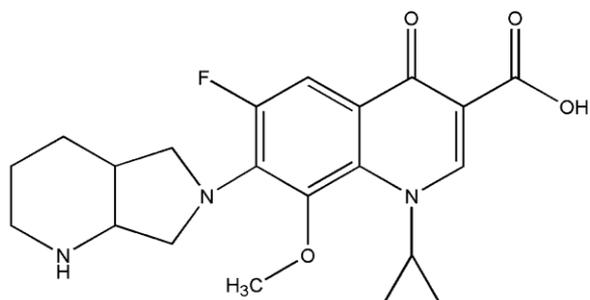
Ácido Nalidixico



Ciprofloxacin



Levofloxacin



Moxifloxacin

Desde 1987, variações estruturais de fluoroquinolonas têm proporcionado adequados inúmeros novos agentes para o tratamento de uma variedade de infecções bacterianas. Na terceira geração de quinolonas, fluoroquinolonas mais potentes foram desenvolvidos, tais como a levofloxacin, gatifloxacin e moxifloxacin (Barrett, 2000), que exibem melhoria da atividade bactericida contra bactérias gram-positivas. A quarta geração de fármacos de quinolonas, tais como a gemifloxacin, mostra uma boa actividade contra cocos gram-positivos e uma atividade significativa contra anaeróbios (Kim *et al.*, 2001).

As quinolonas agem inibindo a ação de topoisomerases tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV (Drlica *et al.*, 2009). O primeiro alvo de fluoroquinolonas em bactérias gram-negativas é a DNA girase, que apresenta função na replicação e transcrição do DNA, mais precisamente catalisa a superhelicoidização negativa do DNA, o DNA é classicamente retratado como um par de filamentos helicoidais fechados (Minarini, 2008). Quando a hélice se encontra intacta, as informações dos códigos não são acessíveis para a transcrição e o DNA não pode se replicar para a divisão celular. Assim, a separação e reunificação dos filamentos são processos essenciais para o crescimento e a multiplicação celular (Morrow *et al.*, 2010).

Os sítios de ação das quinolonas são basicamente diferentes em bactérias gram-negativas e gram-positivas, nas primeiras, preferencialmente, é a DNA girase (topoisomerase do tipo II), enquanto que em gram-positivas, o alvo principal é a enzima topoisomerase IV, que atuam convertendo a dupla hélice do DNA em uma forma superhelicoidal negativa para preparar a separação dos filamentos (Van Hess *et al.*, 2011).

Estas enzimas tetramérica são compostas por duas subunidades A e duas subunidades B, as quais são mediadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV é outra enzima responsável por esse processo que provoca a separação (decatenação) dos círculos ligados resultantes da duplicação do DNA bacteriano, apresenta uma estrutura com duas subunidades A e duas subunidades B mediadas, respectivamente, por *parC* e *parE*. As quinolonas capturam uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano, criando um complexo medicamento-enzima-DNA com rupturas em um único filamento que impede a passagem contínua do DNA pelo mecanismo de replicação. Aparecem rupturas nos dois filamentos e, conseqüentemente, morte da célula bacteriana (Minarini 2008; Drlica *et al.*, 2009).

O amplo uso de fluoroquinolonas, bem como seu uso indiscriminado na terapêutica, tem sido considerado fatores responsáveis pelo rápido desenvolvimento de resistência bacteriana a esta classe de antimicrobianos. Em países com intenso uso terapêutico de quinolonas, a resistência às fluoroquinolonas tem se tornado problema crescente na medicina clínica, limitando os agentes disponíveis para o tratamento de vários tipos de infecções (Chenia *et al.*, 2006; Biedenbach *et al.*, 2006).

Livermore e colaboradores identificaram um aumento da prevalência de amostras de *K. pneumoniae* (de 3,5 a 7,1%) e *E. coli* (de 0,8 a 3,7%) resistentes às fluoroquinolonas isoladas de hemocultura, entre 1990 e 1999, em países europeus (Livermore *et al.*, 2002). Na China, por exemplo, foi encontrada uma percentagem bem mais elevada, sendo mais de 50% das amostras clínicas de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina (Wang *et al.*, 2003).

De acordo com um estudo realizado pelo “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”, o qual analisou dados referentes ao perfil de sensibilidade de vários patógenos isolados em países da América Latina, entre os anos de 1997 e 2001, o Brasil apresentou 10 a 20% de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes à ciprofloxacina, dependendo da quinolona testada (Sader *et al.*, 2004). Um estudo publicado em 2006 por este mesmo programa de vigilância revelou que a percentagem de resistência ao ácido nalidíxico foi mais alta na América Latina (15%) comparada à América do Norte (6,3%), sendo considerada mais alta no México (50%) e no Brasil (33,6%) (Biedenbach *et al.*, 2006).

O estudo brasileiro de Koch *et al.* (2008) demonstrou as prevalências da resistência antimicrobiana de três bactérias uropatogênicas, a *Klebsiella* apresentou a maior prevalência da resistência bacteriana aos antimicrobianos, com uma média de 35% quando comparada ao *Proteus mirabilis* e a *E. coli*, o ácido nalidíxico apresentou 27,6% de prevalência da resistência bacteriana. Na evolução temporal da resistência bacteriana aos antibióticos testados durante o período estudado (2000-2004) o ácido nalidíxico foi o único antibiótico que apresentou aumento significativo de resistência, com um crescimento anual de 5,9%. Ciprofloxacina mostrou a tendência de aumento na taxa de resistência bacteriana, com um crescimento anual de 3,3%. Observou-se que os isolados dos pacientes com mais de 65 anos apresentaram maior taxa de resistência a três antibióticos: ácido nalidíxico, nitrofurantoína e ciprofloxacina.

O estudo de Santana *et al.* (2012) demonstrou que o ácido nalidíxico está entre as frequências mais elevadas de resistência nas cepas de pacientes hospitalizados, na análise

das amostras destes pacientes, a resistência a antimicrobianos mostrou-se elevada, cuja resistência a ciprofloxacino e ácido nalidíxico variaram entre 15% e 30% para a maioria dos isolados.

2.2.4 Polimixinas

As polimixinas, foram descobertas em 1940, são um grupo de antimicrobianos peptídeos policatiônicos, produzidos pelos sistemas peptídeos sintetase não-ribossomais de bactérias tais como *Paenibacillus polymyxa*, que apresentam potente eficácia contra a maior parte das bactérias gram-negativas, com algumas exceções, por exemplo, *Serratia marcescens*, *Proteus spp.* e *Providencia spp.* (Lee; Doi 2014).

Entre todos os cinco compostos químicos (A-E) de polimixinas apenas são clinicamente utilizados as polimixina B e E (colistina), com a diferença na estrutura de um aminoácido (Liu *et al.*, 2014). As polimixinas têm como alvo as membranas celulares e estão sendo usadas com mais frequência no tratamento de infecções gram-negativas multirresistentes (Bush 2012). São antimicrobianos com uma estrutura geral que consiste em um peptídeo cíclico com um radical hidrofóbico longo que rompem a estrutura da membrana celular bacteriana por interação com os seus fosfolípidos e lipopolissacarídeos (LPS). As polimixinas são seletivamente tóxicas para as bactérias gram-negativas, devido à sua especificidade para a molécula de lipopolissacarídeo que existe no interior da membrana externa em gram-negativos (Mendes *et al.*, 2009). O problema global do avanço da resistência antimicrobiana levou recentemente a um renovado interesse na utilização da polimixina B (Bassetti *et al.*, 2013).

Desde 1970 o uso das polimixinas tinha sido praticamente abandonado na maioria dos pacientes devido a relatos de graves efeitos adversos sendo os mais importantes destas drogas: nefrotoxicidade (principalmente insuficiência renal aguda) e neurotoxicidade como também pelo aparecimento de novos antimicrobianos com menos tóxicos (Mendes *et al.*, 2009). No entanto, na recente década, de infecções por organismos gram-negativos multi-droga resistente (MDR), levou ao retorno das polimixinas especialmente em pacientes criticamente enfermos, porém maiores dados são necessários para esclarecer o papel das polimixinas nas infecções, embora as evidências disponíveis sugiram que terapias à base de polimixinas podem ser eficazes para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* (Liu *et al.*, 2014).

Há também relatos de aumento na frequência de infecções causadas por bactérias naturalmente resistentes a polimixina, tais como *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* e *Serratia* (Hayakawa *et al.*, 2012; Merkier *et al.*, 2013; Samonis *et al.*, 2014). Enquanto isso, junto com o ressurgimento de polimixinas no tratamento de infecções, a sua melhor administração permanece incerta. É especialmente difícil julgar quando se comparam monoterapias de polimixinas com terapias combinadas. Vários estudos de polimixinas *in vitro* e em animais demonstraram atividade sinérgica com outros agentes. Ao alterar a permeabilidade da membrana, pode as polimixinas facilitar a entrada de antimicrobianos para dentro da célula bacteriana, porém a eficiência da terapia combinada tem sido questionada em relação a probabilidade do aumento da toxicidade e dos custos (Liu *et al.*, 2014).

A terapêutica para infecções por enterobactérias multirresistentes se baseia na utilização de Polimixina B ou Polimixina E em associação com um ou mais antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina ou amicacina), dos carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) e/ou a tigeciclina. Sempre usando associações de dois ou três antimicrobianos, sendo um deles a polimixina B ou a polimixina E, devendo-se evitar a utilização de monoterapias pelo risco do rápido desenvolvimento de resistência. A escolha do(s) fármaco(s) de associação com polimixina B ou E deve se basear, preferencialmente, no perfil de susceptibilidade esperado aos referidos medicamentos das enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos detectadas no hospital ou, na ausência de dados locais, na sua região (Nota técnica da Anvisa nº01/2013).

O Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2014) não fornece critérios de interpretação para polimixina B contra *Enterobacteriaceae*, mas fornece “breakpoints” para *A. baumannii* (sensível $\leq 2\mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 4\mu\text{g/mL}$) e para *P. aeruginosa* (sensível $\leq 2\mu\text{g/mL}$; resistente $\geq 8\mu\text{g/mL}$) (Lat *et al.*, 2011; CLSI 2014). A pobre difusão de polimixinas em ágar devido as suas propriedades catiônicas resulta em resultados imprecisos pelo método de difusão em meio sólido o que gera dificuldades na interpretação dos testes de susceptibilidade das polimixinas. A metodologia E-test, em comparação com os métodos de susceptibilidade de diluição, resultou em grandes taxas de erro para *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Apesar do caldo Mueller-Hinton cátion ajustado ainda ser o caldo recomendado para microdiluição, a adição de polissorbato 80 parece reduzir a adsorção de colistina para poços de poliestireno, resultando em substancialmente valores inferiores de CIM (Hindler; Humphries, 2013). O método ideal

para testes de susceptibilidade à polimixinas deverá ser ainda melhor definido (Landman *et al.*, 2013; Hindler; Humphries, 2013).

2.3. Alterações ultraestruturais provocadas por antimicrobianos

Desde 1987, Paul Williams relatou que sub-Concentrações Inibitórias Mínimas de antimicrobianos (Sub-MICs), em particular da penicilina e de cefalosporinas, podem exercer um efeito grave na morfologia bacteriana e conseqüentemente na superfície celular, onde os danos induzidos pelos antimicrobianos podem aumentar sensivelmente os mecanismos de defesas do hospedeiro, contribuindo para a erradicação da infecção.

Segundo HELD *et al.* (1995), sub-MICs de agentes antimicrobianos podem afetar a produção dos componentes da parede celular bacteriana, resultando em sua redução significativa. Os β -lactâmicos se ligam covalentemente as PBPs inibindo sua atividade e provocam alterações na estrutura da parede celular promovendo diferentes alterações morfológicas, as células apresentam-se filamentosas e curvadas, alongam-se de duas a oito vezes, apresentam formação de septos espaçados e irregulares e espessamento da parede celular (Derrel; David, 2003).

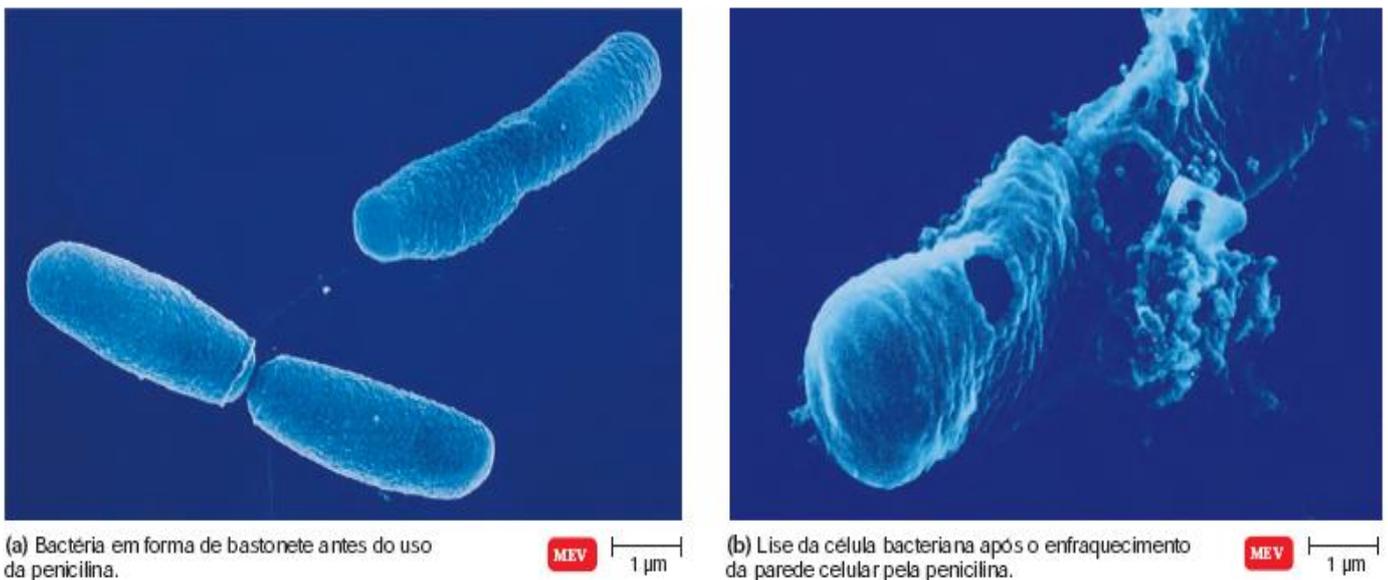
A membrana citoplasmática interna está protegida contra estresse osmótico e pressão de turgescência pela rígida camada de peptidoglicano. Quando as bactérias se dividem na presença de um β -lactâmico, são produzidas formas deficientes de parede celular, como o ambiente intracelular bacteriano é hiperosmótico as células entumescem e sofrem ruptura (Whitfield; Naismith, 2008). Os β -lactâmicos previnem a síntese do peptidoglicano, conseqüentemente a parede celular fica enfraquecida e a célula sofre lise (Figura 4).

Estudos realizados com *Helicobacter pylori*, submetidos a sub-MICs de antimicrobianos β -lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, penicilina G, aztreonam, mezlocilin, oxacilina, ceftriaxone e cefuroxima) mostraram grandes alterações na membrana e na morfologia celular bacteriana em todos os antimicrobianos β -lactâmicos testados. Cada um dos oito β -lactâmicos examinados induziram a formação de vesículas e esfera, enquanto o aztreonam foi o único antimicrobiano estudado que induziu pronunciada filamentação em *H. pylori* (Deloney & Schiller, 1999).

No estudo de Rajeshwari *et al.* (2009), ocorreu alongamento de filamentos bacterianos em isolados de *K. pneumoniae* resistentes, mostrando que o estresse provocado

pela cefotaxima provocaram alongamento, deformação das células bacterianas e superfície rugosa.

Figura 4: (a) Eletromicrografia demonstrando estrutura conservada de bactérias antes do uso de um β -lactâmico; (b) Eletromicrografia demonstrando alterações ultraestruturais provocadas após o uso de um β -lactâmico.



Fonte: (Tortora *et al.*, 2012).

Veras (2014) descreveu alterações ultraestruturais e morfológicas de isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota e IRAS, portadores dos genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX} ou bla_{KPC} , quando submetidos *in vitro* à concentração de antimicrobianos β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, imipenem, ampicilina e amoxicilina). Os isolados demonstraram diferentes alterações morfológicas e ultraestruturais, tais como filamentação celular, perda de material citoplasmático e deformação dos septos de divisão. Os resultados revelaram também que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes genes codificantes para β -lactamases, apresentam alterações celulares quando submetidos a diferentes antimicrobianos β -lactâmicos sugerindo que estes possuem uma ação residual *in vitro* nos isolados analisados, suportando a idéia de que isolados de *K. pneumoniae* MDR

não são capazes de evitar completamente a interação entre os antimicrobianos β -lactâmicos com seu alvo.

O estudo de Hirsh *et al.* (2013), demonstrou a ação *in vivo* e *in vitro* da combinação de antimicrobianos β -lactâmicos e aminoglicosídeos em isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes (MDR), objetivando identificar novas opções terapêuticas para tratamento de infecções por esta espécie bacteriana.

Para infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase KPC, tem sido sugerido o tratamento combinado, com duas ou mais drogas, incluindo a polimixina B ou a polimixina E, associado com um carbapenêmico ou com a tigeciclina, visando uma maior efetividade em relação a monoterapia (Tumbarello *et al.*, 2012; Nota técnica da Anvisa nº01/2013). As polimixinas têm ação semelhante a detergentes catiônicos simples, deslocando competitivamente os íons de Ca^{++} e Mg^{++} que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma, levando à perda do conteúdo celular e ocasionando morte da bactéria (Mendes *et al.*, 2009).

Até o presente momento não existem estudos publicados que possibilitem avaliar e comparar as alterações ultraestruturais provocados por antimicrobianos utilizados no tratamento sugerido para infecções por *K. pneumoniae* produtoras de KPC. Novas terapias combinadas para tratamento de isolados multirresistentes devem ser avaliadas, assim como também é importante conhecer quais os efeitos ultraestruturais podem ser produzidos com o uso de polimixina B e meropenem sozinhos e pela associação de polimixina B e meropenem frente a isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC}.

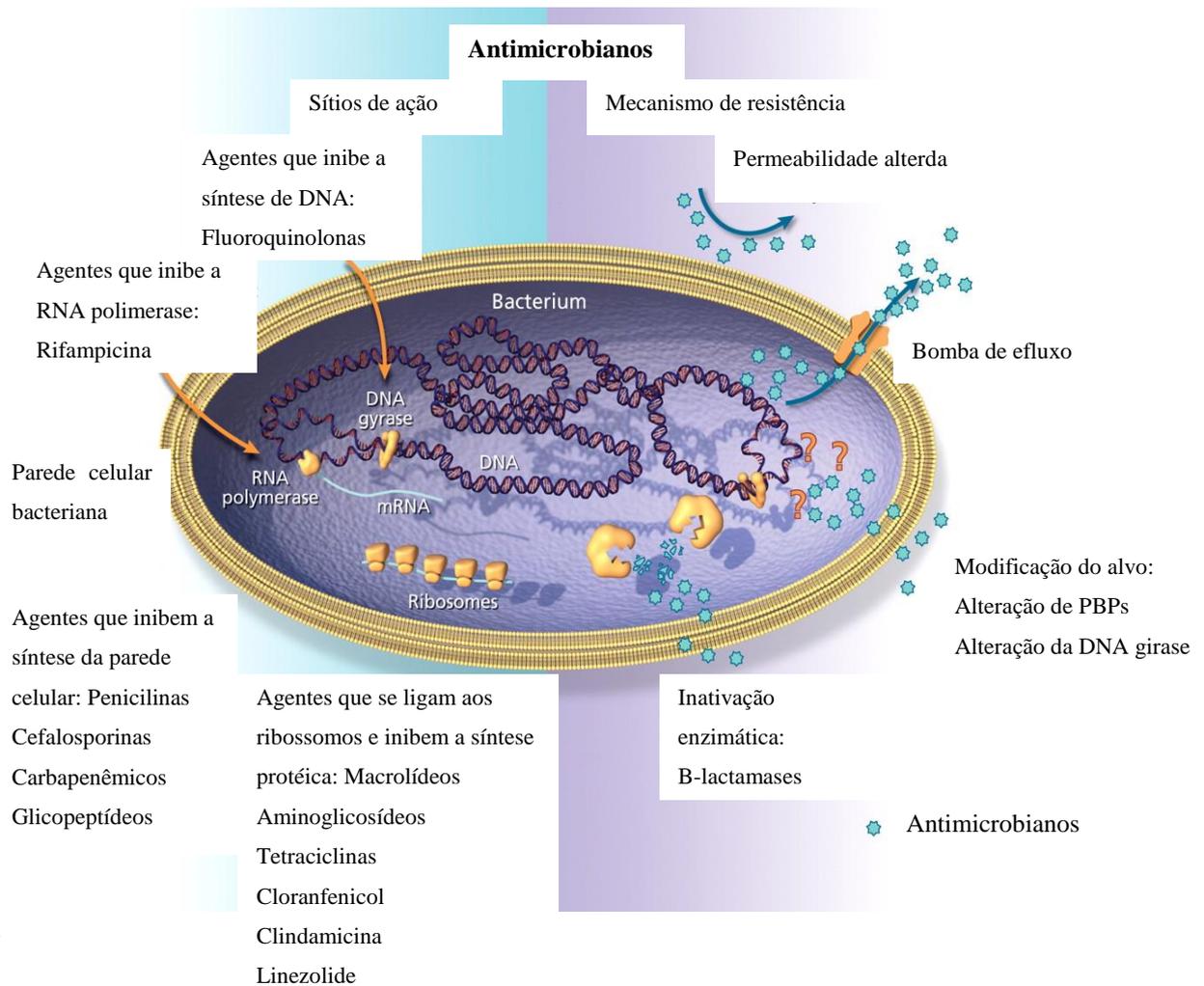
2.4. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ser reunidos em quatro grupos: (1) inativação enzimática, (2) alteração do sítio de ação do antimicrobiano, (3) alteração da permeabilidade da membrana (alterações ou perda de porinas) e (4) expulsão ativa do antimicrobiano para o ambiente extracelular (Rossi *et al.*, 2011). (Figura 5).

O alto envolvimento de *K. pneumoniae* em infecções graves está relacionado à grande facilidade desta espécie na aquisição de plasmídeos de multirresistência durante o processo de conjugação bacteriana (Cuzón *et al.*, 2011), os quais podem possibilitar resistência a diferentes classes de antimicrobianos principalmente aos β -lactâmicos, sendo um fator limitante e uma das maiores causas de falhas no tratamento das infecções

causadas por esta bactéria. A transferência destes plasmídeos de resistência pode ocorrer inter e intra-espécie, facilitando a disseminação da resistência bacteriana (Ozgunus, 2008).

Figura 5: Sítio de ação e mecanismos de resistência aos antimicrobianos



Fonte: Mulvey e Simor (2009) com modificações.

A rápida disseminação de mecanismos de resistência confere uma vantagem seletiva as células bacterianas que adquirem plasmídeos em ambientes onde há uma grande pressão seletiva, como o uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar (Leavitt, *et al.*, 2010). De maneira geral, os plasmídeos não carregam genes essenciais para o desenvolvimento das células em ambientes na ausência de estresse, diferente disso carrega

genes que conferem uma maior vantagem quanto a adaptação bacteriana em diferentes ambientes (Carattoli, 2009). Sharma; Ray e Sharma (2010) descreveram uma tendência no aumento de resistência com o aumento do número de plasmídeos.

A diversidade genética em plasmídeos de *K.pneumoniae* mostra claramente que as bactérias podem reforçar sua resistência a antimicrobianos frequentemente pela troca de plasmídeos de multirresistência e também pela elevada taxa de mutação em plasmídeos (Zhao *et al.*, 2010 e Hiroi *et al.*, 2012).

2.4.1 β -lactamases

A resistência aos β -lactâmicos é conferida principalmente pela produção de β -lactamases, enzimas codificadas principalmente por genes plasmidiais que são encontrados com frequência entre as enterobactérias, representando uma séria ameaça a atual terapia por antimicrobianos β -lactâmicos (Pulido *et al.*, 2011).

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de inativar antimicrobianos β -lactâmicos originando produtos inativos. As β -lactamases de amplo espectro (ESBLs-Extended Spectrum β -lactamases) são enzimas que surgiram a partir de sucessivas mutações pontuais das β -lactamases clássicas dos tipos TEM e SHV, que resultou na substituição de um ou mais aminoácidos, alterando a configuração da enzima e aumentando o seu espectro hidrolítico. (Haeggman *et al.*, 2004).

É crescente o número de ESBLs descritas, a maioria é derivada dos grupos TEM, SHV e CTX-M. De acordo com o site: <http://www.lahey.org/Studies>, até dezembro de 2014 foram descritas 222 variantes do tipo TEM, 189 variantes do tipo SHV e 161 variantes do tipo CTX-M.

A Classificação de β -lactamases tem sido tradicionalmente baseada tanto nas características funcionais das enzimas quanto na sua estrutura principal (Bush; Jacoby, 2010). As β -lactamases são bastante diversificadas podendo ser agrupadas em 4 classes moleculares (A, B, C e D) de acordo com as características estruturais (classificação de Ambler) ou em 3 principais grupos de acordo com características funcionais e moleculares (esquema de Bush-Jacob-Medeiros de 1995) (Robin *et al.*, 2005; Bush; Jacoby, 2010).

As β -lactamases são proteínas bastante diversificadas, o grupo 1: β -lactamases que hidrolisam cefalosporinas e que são pouco inibidas pelo ácido clavulânico; o grupo 2:

penicilinas, cefalosporinas, β -lactamases de amplo espectro (ESBLs- Extended Spectrum β -lactamases), geralmente são inibidas pelo ácido clavulânico e carbapenemases; e o grupo 3: metalo- β -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e que não são inibidas pelo ácido clavulânico.

O grupo 2 engloba o maior número de β -lactamases, sendo dividido em oito subgrupos (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f) (Chaeggman *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2004). O subgrupo 2f compreende as serina-carbapenemases da classe molecular A de Ambler, tendo os carbapenêmicos como substrato. Estas enzimas são melhor inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico. SME, IMI-1 e CNM-1 são os representantes cromossômicos das enzimas do subgrupo 2f (Queenan; Bush, 2007). Mais preocupante, no entanto, é o subgrupo 2f mediado por plasmídeo, incluindo enzimas KPC e algumas GES.

O grupo 3 compreende as MBLs que hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e que não são inibidas pelo ácido clavulânico. Elas diferem estruturalmente das outras β -lactamases por sua exigência de um íon de zinco no sítio ativo. Funcionalmente, já foram distinguidas principalmente pela sua capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, porém algumas serina- β -lactamases têm agora adquirido essa habilidade. Em contraste com as serina- β -lactamases, MBLs têm uma fraca afinidade ou capacidade hidrolítica para monobactâmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam. (Marchiaro *et al.*, 2008).

O subgrupo 3a inclui as principais famílias de MBL plasmidiais, tais como IMP e VIM que têm aparecido globalmente, principalmente em bactérias não-fermentadoras, mas também em *Enterobacteriaceae*. O subgrupo 3b contém um pequeno grupo de MBLs que preferencialmente hidrolisam carbapenêmicos em contraste às penicilinas e cefalosporinas (Bush; Jacoby, 2010). Existem vários mecanismos de resistência aos carbapenêmicos (Paterson, 2006; Queenan; Bush, 2007; Bennett *et al.*, 2010).

Até dezembro de 2014 foram relatadas 43 variantes VIM e 48 variantes IMP na literatura (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

Ao longo dos últimos 20 anos, novos antimicrobianos β -lactâmicos tem sido desenvolvidos, que foram especificamente concebidos para serem resistentes à ação hidrolítica de β -lactamases. No entanto, a cada nova classe que tem sido utilizada na terapia, novas β -lactamases emergem, causando resistência à mesma classe de drogas.

Presumivelmente, o uso de novos antimicrobianos no tratamento de pacientes foi selecionando novas variantes de β -lactamases (Bradford 2001). Atualmente, as bactérias são geneticamente mais complexas do que há uma ou duas décadas. Devido não apenas aos novos mecanismos de resistência como ESBL, mas também devido a isolados que produzem múltiplas β -lactamases, representando um grave problema terapêutico em muitas partes do mundo (Sharma; Ray; Sharma, 2010).

Dados da literatura mostram que *K. pneumoniae* é a espécie bacteriana que mais produz ESBLs, principalmente do grupo 2, TEM, SHV e CTX (Chanawong *et al.*, 2002 e Ghafourian *et al.*, 2012). A produção destas enzimas é frequentemente acompanhada por uma resistência a múltiplas drogas devido sua localização plasmidial, incluindo antimicrobianos β -lactâmicos e não β -lactâmicos, o que pode causar uma limitação na escolha da droga apropriada para utilização na prática clínica devido aos altos CIMs frente a diferentes classes de antimicrobianos (Castanheira *et al.*, 2008). Recentemente, uma série de enzimas ESBL que não estão relacionadas com as enzimas TEM e SHV foram descritas, OXA, AmpC e VEB (Bush; Jacoby, 2010).

A emergência e disseminação das ESBLs tem comprometido o uso dos β -lactâmicos no tratamento de pacientes hospitalizados com infecções causadas por diversos membros da família *Enterobacteriaceae* (Castanheira *et al.*, 2008), visto que a disseminação deste mecanismo de resistência neste grupo está aumentando por todo o mundo (Queenan *et al.*, 2007 e Hartmann *et al.*, 2012). *K. pneumoniae* tem sido relatada como a mais frequente espécie produtora de ESBLs (Bratu *et al.*, 2005).

2.4.2 Carbapenemases

Em *K. pneumoniae*, a resistência aos carbapenêmicos está principalmente relacionada à aquisição de carbapenemases. A *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) é capaz de hidrolizar todas as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (Peirano *et al.*, 2009; Goren *et al.*, 2010). A KPC foi primeiramente detectada na Carolina do Norte, Estados Unidos, sendo mais comum em enterobactérias, especialmente em *K. pneumoniae* (Won *et al.*, 2009 e Lolans *et al.*, 2010). Depois expandiu-se ao longo da costa leste dos Estados Unidos e a partir de 2005 a detecção de KPC foi relatada em outros países (Nass *et al.*, 2005; Wendt *et al.*, 2010). KPC já foi detectada na Europa (Pfeifer; Cullik; Witte,

2010), Finlândia (Österblad *et al.*, 2009), América do Sul (Villegas *et al.*, 2006; Pasteran *et al.*, 2008), China (Wei *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008) e Alemanha (Wendt, 2008).

Organismos produtores de KPC continuam a espalhar-se ao longo do tempo, sendo notificados em 27 estados dos Estados Unidos e em muitos países ao redor do mundo, incluindo Colômbia, Brasil, Israel (Navon-Venezia *et al.*, 2006; Samra *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2009; Leavitt *et al.*, 2009; Jácome *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2014), Canadá, França, República da Irlanda, Grécia, Espanha (Tsakris *et al.*, 2008; Maltezou *et al.*, 2009; López-Cerero *et al.*, 2014) e na Itália (Giani *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010; Giacobbe *et al.*, 2014).

As β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos são significantes clinicamente e sua frequência tem aumentado em todo o mundo, inclusive no Brasil (Monteiro *et al.*, 2009; Arend *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Quiles *et al.*, 2014). Na cidade do Recife-PE foram detectados dois clones distintos de *K. pneumoniae* do ano de 2006 produtores de KPC (Monteiro *et al.*, 2009), sendo este o primeiro relato no Brasil. Em seguida, foram detectados seis isolados de *K. pneumoniae* recuperados de dois hospitais do Rio de Janeiro (de setembro de 2007 a maio de 2008) (Peirano *et al.*, 2009). Na verdade, Pavez, Mamizuka e Lincopan (2009), mostraram que estes isolados estavam presentes na região sudeste do Brasil desde pelo menos 2005 (Zavascki *et al.*, 2009). Trabalhos recentes desenvolvidos em Recife-PE com isolados *K. pneumoniae* provenientes de infecções e colonizações mostram a alta ocorrência do gene *bla*_{KPC}, sendo predominante a variante *bla*_{KPC-2} (Melo *et al.*, 2014), como também a presença simultânea desse gene com *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-2} (Cabral *et al.*, 2012)

As serinas-carbapenemases (KPC e GES) são amplamente dispersas, pois seus genes estão localizados em elementos transferíveis, facilitando sua disseminação, o que também reflete na sua distribuição geográfica (Walther-Rasmussen e Hoiby, 2007). Os genes *bla*_{KPC} estão localizados no transposon Tn4401 baseado no Tn3 (Nass *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2010). Este transposon foi identificado em plasmídeos de diferentes tamanhos, sugerindo que o gene também pode se mover pela inserção do transposon em plasmídeos diferentes (Patel; Rasheed; Kitchel, 2009).

De acordo com o site <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>, até dezembro de 2014, 22 variantes do gene *bla*_{KPC} já foram detectados. Isolados produtores de KPC são preocupantes para a clínica, devido ao seu potencial de disseminação epidêmica (Poupnaras *et al.*, 2009). Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC estão sendo

identificados entre os patógenos nosocomiais mais frequentes (Nass *et al.*, 2008). Embora a β -lactamase KPC seja predominantemente encontrada em isolados de *K. pneumoniae*, alguns trabalhos têm descrito esta enzima em *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.* (Queenan; Bush, 2007; Petrella *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2010), bem como, em outros membros de enterobactérias (*K. oxytoca*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Serratia spp.*) (Anderson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007) e também em *P. aeruginosa* (Wolter *et al.*, 2009; Jácome *et al.*, 2012).

De acordo com Lin *et al.* (2013), foram pesquisados 391 pacientes colonizados com Enterobacteriaceae na UTI dos hospitais de Chicago, Illinois. Em pacientes que permaneceram longo tempo em cuidados hospitalares agudos -LTACHs 30,4% (119 de 391) estavam colonizados por Enterobacteriaceae produtoras de KPC em comparação com 3,3% (30 de 391) dos pacientes internados na UTI do hospital em curta duração. Todos os entrevistados LTACHs eram portadores de KPC com uma taxa de prevalência de 10% a 54%, contra uma prevalência de 0% a 29% de pacientes em cuidados de curta duração nos hospitais, identificando uma alta taxa de prevalência entre pacientes LTACHs colonizados com Enterobacteriaceae produtoras de KPC.

A aquisição de KPC tem contribuído para resistência a todos os β -lactâmicos. Estes isolados também são frequentemente resistentes a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, este atributo limita as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves, que é basicamente restrito a tigecciclina e polimixinas (Saidel-Odes; Borer, 2013).

Alguns organismos produtores de KPC usualmente apresentam também resistência associada às fluoroquinolonas, o que pode ser justificado pela presença do gene *qnr* acompanhado pelo gene *bla_{KPC}* em plasmídeos (Pereira *et al.*, 2008). Portanto, é importante pesquisar a ocorrência de genes de resistência a quinolonas em isolados multirresistentes de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* provenientes de colonização e infecção em pacientes de hospitais públicos no Brasil para que intervenções de controle de infecção sejam adotadas precocemente, interrompendo a propagação destes mecanismos de resistência e aumentando a sobrevivência dos pacientes.

2.5 Mecanismos de resistência as quinolonas

A compreensão de que a resistência tradicional à quinolona é adquirida somente através de mutações e transmitido apenas verticalmente não é inteiramente responsável

pela relativa facilidade com que a resistência desenvolve-se. Diferentes mecanismos de resistência estão envolvidos no desenvolvimento de resistência às quinolonas. Os principais mecanismos são: alterações na DNA girase e topoisomerase IV, considerados sítios alvos ativos de quinolonas; diminuição do acúmulo de antimicrobiano no interior da célula bacteriana, por impermeabilidade de membrana e hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo, além de elementos móveis (plasmídeos) carreando os genes *qnr*, o qual confere níveis de resistência às quinolonas e são transferíveis horizontalmente (Ruiz, 2003).

2.5.1 Mutações em DNA girase e topoisomerase IV

O desenvolvimento de resistência às quinolonas, especialmente em membros da família *Enterobacteriaceae*, tem sido descrito por mutações pontuais cromossômicas nos genes que codificam a DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e a topoisomerase IV (*parC* e *parE*). Esses são os mecanismos mais eficientes de resistência às quinolonas (Shigemura *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2013; Yang; Nam; Lee, 2013). Em bactérias gram-negativas, a DNA girase é mais susceptível à inibição por quinolonas que a topoisomerase IV, ao passo que, em bactérias gram-positivas, topoisomerase IV é geralmente o principal alvo das quinolonas, e a DNA girase intrinsecamente menos susceptíveis. Consequentemente, as mutações de resistência ocorrem primeiro em *gyrA* em bactérias gram-negativas, mas ocorrem primeiro em *parC* em bactérias gram-positivas (Jacoby, 2005).

DNA girase é uma enzima encontrada apenas em células bacterianas, esta enzima utiliza a energia da hidrólise de ATP para introduzir superhelicoidização negativa no DNA esta enzima é um excelente alvo para quinolonas porque não está presente em células eucarióticas e é essencial para o crescimento bacteriano (Fábrega *et al.*, 2009). A superhelicoidização negativa do DNA é essencial para a condensação do cromossomo, aliviando a tensão de torção durante a replicação, e promove a fusão local para os processos vitais, tais como iniciação e transcrição pela RNA polimerase (Wang, 2002). A DNA girase é essencial para o processo de replicação bacteriana, mutações descritas no gene *gyrA* que codifica a subunidade A desta proteína geralmente estão localizadas em uma região designada de região determinante de resistência à quinolonas (QRDRs), mutações nessas regiões altera o sítio de ligação da DNA girase ao antimicrobiano o que pode resultar em resistência a quinolonas (Minarini, 2008; Ferrari *et al.*, 2013). Esta região

QRDRs ocorre na superfície de ligação do DNA a enzima, mutação nas posições dos aminoácidos 83 e 87 do gene *gyrA* são as mais comuns.

As mutações mais importantes que conduz a um fenótipo resistente à quinolona no gene *gyrA*, são principalmente encontradas nos aminoácidos Ser-83-Leu e Asp-87-Asn (esta posição pode ser ocasionalmente alterado para Val, Tyr e Gli), e na mudança do gene *parC* Ser-80-Arg (Ile também pode ser encontrado) e Glu-84-Val (Gli também pode ser encontrado) (Paiva *et al.*, 2012). No estudo de Nam *et al.*, (2013) mutações em *gyrA* e *parC* são mais frequentes do que em *gyrB* e *parE*, como também as mutações são mais comuns em isolados de *E.coli* do que em *K. pneumoniae*. As mutações no gene *gyrB* são principalmente encontradas nos aminoácidos Ser-359-Ala, Ser-367-Thr e Glu-466-Asp (Nam *et al.*, 2013). No entanto, mutações em Asp-426-Asn e Lys-447-Glu em isolados clínicos de *E. coli*, parece não ser um achado comum, várias mutações são necessárias para produzir um nível elevado de resistência à quinolona. (Fábrega *et al.*, 2009).

Além de mutações pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e/ou *parE*, a diminuição da susceptibilidade a fluoroquinolonas pode ser devido à diminuição do acúmulo do antimicrobiano ou pela presença de alguns plasmídeo mediando mecanismos de resistência às quinolonas. Além disso, superexpressão de bombas de efluxo pode também desempenhar um elevado papel no nível de resistência, acredita-se que os sistemas de efluxos sozinhos são capazes de produzir baixos níveis de resistência as quinolonas, torna-se clinicamente relevante quando combinados com mutações em enzimas alvos ou alterações de membrana (Guan *et al.*, 2013).

2.5.2 Bombas de efluxo

Além de mutações de topoisomerasas, permeabilidade alterada (geralmente por causa de perda de porina) as bombas de efluxo também podem contribuir com o fenótipo de resistência a fluoroquinolona em *K.pneumoniae* (Nam *et al.*, 2013).

Efluxo é o bombeamento do soluto para fora de uma célula. A resistência antimicrobiana em um “efluxo mutante” (mutantes que superexpressam bombas de efluxo) é devido a um de dois mecanismos: (i) aumento da expressão da proteína da bomba de efluxo, ou (ii) a proteína contém uma substituição de aminoácido(s) que torna-a mais eficiente na exportação. Em qualquer caso, a concentração intracelular do substrato

antimicrobiano é diminuído e o organismo torna-se menos susceptível a esse agente (Pidcock 2006).

Existem essencialmente cinco diferentes famílias de proteínas de bombas de efluxo, famílias importantes codificadas cromossomicamente, são as famílias RND (resistance nodulation division), MFS (major facilitator superfamily), SMR(staphylococcal multiresistance), MATE (multidrug and toxic compound extrusion) e ABC (ATP binding cassette) (Pidcock 2006).

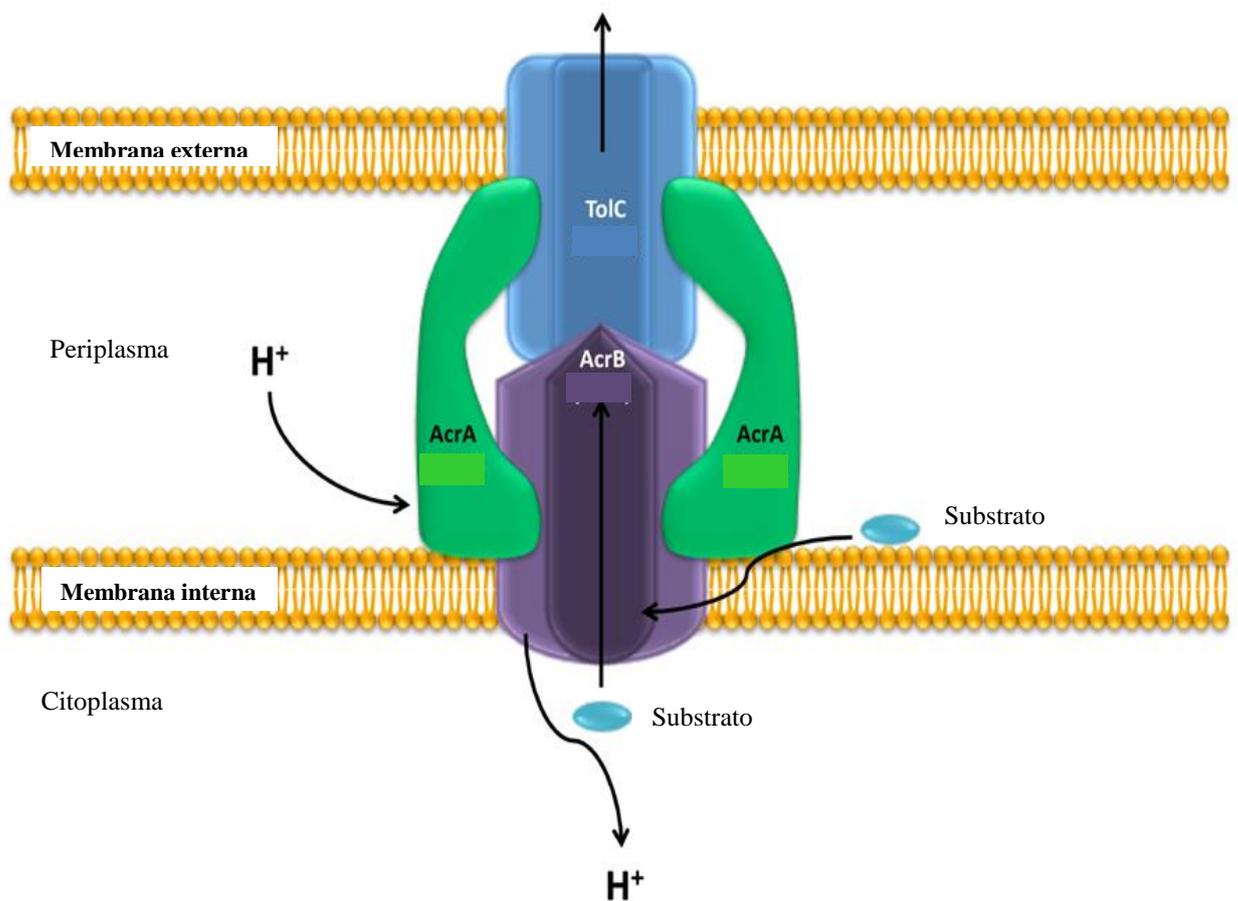
Os transportadores pertencentes a família RND são particularmente eficazes gerando resistência e apresentam ampla especificidade de substrato (Horiyama; Nishino, 2014). Um dos sistemas de efluxo envolvido neste fenótipo de resistência é o sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC que em *K. pneumoniae* é codificada pelo operon *acrRAB*. Sabe-se que uma proteína transportadora na membrana interna (AcrB) forma uma complexo com AcrA, uma proteína adaptadora periplasmática e Tolc, um membro da membrana externa, canal envolvido na exportação de pequenas moléculas e algumas proteínas (figura 6) (Perez *et al.*, 2012; Horiyama; Nishino, 2014).

A proteína AcrA, acredita-se está envolvida *in vivo* na montagem e na manutenção de um complexo estável que transmite mudanças conformacionais em AcrB e TolC, tendo um papel estrutural de estabilização na arquitetura da bomba fazendo a junção de AcrB e TolC levando, assim, a abertura do canal na membrana exterior, neste modelo a especificidade do substrato é determinada pelo AcrB (Elkins *et al.*, 2010). Embora o componentes da bomba de efluxo AcrAB-TolC trabalhem juntos como um sistema tripartite, os componentes individuais podem também desempenhar determinados papéis em outros sistemas de efluxo. Em *E. coli*, TolC tem sido mostrado ser necessário para o funcionamento de muitos sistemas de efluxo, incluindo bombas da família RND: AcrD, AcrEF, MdsAB, e MdtABC, bem como da família MFS: EmrAB e EmrKY, e também da família ABC: MacAB (Perez *et al.*, 2012). Swick *et al.*, (2011) sugerem que supexpressão de AcrAB é um marcador de resistência a múltiplas drogas.

O gene *acrB* codificam uma lipoproteína periplasmática de 40 kDa, ancorada na membrana interna, a proteína AcrB conecta-se com a Tolc, uma proteína de membrana externa, que é essencial para a expulsão de drogas (Takatsuka *et al.*, 2010). Esta estrutura tripartite permite o efluxo direto de drogas para o meio externo, ao invés de ir para o periplasma, e faz AcrAB-Tolc e seus homólogos um sistema muito eficiente para manter os níveis crescentes de resistência em bactérias gram-negativas. O transportador AcrB, que

presumivelmente, capta moléculas da droga principalmente do periplasma, mostra uma extrema especificidade ao substrato. A estrutura sugere que os substratos podem ser capturados a partir do periplasma ao invés de serem capturados pela membrana ou citoplasma, os substratos são então activamente transportados para o canal TolC em seguida, é ligado à parede da cavidade central, e é bombeado para o meio externo contra o gradiente de próton (Figura 6). A ligação de substratos em AcrB é devido a parcial ligação do composto com a bicamada fosfolípídica da membrana citoplasmática, dependendo do carácter lipofílico e carga da molécula (Horiyama; Nishino, 2014).

Figura 6: Desenho esquemático do sistema da bomba de efluxo AcrAB-TolC.



(Fonte: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2013.00007/full>)

Bombas de efluxo podem ser específicas para um substrato ou pode transportar uma variedade de compostos estruturalmente diferentes (incluindo antimicrobianos de múltiplas classes); Tais bombas podem ser associadas com resistência a múltiplas drogas (MDR) (Piddock 2006).

AcrAB-TolC pode bombear para fora não só corantes básicos (como acriflavina e brometo de etídio), mais também antimicrobianos (como macrolídeos, fluoroquinolonas, β -lactâmicos, polimixina, tetraciclina, cloranfenicol, rifampicina, novobiocina, ácido fusídico, mas não aminoglicosídeos e detergentes, tais como sais de bili, Triton X-100, SDS). Mesmo solventes simples, como hexano, heptano, octano, nonano e ou ciclo-hexano são bombeados para fora por AcrAB-TolC (Takatsuka *et al.*, 2010; Padilha *et al.*, 2010).

Em adição a um papel estabelecido na resistência antimicrobiana, algumas bombas de efluxo multidroga não só conferem resistência aos medicamentos usados em terapia, mas também têm mostrado ter um papel na patogenicidade bacteriana, na colonização de uma variedade de organismos e na sua sobrevivência no hospedeiro. As bombas de efluxo são responsáveis por expelir agentes antimicrobianos derivados do hospedeiro, tais como sais biliares e ácidos graxos de cadeia longa, assim, a inativação da bomba de efluxo AcrAB-TolC pela falta de um dos seus componentes estruturais afeta diretamente a virulência da bactéria, indicando que este sistema é necessário para as bactérias serem patogênicas (Martinez *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2012).

A aquisição KPC tem contribuído para a resistência a todos os beta-lactâmicos, essas cepas também são frequentemente resistentes a aminoglicosídeos e quinolonas, e alguns isolados ocasionalmente são resistentes as polimixinas e a tigeciclina. AcrAB-TolC também tem sido implicado como o mediador para redução da susceptibilidade à tigeciclina em várias bactérias gram-negativas, incluindo *E. coli*, *K.pneumoniae*, *Morganellamorganii*, *P.mirabilis* e *Enterobacter cloacae* (Keeney *et al.*, 2008, Bratu *et al.*, 2009).

AcrEF é um outro transportador da família RND conhecido para complementar funcionalmente AcrAB-TolC. Sistemas de efluxo desempenham um papel altamente relevante na defesa bacteriana contra agentes antimicrobianos e compostos tóxicos, diminuindo acumulação intracelular de drogas (Rensch *et al.*, 2014).

A bomba de efluxo AcrEF é altamente homóloga a AcrAB em *S. enterica* com uma identidade de aminoácidos de 81,4% e especificidades de substrato semelhantes, uma vez

que a superexpressão de AcrEF confere um efeito semelhante a AcrAB. AcrEF pode conferir uma vantagem neste organismo, pois AcrEF pode ser necessária para a resistência aos medicamentos em *S. enterica* quando AcrAB não funciona. Outras investigações da regulação dos sistemas de efluxo multidrogas em diversos micro-organismos são necessários para elucidar a significância biológica das suas redes reguladoras (Nishino; Hayashi-Nishino; Yamaguchi, 2009).

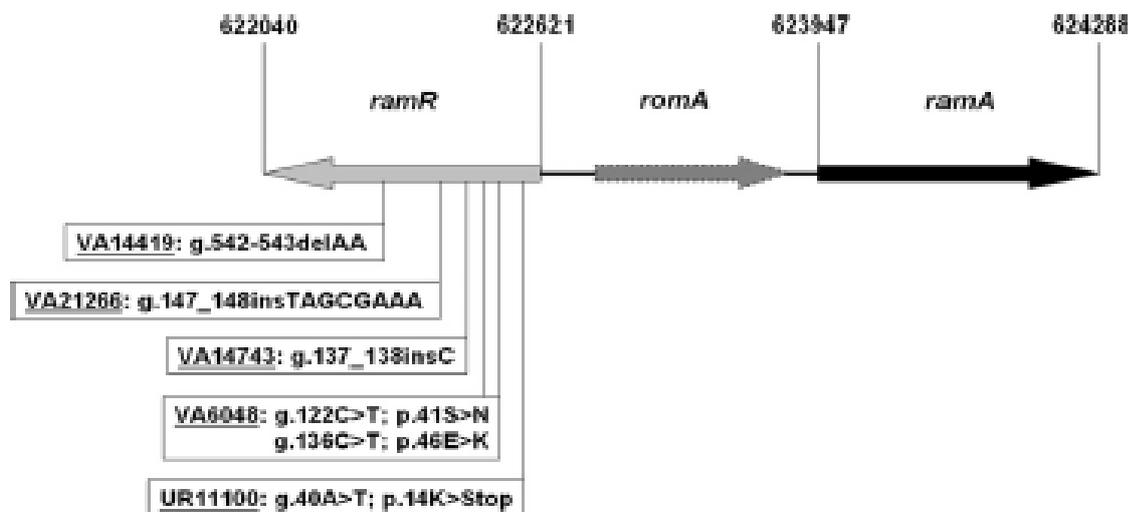
2.5.3 Reguladores da bomba de efluxo

AcrAB está presente na maioria das enterobactérias reduzindo a susceptibilidade das fluoroquinolonas, macrolídeos, clorafenicol, trimetropim, polimixina e tetraciclina). A transcrição dos genes *acrAB* é controlada por diversos ativadores da família AraC/XylS como: *RamA*, *MarA*, *SoxS* e *RobA*, os quais interagem com o promotor *acrAB* aumentando a produção da proteína AcrAB e elevando o efluxo das drogas (Ruzin *et al.*, 2008; Bratu *et al.*, 2009; Bialek-Davenet *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2014).

Mais conhecimento sobre as vias regulatórias que controlam a expressão do sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC em algumas espécies de *Enterobacteriaceae* tem sido adquirido ao longo dos últimos anos. RamR é um repressor transcricional da proteína que codifica o gene *ramA*, que por sua vez controla a expressão dos genes do sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC (Aboouzed *et al.*, 2008; Baucheron *et al.*, 2012; Yamasaki *et al.*, 2013).

O *locus* repressor de *ramA*, chamado *ramR*, cujo gene é encontrado “upstream” de *ramA*, em sentido oposto, foi identificado em *S. enterica* e codifica uma proteína da família de repressores da transcrição (TetR) (Aboouzed *et al.*, 2008; Bialek-Davenet *et al.*, 2011). O *locus* intrínseco de *ram*, codificado pelos genes *ramR–romA–ramA*, foi primeiramente descrito em *K.pneumoniae* (George *et al.*, 1995). O gene *ramR* é um regulador negativo da transcrição de ambos os genes *romA–ramA* e está localizado na posição 622040 até 622621 compreendendo 582 nucleotídeos (Figura 7) (Majundar *et al.*, 2014).

Figura 7: Diagrama esquemático da região compreendendo *ramR* a *ramA* de *K. pneumoniae* com a localização das mutações identificadas.



Fonte: Hentschke *et al.*, 2010

Se a expressão de *ramA* é controlada pelo regulador negativo *ramR*, a depleção ou mutação de *ramR* tem implicado na ativação de RamA, promovendo a super expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC (Bratu *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2014). A superexpressão de *ramA* parece ser a causa da super expressão de AcrAB em *K.pneumoniae* e *E. cloacae*, mas bases moleculares da “upregulation” não podem ser definidas nessas espécies (Hentschke *et al.*, 2010).

Algumas mutações em *ramR* afetam a expressão do sistema de efluxo, vários tipos de mutações em *ramR* foram identificadas em isolados de *S. typhimurium*, *S. enterica* e *K. pneumoniae* multidroga-resistentes, o que resulta em aumento da expressão de *ramA* e aumento da resistência mediada pelo efluxo de múltiplas drogas (Hentschke *et al.*, 2010; Akiyama; Khan, 2012; Baugheron 2013; Yamasaki *et al.*, 2013). Essas mutações pontuais ocorrem em diferentes posições e essas mudanças genéticas são distribuídas ao longo do gene *ramR* que mais adiante pode acarretar na modificação do aminoácido, um “stop códon” prematuro ou a síntese truncada da proteína RamR (Biaek-Davenet *et al.*, 2011).

Biaek-Davenet *et al.*, (2011) analisando isolados clínicos de *K. pneumoniae* encontraram mutações pontuais em *ramR* as quais foram responsáveis pela super expressão

dos genes *ramA* e *acrB*, no entanto a localização dessas mutações foram direntes das descritas por Hentschke *et al.* (2010). Biaek-Davenet *et al.* (2011) encontraram mutações nos nucleotídeos 58, 70, 78, 104, 364, 454 e 490, já Hentschke *et al.*, (2010) encontraram mutações nos nucleotídeos 40, 122, 136, 137, 147 e 542 (figura 7).

2.5.4 Genes *qnr*

Mecanismos secundários estão associados com uma redução na susceptibilidade das bactérias às fluoroquinolonas, tais como a presença de genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* e *oqxA* e *oqxB*. Estes genes são geralmente transportados por plasmídeos, de forma que eles são conhecidos como mecanismo de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) e estão implicados na susceptibilidade reduzida às fluoroquinolonas (Domínguez-Herrera *et al.*, 2013).

O gene *qnr* é responsável por codificar uma proteína de mesmo nome (Qnr) de 218 aminoácidos, capaz de proteger a DNA girase e a topoisomerase IV da ligação às quinolonas (Minarini; Darini, 2012). A função da proteína Qnr ainda permanece obscura, é possível que a interação entre as proteínas *qnr* e a topoisomerase II ou DNA girasse de alguma forma afete tanto a replicação cromossômica bacteriana quanto a sua forma (Machuca *et al.*, 2014). A proteína Qnr se fixa as enzimas em competição com o DNA bacteriano, a redução do número de complexos binários topoisomerases-DNA diminui a fixação das quinolonas nos sítios ativos o que confere um aumento dos níveis de resistência às fluoroquinolonas (Jacoby *et al.*, 2006).

Em 1998, o primeiro gene mediada por plasmídeo exibindo resistência às fluoroquinolonas, atualmente denominada *qnrA1* relatado em um isolado de *K. pneumoniae*, foi identificado. Sete variantes do gene *qnrA* (*qnrA1* a *qnrA7*), 80 variantes de *qnrB* (*qnrB1* a *qnrB80*), 9 variantes de *qnrS* (*qnrS1* a *qnrS9*), 1 variante de *qnrC*, 2 variantes de *qnrD* (*qnrD1* e *qnrD2*), e 6 variantes de *qnrVC* (*qnrVC1* a *qnrVC6*) foram relatados até outubro de 2014 (<http://lahey.org/qnrStudies>). A clonagem e expressão dos genes *qnrA*, *qnrB*, e *qnrS* no isolado J53 de *Escherichia coli* produziu um aumento de aproximadamente 32 vezes nos MICs de ciprofloxacina (Okade *et al.*, 2014).

Os genes PMQR conferem baixos níveis de resistência às quinolonas, porém complementam o nível de resistência causada por outros mecanismos (Yang; Nam; Lee

2013), alguns PMQRs genes estão associados com a produção de ESBLs (Nam *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2012).

A presença de genes PMQR pode facilitar o desenvolvimento de mutações na região QRDR de *gyrA*, bem como aumentar a resistência à quinolonas e, conseqüentemente, reduzir o seu uso clínico (Ferrari *et al.*, 2011). Embora os genes *qnr* estejam presentes em isolados clínicos de todos os continentes, a incidência de genes *qnr* em *E. coli* é mais baixa do que outros mecanismos de resistência, tais como β -lactamases. As potenciais implicações clínicas dos genes *qnr* baseiam-se na sua capacidade de ser transferido para outro isolado. Genes *qnr* presentes em *E. coli* contendo uma substituição de Ser83Leu em GyrA, podem desempenhar um papel significativo na aquisição de alto nível de resistência às quinolonas e, conseqüentemente, poderá causar falhas terapêuticas (Domínguez-Herrera *et al.*, 2013).

O alto nível de genes *qnr* foi detectado em enterobactérias comensais de crianças saudáveis no Peru e Bolívia, onde *qnrB* estava presente em 54% e *qnrS* em 14% dos espécimes. Mecanismos envolvidos em resistência a quinolonas é sem dúvida, uma questão importante na América do Sul. Um relato incluindo isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* entre 2008 e 2010 indicou que a resistência a fluoroquinolonas ocorreu em taxas de 51,7% na Argentina, 44,4% no Brasil e 47,3% no Chile (Gales *et al.*, 2012). No Chile, a prevalência de resistência a fluoroquinolona em *E. coli* de isolados hospitalares variaram de 35% a 39%, enquanto 19% dos isolados adquiridos na comunidade, causando infecções no trato urinário, mostrou este fenótipo (Gales *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011).

Entre 2000 e 2005 no Brasil, genes *qnr* foram encontrados em cerca de 3% dos isolados clínicos de enterobactérias resistentes a ácido nalidíxico recuperados a partir de pacientes externos, incluindo *qnrA* em *E. cloacae*, *qnrB2* em *E. coli* e *K. pneumoniae*, e *qnrB8* em *C. freundii* (Minarini *et al.*, 2007, 2008b). Cinco anos mais tarde, no entanto, um projeto sobre resistência nosocomial ao ácido nalidíxico em *Enterobacteriaceae* realizado na mesma área geográfica, detectou 12,3% de genes *qnr* sendo a variante *qnrB1* identificada como a mais prevalente, seguida por *qnrS1*, *qnrB2* e *qnrB19* (Viana *et al.*, 2013). No Brasil, a prevalência entre isolados resistentes a ciprofloxacina de *E. coli* isoladas de infecção urinária durante 2011 e 2012 mostrou uma taxa de 9% a 17%, dependendo da região adquirida na comunidade estudada (Araujo *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012).

Até o presente momento não existem estudos brasileiros publicados que avaliem a presença dos genes *qnr*, como também a presença de mutações em *gyrA*, *gyrB* e *parC*, em isolados *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* provenientes de infecção e colonização. Adicionalmente, também não existe no Brasil, relatos na literatura pesquisada do sistema de efluxo *acrAB-TolC*, *acrEF-TolC* e seus reguladores em *K. pneumoniae*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a ocorrência de genes de resistência a quinolonas em isolados multirresistentes de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*, provenientes de colonização e infecção em pacientes de hospitais públicos de Recife-PE, como também avaliar alterações ultraestruturais provocadas pela polimixina B, por meropenem e pela associação entre polimixina B e meropenem nestes isolados.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos em isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*.
- Investigar a ocorrência dos genes de resistência *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *acrB*, *acrF* e *ramR* nos isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*.
- Investigar a presença de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *ramR*.
- Avaliar a expressão das bombas de efluxo AcrAB e AcrEF nos isolados de *K. pneumoniae*.
- Identificar possíveis alterações ultraestruturais e a intensidade dessas alterações em isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* submetidos a concentração clinicamente relevante de polimixina B, de meropenem, assim como de polimixina B associado com meropenem.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Isolados bacterianos

Foram analisados 30 isolados hospitalares de *K.pneumoniae* previamente selecionados por serem resistentes a quinolonas e positivos para o gene *bla_{KPC}*, provenientes de colonização (swab retal), infecções urinárias ou infecções respiratórias, de três hospitais públicos da cidade do Recife-PE, Brasil, entre 2011 e 2012. Os isolados de *K. pneumoniae* selecionados foram anteriormente identificados bioquimicamente pelo sistema automatizado Bactec 9120/Phoenix-BD nos hospitais e ao chegar ao Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, foi confirmada a pureza da cultura através de testes bioquímicos convencionais: fermentação de glicose, lactose e sacarose, produção de H₂S, degradação da uréia, citrato e descarboxilação da lisina, produção de indol e motilidade (Koneman *et al.*, 2008). Os 30 isolados de *K. pneumoniae* selecionados para esse trabalho fazem parte do estoque de culturas bacterianas do referido Departamento, já tipadas quanto ao perfil de resistência, perfil de ERIC-PCR e presença do gene *bla_{KPC}* (Melo *et al.*, 2014). Para seqüenciamento de DNA dos genes encontrados nesse estudo e expressão de bombas de efluxo foram selecionados 6 isolados (K3-A2, K12-A2, K25-A2, K27-A2, K19-A2 e K3-C2) sem relação clonal e resistentes a 15 ou mais antimicrobianos, inclusive resistente a 4 quinolonas. As culturas encontram-se preservadas em glicerol 20% a -70 °C e para realização das análises foram crescidas em meio Caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI) a 37 °C por 18 horas.

4.2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade dos isolados a diferentes classes de antimicrobianos foi detectada pelo sistema automatizado Bactec 9120 (Phoenix BD). O método de difusão em disco proposto por Kirby e Bauer foi adicionalmente utilizado para quinolonas e a determinação da concentração inibitória mínima (CIMs) para polimixina B meropenem CLSI (2014). Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina-clavulanato (AMC); amoxicilina (AMO); amicacina (AMI); aztreonam (ATM); ceftazidima (CAZ); cefoxitina (CFO); cefotaxima (CTX); cefepime (CPM); piperaciclina/tazobactam (PIT); polimixina B (POL); trimetropim/sulfametoxazol (SUT); gentamicina (GEN);

ciprofloxacina (CIP); norfloxacina (NOR); ácido nalidíxico (NAL); levofloxacina (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) e ertapenem (ERT). As leituras das CIMs de polimixina B e meropenem e do método de difusão em disco, foram realizadas respeitando os critérios do CLSI (2014).

4.3. Extração de DNA total

O DNA genômico dos 30 isolados foi extraído diretamente das colônias em suspensão em 200µl de água destilada. A suspensão foi aquecida a 100°C por 10 minutos, centrifugada (5min/10.000g) e 100µl do sobrenadante contendo o DNA foram mantidos à -20°C até o momento de uso. Após a extração, o DNA foi quantificado em NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer.

4.4. Condições da PCR para amplificação da região QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC*.

Os genes *gyrA*, *gyrB* e *parC* foram investigados em 4 isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2, K12-A2, K25-A2 e K27-A2) pela técnica de PCR, com os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µL, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂, tampão 5X e 10 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo.

As amplificações do gene *gyrA* foram realizadas com desnaturação inicial de 12 minutos a 94°C seguidas de 30 ciclos, correspondendo cada ciclo a 1 minuto a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 55°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para a extensão e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. As amplificações do gene *gyrB* foram realizadas com desnaturação inicial de 12 minutos a 95°C seguidas de 35 ciclos, correspondendo cada ciclo a 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 65°C para o anelamento e 45 segundos a 72°C para a extensão e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. As amplificações do gene *parC* foram realizadas com desnaturação inicial de 12 minutos a 95°C seguidas de 30 ciclos, correspondendo cada ciclo a 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para a extensão e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

4.5. Condições da PCR para amplificação dos genes *acrB* e *acrF*

Os genes de resistência *acrB* e *acrF* foram investigados pela técnica de PCR nos 30 isolados de *K. pneumoniae*, com os pares de primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1 µl de DNA genômico a 5ng/µL, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂, tampão 5X e 10 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações dos genes *acrB* e *acrF* foram realizadas com desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C seguidas de 30 ciclos, correspondendo cada ciclo a 30 segundos a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 61°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4.6. Condições da PCR para amplificação do gene *ramR*

O gene de resistência *ramR* foi investigado pela técnica de PCR em 4 isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2, K12-A2, K25-A2 e K27-A2), com os pares de primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1 µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂, tampão 5X e 10 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações do gene *ramR* foi realizada com desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C seguidas de 30 ciclos, correspondendo cada ciclo a 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4.7. Condições da PCR para amplificação dos genes *qnr*

Os genes de resistência *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram investigados pela técnica de PCR nos 30 isolados de *K. pneumoniae*, com os pares de primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1 µl de DNA genômico a 5ng/µL, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂, tampão 5X e 10 µmol dos

primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações do gene *qnrA* foram realizadas com desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C seguidas de 32 ciclos, correspondendo cada ciclo a 45 segundos a 95°C para desnaturação, 45 segundos a 54°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. As amplificações do gene *qnrB* foram realizadas com desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C seguidas de 35 ciclos, correspondendo cada ciclo de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 63°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. As amplificações do gene *qnrS* foram realizadas com desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C seguidas de 35 ciclos, correspondendo cada ciclo de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 64°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4.8. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *acrB*, *acrF*, *ramR*, *gyrA*, *gyrB* e *parC* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris; ácido bórico; EDTA e água MilliQ q.s.p.) e voltagem constante de 100 v. Foi utilizado um marcador de 100pb (Ludwig biotec) como padrão de peso molecular, visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta (UV) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação Photocap (Vilber Lourmat).

4.9. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciamento de DNA

Os produtos amplificados por PCR dos genes *qnrB*, *acrB*, *acrF*, *ramR*, *gyrA*, *gyrB* e *parC* de 6 isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2, K12-A2, K25-A2, K27-A2, K19-A2 e K3-C2), foram purificados através do kit PCR Purification (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System- Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, esses produtos foram quantificados em nano-drop e enviados ao Laboratório Central do CCB/UFPE- LABCEN para o sequenciamento de DNA, realizado através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977), utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas através do Software Chromas (<http://www.mybiosoftware.com/sequence->

analysis) e comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search tool). Para avaliar mutações nas regiões QRDRs dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e mutações em *ramR*, após o alinhamento no Blast, as sequências de nucleotídeos foram transformadas em sequências de aminoácidos pelo SMS (Sequence manipulation Suite - http://www.bioinformatics.org/sms2/trans_map.html) através da ferramenta Translation Map. As sequências foram depositadas no GenBank, com os seguintes números de acesso: KP144334; KP144337; KP144338 e KP271121.

4.10. Extração de RNA total

O RNA de 4 isolados selecionados de *K. pneumoniae* (K3-A2, K12-A2, K25-A2 e K27-A2), para análise da expressão das bombas de efluxo, foi extraído através do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi quantificado em nano-drop e armazenado em deep-freezer a -70°C no Aggeu Magalhães-CPqAM, Fiocruz-PE.

4.11. Condições da RT-PCR para os genes *acrB* e *acrF*

Para avaliar a expressão das bombas de efluxo, através da presença ou ausência dos transcritos *acrB* e *acrF*, foi realizado a RT-PCR qualitativa com RNA total extraído dos 4 isolados de *K. pneumoniae* selecionados (K3-A2, K12-A2, K25-A2 e K27-A2), através do Kit Access RT-PCR System (Promega), que foi projetado para uma transcrição reversa seguido de amplificações por PCR. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 50 µl por tubo, compreendendo: 2µl de RNA total a 50ng/µL, 5,0U da enzima *Tfl* DNA polimerase, 5,0U da enzima AMV Reverse transcriptase, 10 mM de dNTP, 25 mM de MgSO₄, tampão AMV/TFL 5X, 50 pmol dos primers e água livre de nuclease q.s.p. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem RNA, um controle positivo com primer e RNA fornecidos pelo próprio Kit e um controle negativo da transcrição sem a enzima AMV Reverse transcriptase. A síntese da primeira fita de DNA complementar foi realizada com um ciclo de 45°C por 45 minutos, um ciclo a 94°C por 2 minutos (transcrição reversa), a segunda fita de DNA complementar e as amplificações por PCR foram realizadas com 40 ciclos, correspondendo cada ciclo a 30

segundos a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 61°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, visualizados em trasiluminador de luz ultra-violeta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação.

4.12. Determinação das Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)

Antes da determinação das CIMs foi realizado o teste de controle de qualidade dos antimicrobianos com a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922, segundo as normas do CLSI (2014). A cepa foi semeada em BHI por 18h à 37°C, posteriormente foi preparado o inóculo em Caldo Müeller-Hinton Cátion ajustado (CAMHB) com uma suspensão padronizada a 0,5 na escala de turbidez de McFarland correspondente a 2×10^8 CFU/ml. O teste de controle de qualidade dos antimicrobianos foram determinados usando concentrações derivadas de diluições duplas seriadas em base 2 (0,00195; 0,0039; 0,0078; 0,0156; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 µg/ml) para o meropenem (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard- Sigma) e (0,0156; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 µg/mL) para a polimixina B (Eurofarma). O critério de interpretação do teste de controle de qualidade utilizado foi o proposto pelo CLSI (2014). 1 µl do inóculo ajustado da cepa de referência foi adicionada a 999 µl CAMHB estéril contendo o antimicrobiano a ser testado nas concentrações seriadas. Os inóculos bacterianos finais foram mantidos a 37° C por 18 horas e posteriormente foi realizada a leitura do teste de controle de qualidade dos antimicrobianos. Os CIMs de meropenem e polimixina B foram determinados para 4 isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2, K12-A2, K25-A2 e K27-A2), os isolados foram semeados em BHI por 18h à 37°C, o inóculo foi comparado e ajustado com a escala 0,5 de MacFarland, correspondente a 2×10^8 UFC/mL. Os CIMs foram determinados usando concentrações derivadas de diluições duplas seriadas em base 2 (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 µg/mL para o meropenem (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard-Sigma) e para a polimixina B (Eurofarma). O critério de sensibilidade e resistência utilizado foi o proposto pelo CLSI (2014). Foi adicionado 1 µl do inóculo bacteriano, anteriormente ajustado, a 999 µl de CAMHB estéril contendo o antimicrobiano testado nas concentrações seriadas. Os inóculos bacterianos finais foram mantidos a 37° C por 18 horas, posteriormente foi realizada a leitura das CIMs dos antimicrobianos testados para cada isolado.

4.13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise pela microscopia eletrônica de transmissão foram analisados dois isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2 e K12-A2) na presença de concentração clinicamente relevante (definida como a concentração necessária para atingir exposições do fármaco no plasma em adultos com função renal e hepática normal, concentração esta que se baseia nos “breakpoints”) para polimixina B (4µg/mL), meropenem (4µg/mL), e para a associação entre polimixina B e meropenem (4µg/mL + 4µg/mL). Em todos os processamentos foram incluídas um controle negativo do isolado nas mesmas condições, sem a presença de antibiótico. Todos os isolados foram inoculados em meio BHI por 6 horas a 37° C na presença ou ausência do antibiótico a ser analisado, conforme o protocolo do CLSI (2014). Os isolados foram fixados e processados, as culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,2-7,4 estéril e centrifugadas a 3500 rpm por 2 minutos para posterior fixação em Tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich) (Brayner *et al.*, 2005).

Após a fixação foram realizadas 3 lavagens em tampão fosfato 0,1M, pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 1 hora e posteriormente a contrastação em bloco utilizando acetato de uranila a 5% (Electron Microscopy Science). Posteriormente foram realizadas três lavagens, duas em tampão fosfato 0,1M e uma em água destilada de 10 minutos cada para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de acetona (Sigma Aldrich) a 30, 50, 70, 90 e três vezes a 100%, por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizada a infiltração do material para substituição da acetona por resina Epon 812 em séries crescentes e overnight de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e resina pura (Electron Microscopy Science). O material foi embocado, realizado cortes ultrafinos para contrastação com acetato de uranila 5% por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos (Electron Microscopy Science). Em seguida as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai Spirit G1 BioTwin G2-FEI Company) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas- NPT do CPqAM/FIOCRUZ.

4.14. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise pela microscopia eletrônica de varredura foram analisados dois isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2 e K12-A2) na presença de na presença de concentração

cl clinicamente relevante para a polimixina B (4µg/mL), meropenem (4µg/mL), e para a associação entre polimixina B (4µg/mL + 4µg/mL) e meropenem. Em todos os processamentos foram incluídas um controle negativo do isolado nas mesmas condições, sem a presença do antibiótico. Todos os isolados foram inoculados em meio BHI por 6 horas a 37° C na presença ou ausência do antibiótico a ser analisado, conforme o protocolo do CLSI (2014). Os isolados foram fixados e processados, as culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,2-7,4 estéril e centrifugadas a 3500 rpm por 2 minutos para posterior fixação em Tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich) (Brayner *et al.*, 2005). Após a fixação foram realizadas 3 lavagens em tampão fosfato 0,1M, a pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 1 hora (Sigma Aldrich). Posteriormente foram realizadas três lavagens, duas em tampão fosfato 0,1M e uma em água destilada de 10 minutos cada para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa (Sigma Aldrich). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em stubs metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi realizada a metalização cobrindo o material com uma fina camada de ouro e a visualização da superfície dos isolados bacterianos no microscópio eletrônico de varredura (ZEISS EVO LF-15) no Setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

4.15. Considerações Éticas

Os isolados de *K. pneumoniae* utilizados nesse estudo são amostras secundárias de outro projeto de pesquisa, já aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisas do Hospital Agamenom Magalhães (nº de Registro do Comitê-47, CAAE-0040.0.236.000.11) e atualmente fazem parte do estoque de culturas bacterianas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical, UFPE. Os isolados são amostras secundárias fornecidas pelas instituições, apenas com as informações de sítio de infecção e resultado do antibiograma realizado no laboratório de análises clínicas do hospital, não dispomos de nenhum contato ou dados de prontuários de pacientes, não havendo a possibilidade de identificação dos mesmos. Portanto, não existem implicações éticas.

Tabela 2: Primers utilizados na PCR e seqüenciamento de DNA para detecção dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *acrB*, *acrF*, *ramR*, *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.

Primer	Sequência (5' - 3')	temp. ^(a)	Referência	Gene
gyrA F	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	55°C	Brisse e Verhoef <i>et al.</i> (2001)	<i>gyrA</i>
gyrA R	ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG			
gyrB F	ATGGATAAAGAAGGCTACAGCA	65°C	Nam <i>et al.</i> (2013)	<i>gyrB</i>
gyrB R	TCGACGTCCGCATCGGTCAT			
parC F	ATGTACGTGATCATGGACAG	55°C	Nam <i>et al.</i> (2013)	<i>parC</i>
parC R	ATTCGGTGTAACGCATGGC			
acrB F	TCAAACCAGGTGTGCAGGTA	61°C	Bratu <i>et al.</i> (2009)	<i>acrB</i>
acrB R	TTAATACCCAGACCGGATGC			
acrU7	GAGCTGATTGACCAGG	61°C	Padilha <i>et al.</i> (2010)	<i>acrF</i>
acrL4	CTGATAAGACATCCCGGTCCA			
ramR F	CACGGTTCATATCCTGACCA	60°C	Bialek-Davenet <i>et al.</i> (2011)	<i>ramR</i>
ramR R	CCRTCACCTTAAACACGTC			
qnrAF	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	54°C	Robicsek <i>et al.</i> (2006)	<i>qnrA</i>
qnrAR	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
qnrB-For	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	63°C	Kim <i>et al.</i> (2009)	<i>qnrB</i>
qnrB-Rev	ATGAGCAACGATGCCTGGTA			
qnrSmF	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	64°C	Cattoir <i>et al.</i> (2007)	<i>qnrS</i>
qnrSmR	TCTAAACCGTTCGAGTTCGGCG			

^(a)Temp, temperatura de anelamento dos primers

5. RESULTADOS

5.1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os 30 isolados de *K. pneumoniae* analisados mostraram resistência a amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, cefepime, cefotaxima, e piperacilina/tazobactam, dentre esses, 96.7% (n=29) foram resistentes ao aztreonam e ceftazidima, 93.4% (n=28) ao trimetropim/sulfametoxazol, 73.3% (n=22) a cefoxitina e 63.3% (n=19) à gentamicina. Quanto às quinolonas testadas, os isolados demonstraram 100% de resistência a ciprofloxacina, 96.7% (n=29) de resistência ao ácido nalidíxico, 93.4% (n=28) de resistência a norfloxacin e 60% (n=18) de resistência a levofloxacina, como também altos níveis de resistência aos carbapenêmicos testados, sendo 100% (n=30) de resistência ao ertapenem, 80% (n=24) de resistência ao meropenem e 73.3% (n=22) de resistência ao imipenem. Os isolados de *K. pneumoniae* analisados foram mais susceptíveis a polimixina B e amicacina quando comparada aos demais antimicrobianos, apenas 6,7% (n=2) foram resistentes a amicacina e 10% (n=3) foram resistentes a polimixina B (tabela 3). Os isolados (K3-A2 e K12-A2) de *K. pneumoniae* analisados, tanto de colonização como de infecção mostraram o mesmo perfil de resistência incluindo resistência a polimixina B e ao meropenem sendo sensível apenas a amicacina e com resistência intermediária a levofloxacina. As CIMs com microdiluição em caldo para meropenem nos isolados avaliados confirmou a taxa de resistência encontrada quando comparado com o método de difusão em disco. Por outro lado, as CIMs para polimixina B com microdiluição em caldo se mostraram divergentes do método de difusão em meio sólido. O isolado K3-A2 considerado sensível no método de disco difusão, quando reavaliado pela microdiluição em caldo foi classificado como resistente a polimixina B (tabela 5).

5.2. Análise de mutação nas QRDRs dos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC*

As análises de mutações gênicas foram realizadas nos representantes (K3-A2, K12-A2, K25-A2 e K27-A2) com diferentes perfis clonais para excluir a possibilidade da análise em um mesmo clone. Os isolados foram analisados quanto a presença de mutações nas posições Ser83 e Asp87 para o gene *gyrA*, Ser80 e Glu84 para o gene *parC* e Ser359, Ser367 e Glu466 para o gene *gyrB*. Neste trabalho, dos 4 isolados analisados, dois (K25-A2 e K27-A2) apresentaram mutação em *gyrA* na posição Ser83 onde a troca de um

aminoácido originou a mudança de uma Serina para uma Leucina. A sequência mutada encontra-se depositada no GenBank com o número de acesso: KP 271120.

O isolado K25-A2, resistente às fluoroquinolonas, apresenta mutação na QRDR de *gyrA* e não apresentou nenhum dos genes *qnr* investigados. Por outro lado, o isolado K27-A2 apresenta o gene *qnrB* associado com uma mutação na QRDR de *gyrA*. Nenhuma mutação em *gyrB* e *parC* foram encontradas nas posições analisadas (tabela 4).

5.3. Presença e expressão de Bombas de efluxo *acrAB* e *acrEF* e análise de mutação do gene regulador *ramR*

A investigação de bombas de efluxo revelou a presença do gene *acrB* que codifica a bomba *acrAB*-TolC e a presença do gene *acrF* que codifica a bomba *acrEF*-TolC em todos os 30 isolados de *K. pneumoniae* analisados. Por RT-PCR foi confirmada a transcrição dos genes *acrB* e *acrF* nos 4 isolados selecionados, revelando a expressão de ambas as bombas investigadas.

Os isolados K3-A2 e K12-A2, que expressavam as duas bombas de efluxo, não apresentaram mutação em *gyrA*, porém apresentaram *qnrB1*. O isolado K25-A2, também com as duas bombas, mostrou mutação em *gyrA*, porém não carregava nenhum dos genes *qnr* testados e o isolado K27-A2, além das duas bombas, apresentou mutação em *gyrA* e presença de *qnrB* (tabela 4).

Na análise da sequência do regulador *ramR*, as mutações foram investigadas nas posições 58 G>C e 104 G>C de acordo com (BialeK-Davenet *et al.*, 2011) e nas posições 40 A>T, 122 C>T e 136 C>T de acordo com (Hentschke *et al.*, 2010). O isolado K3-A2 apresentou mutações nas posições 40 e 122, os outros 3 isolados analisados não apresentaram mutação em *ramR* nas posições avaliadas (tabela 4). A sequência mutada encontra-se depositada no GenBank com o seguinte número de acesso: KP730602.

5.4. Presença e variantes de genes *qnr*

Neste estudo, a análise de PCR mostrou que 73,3% (n=22) dos isolados apresentaram o gene *qnrB* (tabela 3), o sequenciamento revelou a presença da variante *qnrB1* em 2 dos isolados e a presença do gene *qnrB12* em outros 2 isolados (tabela 4). Os isolados K3-A2 e K12-A2 apresentaram ambos os genes *qnrB1* e *bla_{KPC-2}*, os isolados

K19-A2 e K3-C2 apresentaram os genes *qnrB12* e *bla_{KPC-2}*. Não foram encontrados *qnrA* e *qnrS* nos isolados de *K. pneumoniae* analisados.

5.5 Análises ultraestruturais e morfológicas

As células controle dos 2 isolados de *K. pneumoniae* (K3-A2 e K12-A2), analisadas pela MET sem adição de antimicrobianos, apresentaram morfologia conservada com parede celular íntegra e conteúdo citoplasmático de aspecto eletrodense, sendo possível observar a presença de ribossomos e material genético distribuídos pelo citoplasma bacteriano, (figuras 8A e 9A). A análise das células controles pela MEV demonstrou morfologia bacteriana conservada em formato de bastão, número expressivo de células e comprimento celular compreendido entre 1 a 5µm (figuras 10A e 11A).

Isolado K3-A2

O isolado K3-A2 mesmo apresentando o gene *bla_{KPC}*, bombas de efluxo, mutação em *ramR* e resistência a meropenem e polimixina B, demonstrou alterações celulares ultraestruturais comparados com as células controle, quando submetido a estes antimicrobianos sozinhos ou associados.

A análise da MET mostrou que as células do isolado K3-A2 submetidas ao meropenem apresentaram inúmeras alterações morfológicas, aumento do espaço periplasmático com maior visualização nas extremidades das células sugerindo retrações citoplasmáticas (figura 8B). Foram observados pequenos compartimentos citoplasmáticos e desorganização estrutural na membrana citoplasmática e parede celular sem a manutenção da forma normal das células bacterianas (figura 8C). As alterações morfológicas foram reproduzidas também na análise pela MEV, na qual foram verificados (figura 10B) diferentes formatos nas células do isolado K3-A2, apresentando-se ovais, esféricas, com formas aberrantes ou formas indefinidas.

Pela MET, as células bacterianas do isolado K3-A2 submetidas a polimixina B apresentaram condensação dos ribossomos e coagulação do DNA (figura 8D). Não foram observadas alterações morfológicas pela MET, pois a membrana citoplasmática e a parede celular encontram-se íntegras, porém pode-se visualizar o espessamento da parede celular (figura 8E). Através da MEV foi possível avaliar que as células do isolado K3-A2

mantiveram sua morfologia, porém 4µg/mL de polimixina B foi capaz de reduzir grande parte do número de células viáveis (figura 10C).

A análise da MET também mostrou que as células do isolado K3-A2 quando submetidas à associação de polimixina B e meropenem apresentaram danos celulares mais intensos do que quando os antimicrobianos eram utilizados separadamente apresentando espessamento da parede celular, coagulação do DNA, rompimento da membrana citoplasmática e parede celular com perda de material citoplasmático (figuras 8F-G). De acordo com a MEV, as células submetidas a associação de polimixina B e meropenem não apresentaram alterações morfológicas, porém podem ser observadas algumas células rompidas com extravasamento do conteúdo citoplasmático e com o número de células reduzido (figura 10D).

Isolado K12-A2

O isolado K12-A2 mesmo apresentando o gene *bla_{KPC}*, bomba de efluxo, resistência a polimixina B e ao meropenem, demonstrou alterações celulares ultraestruturais comparados com as células controle, quando submetido a estes antimicrobianos sozinhos ou associados.

Através da análise da MET as células submetidas a meropenem apresentaram rompimento de membrana e parede celular com perda de material citoplasmático, (figuras 9B e D). Presença de grandes espaços eletróluscentes, em destaque compartimento celular membranar sem material citoplasmático e a presença de célula fantasma (figura 9C). Mostrando através da MET que o isolado K12-A2 sofreu mais alterações com o meropenem do que o isolado K3-A2. A análise pela MEV revelou que as células bacterianas do isolado K12-A2 submetidas a meropenem não apresentaram alterações morfológicas (figura 11B). Foi possível observar pela MET que as células bacterianas do isolado K12-A2 submetidas a polimixina B apresentaram-se alongadas, com vários restos membranares em toda sua extensão devido a ação da polimixina B, o que acarretou a desorganização e destruição da membrana citoplasmática celular (figura 9E-G). A análise da MET revelou retrações citoplasmáticas, com compartimento celular membranar contendo material citoplasmático localizado entre a membrana e a parede celular (figura 9E). Espessamento da parede celular, assim como rompimento da membrana

citoplasmática e parede celular com perda de material citoplasmático podem ser visualizados na figura 9F.

De um modo geral, o isolado K12-A2 apresentou alterações mais severas quando submetido ao meropenem do que quando submetido a polimixina B. A análise da MEV mostrou células alongadas quando submetidas a polimixina B (figura 11C), o que também foi visualizado na análise da MET.

A análise da MET mostrou que as células do isolado K12-A2 submetidas a associação de polimixina B e meropenem apresentaram danos celulares mais intensos do que quando os antimicrobianos eram utilizados separadamente. Foram observados rompimento da membrana citoplasmática e parede celular com perda de material citoplasmático, espessamento da parede celular, condensação dos ribossomos, coagulação do DNA e irregularidades na parede celular (figuras 9H-I). Através da MEV pode-se observar que as células do isolado K12-A2 submetidas a associação de polimixina B e meropenem, aparentemente, não apresentaram alterações morfológicas, porém a associação 4µg/mL+4µg/mL de meropenem e polimixina B foi capaz de reduzir a maior parte do número de células viáveis (figura 11D).

6. DISCUSSÃO

6.1 Ocorrência de genes *qnrB1*, *qnrB12*, mutação em *gyrA* e *ramR*, e expressão de bombas de efluxo em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores de *bla*_{KPC-2}.

Desde a introdução das fluoroquinolonas, a resistência a estes agentes na família Enterobacteriaceae tornou-se comum e difundido. Infecções nosocomiais por *K. pneumoniae* são frequentemente tratados com cefalosporinas de espectro estendido, carbapenêmicos e fluoroquinolonas. No entanto, os mecanismos de resistência tais como genes *qnr* e carbapanemases foram promovendo graves problemas terapêuticos (Seyedpour *et al.*, 2014).

Genes *qnr* foram identificados principalmente em isolados clínicos de Enterobacteriaceae, incluindo *K. pneumoniae*, e têm sido mostrados por desempenhar não só um papel importante na resistência às quinolonas, mas também na resistência a outros antibióticos, particularmente β -lactâmicos e aminoglicosídeos (Seyedpour *et al.*, 2014).

O perfil de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* deste estudo sugerem que os altos níveis de resistência as quinolonas e os carbapenêmicos estão relacionados com a junção de mais de um mecanismo de resistência o que pode ser justificado neste estudo pela presença de *bla*_{KPC-2}, genes *qnrB* e bombas de efluxo e pode ser bem representado pelos isolados K3-A2, K12-A2, K19-A2 e K3-C2.

Os dados desse estudo revelam a presença de *bla*_{KPC-2} e *qnrB1*, como também *bla*_{KPC-2} e *qnrB12* em isolados de *K. pneumoniae*, até a presente data não existem relatos publicados no Brasil sobre a presença de *bla*_{KPC-2} com *qnrB1* ou com *qnrB12*. Outros estudos demonstraram a presença de genes *qnr* juntamente com outras β -lactamases. Ferjane *et al.*, (2014), na Tunísia, detectaram *qnrB1* associado com *bla*_{CTX-M-15} ou *bla*_{SHV-12}. Na França, Fillipa *et al.*, (2014) encontraram *qnrB1* junto com *bla*_{CTX-M-15}. No Brasil, Viana *et al.*, (2013) relataram a associação de *qnrB1* com *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11}, ou *bla*_{OXA-18/45-like}. Em outros países também já existem alguns relatos de associação de *qnr* e *bla*_{KPC}. Chmelnitsky *et al.*, (2008), descreveram pela primeira vez, em Israel, a presença de *bla*_{KPC-2} e *qnrB2* em um mesmo plasmídeo de isolado de *E. cloacae*. Na China, Jiang *et al.*, (2010) e Zhang *et al.*, (2012), relatam, respectivamente, a presença de *bla*_{KPC-2} e *qnrB4*, e *bla*_{KPC-2} e *qnrB2*, em isolados de *K. pneumoniae*.

Os isolados K19-A2 e K3-C2 apresentaram o gene *qnrB12*, sendo o primeiro relato desse gene em *K. pneumoniae*. O gene *qnrB12* tinha sido descrito anteriormente apenas em *Citrobacter werkmanii*, na Alemanha (Kehrenberg *et al.*, 2008) e em *Citrobacter*

youngae, na Filândia (Gunell *et al.*, 2009). Esse estudo demonstra a emergência desse gene em isolados de *K. pneumoniae* produtores de *bla*_{KPC-2} no Brasil. Deve-se ressaltar que em *Citrobacter* spp., *qnrB12* parece ser um gene cromossômico, enquanto que a maioria dos genes *qnr* são plasmidiais nas enterobactérias, poucos são os relatos que sugerem uma localização cromossomal (Kehrenberg *et al.*, 2008). Kehrenberg *et al.*, (2008) sugerem que um plasmídeo que alberga o gene *qnrB12*, similar ao plasmídeo pTN60012 de *K. pneumoniae*, pode ter sido integrado ao DNA cromossomal de *C. werkmanii*.

No presente trabalho o *qnrB* foi o gene PMRQ mais comumente encontrado nos isolados de *K. pneumoniae* em Recife-PE, Brasil, não sendo detectado a presença dos genes *qnrA* e *qnrS*. Poucos são os relatos da detecção do gene *qnrA* no Brasil, sendo o primeiro relato em Minas Gerais, em isolados de *Enterobacter cloacae* (Minarini *et al.*, 2007). Castanheira *et al.*, (2007), relataram *qnrA1* em isolados nosocomiais de *E. coli*. (Yang *et al.*, 2014; Viana *et al.*, 2013).

Estudos mostram uma alta prevalência de genes *qnr* encontrados em enterobactérias provenientes de fezes de crianças saudáveis na América do Sul (Peru e Bolívia), onde 54% continham *qnrB* (Pallecchi *et al.*, 2009; Gunnel *et al.*, 2009). No Brasil, Veras *et al.*, (2011), detectaram o gene *bla*_{SHV} em isolados de *K. pneumoniae* provenientes da microbiota entérica de crianças saudáveis em Recife-PE. Esses estudos mostram a importância das bactérias comensais como portadores de genes de resistência a antimicrobianos.

No presente estudo, 80% dos isolados (n=24) resistentes a quinolonas e portadores de *bla*_{KPC} são amostras de colonização, podendo servir como fonte de infecção clínica ou como uma importante reserva para disseminação de *bla*_{KPC-2} e *qnrB* no ambiente hospitalar. Os isolados de colonização podem disseminar *bla*_{KPC-2} e *qnrB* entre outros organismos da mesma espécie ou de espécies bacterianas diferentes no mesmo paciente, já que o gene *bla*_{KPC} pode ser transmitido por plasmídeos de uma cepa para outra (Mathers *et al.*, 2011). Consequentemente, uma vigilância ativa da disseminação de *K. pneumoniae* portadoras de *bla*_{KPC} e outras Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos (CRE) tem se tornado parte integrante de programas projetados para controlar a propagação de CRE em vários hospitais (Bilavsky *et al.*, 2010; Schwaber *et al.*, 2011; Schechner *et al.*, 2012; Borer *et al.*, 2012; Feldman *et al.*, 2013).

Papadimitriou-Olivgeris *et al.* (2014), relataram que a alta prevalência de *K. pneumoniae* entérica portadoras de *bla*_{KPC} resistentes a colistina ou tigeciclina em

pacientes de UTI indicam que a disseminação é devido à sua transferência de paciente para paciente via profissional, como também indica a importância de rigorosos protocolos de controle de infecção hospitalar.

Os isolados K19-A2 e K25-A2, também investigados em outro estudo com relação à virulência (Melo *et al.*, 2014), apresentaram os genes de virulência *fimH* e *mrkD* (adesinas fimbriais), e o K25-A2 além desses genes apresentou também o gene *irp2* (sideróforo yersiniabactina). Esses achados ressaltam a gravidade e relevância do fato de que isolados de colonização além de possuírem bombas de efluxo (AcrAB e AcrEF), presença dos genes de resistência (*qnrB* e *bla_{KPC-2}*) e mutações em *gyrA*, que levam a resistência a quinolonas e a outros antimicrobianos, possuem também genes de virulência importantes para o estabelecimento da infecção.

No presente trabalho não foram detectadas mutações nas QRDRs de *gyrB* e *parC*, esses achados corroboram com Paiva *et al.*, (2012) que também não detectaram nenhuma mutação em *gyrB*. De acordo com Kim *et al.*, (2009) e Nam *et al.*, (2013) as mutações em *gyrB* e *parE* são substancialmente menos frequentemente detectadas e conferem menores níveis de resistência quando comparados com *gyrA* e *parC*. Nesse trabalho, foi detectada uma mutação em *gyrA* (S83L) em dois isolados de *K. pneumoniae*. Machuca *et al.*, (2014) demonstraram que uma única substituição em *gyrA* aumenta os valores das CIMs para as fluoroquinolonas em até 16 vezes, fato este que pode explicar a resistência a fluoroquinolona, mesmo sem a presença do gene *qnr* no isolado K25-A2. Interações entre mutações em QRDRs e *qnr* podem resultar em maior nível de resistência a fluoroquinolonas. O gene *qnr* sozinho confere resistência de baixo nível às quinolonas, sua principal contribuição é facilitar o desenvolvimento de mutações em QRDRs (Wu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Machuca *et al.*, (2014) observaram que a presença de qualquer gene *qnr* aumenta os níveis das CIMs em todos os genótipos de *E. coli* e que combinações de apenas um mecanismo cromossômico, como mutações em QRDRs, com genes *qnr* aumentam os valores das CIMs de 4 a 32 vezes e de 32 a 128 vezes maiores do que o equivalente genético sem o gene *qnr*.

Superexpressão de bombas de efluxo pode também desempenhar um elevado papel no nível de resistência. Acredita-se que os sistemas de efluxos sozinhos produzem baixos níveis de resistência a diferentes classes de antimicrobianos incluindo quinolonas, cloranfenicol e β -lactâmicos (Biaek-Davenet *et al.*, 2011), tornando-se clinicamente relevante quando combinados com mutações em enzimas alvos ou alterações de membrana

(Guan *et al.*, 2013). No presente estudo, detectamos que 73,3% (n=22) dos isolados apresentavam além de bombas de efluxos os genes *qnrB*. Também foi detectado que o isolado K3-A2 apresentou mutação em *ramR* o que pode levar uma superexpressão da bomba de efluxo AcrAB. A localização das mutações na sequência de *ramR* detectada nesse trabalho corroboram tanto com Hentschke *et al.*, (2010), como com Biaeck-Davenet *et al.*, (2011), apresentando mutações nos locais descritos em ambos os trabalhos. Mutações pontuais ocorrem em diferentes posições e essas mudanças genéticas são distribuídas ao longo do gene *ramR* que mais adiante pode acarretar na modificação do aminoácido, um “stop códon” prematuro ou a síntese truncada da proteína RamR (Biaeck-Davenet *et al.*, 2011).

Hentschke *et al.*, (2010), encontraram mutações pontuais no gene *ramR* em 8 de 17 mutantes e essas mutações mostraram ser responsáveis pela superexpressão de ambos os genes *ramA* e *acrB*. Biaeck-Davenet *et al.*, (2011) relatam que o gene *ramR* controla a expressão do sistema de efluxo em *K. pneumoniae*, entretanto, a localização das mutações na sequência encontradas no seu trabalho foram diferentes das descritas por Hentschke *et al.* (2010).

O sistema de efluxo AcrEF, também detectada em todos os isolados de *K. pneumoniae* analisados neste estudo, pode conferir uma vantagem para os organismos, pois AcrEF pode ser necessária para a resistência aos medicamentos quando AcrAB não funciona. Outras investigações da regulação dos sistemas de efluxo multidrogas são necessários para elucidar o significado biológico de suas redes reguladoras (Nishino; Hayashi-Nishino; Yamaguchi, 2009).

O isolado de colonização K3-A2 além de ser portador do gene *bla*_{KPC-2}, apresentou também o gene *qnrB1*, expressão de ambas bombas de efluxo analisadas e mutação em *ramR*, o que pode acarretar em superexpressão da bomba de efluxo AcrAB adicionalmente, todos os outros isolados apresentaram pelo menos um mecanismo de resistência a quinolona associado com *bla*_{KPC-2}, o que já pode causar falha na terapêutica.

O presente estudo revela pacientes colonizados com *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2}, *qnrB*, mutação em *gyrA*, expressão de bombas de efluxo e mutação em *ramR*. Pacientes colonizados normalmente necessitam de cuidados médicos em longo prazo, podendo desempenhar um importante papel na disseminação desses patógenos extremamente resistentes. A alta prevalência destes isolados em pacientes de UTI e mortalidades significativas associadas com a infecção de *K. pneumoniae* portadores do

gene *bla*_{KPC} demonstram a importância da identificação, isolamento e tratamento precoce destes pacientes (Lin *et al.*, 2013; Papadimitriou-Olivgeris *et al.*, 2013).

Foi observado nesse estudo a emergência de diferentes mecanismos de resistência as quinolonas em isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2} provenientes de colonização e infecção de pacientes hospitalizados em Recife-PE, Brasil. Esses achados ressaltam a necessidade de estudos sistemáticos que visem o maior entendimento destes mecanismos na resistência e virulência destas bactérias, para que não ocorram disseminação destas associações, e que intervenções de controle de infecção sejam adotadas precocemente, interrompendo a propagação destes mecanismos de resistência e aumentando a sobrevida dos pacientes.

6.2 Alterações ultraestruturais provocadas por polimixina B e meropenem em isolados multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2} e bombas de efluxo.

Existe cada vez mais preocupação de que os resultados de testes de susceptibilidade disponíveis comercialmente para *K. pneumoniae* produtora de KPC possam indicar falsa susceptibilidade para alguns antimicrobianos, embora com frequência ainda desconhecida (Lat *et al.*, 2011). Sabe-se que a pobre difusão das polimixinas em ágar resulta em resultados imprecisos pelo método de difusão em disco (Landman *et al.*, 2013). No presente estudo, as CIMs com microdiluição em caldo foram determinados para ambos os isolados analisados, que apresentaram resistência a polimixina B e meropenem, e apresentaram discordância quando comparados com o teste de difusão em disco. O tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC é muitas vezes dependente dos resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiano previsto pelos laboratórios de microbiologia clínica. Portanto, é indispensável elucidar a precisão dos métodos comumente usados para testar a susceptibilidade (Lat *et al.*, 2011).

Gales *et al.* (2006), identificaram pobres concordâncias de resultados de CIMs obtidos por Etest para polimixinas e os CIMs de microdiluição em caldo para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. O método de referência (microdiluição em caldo) constatou que 15% dos isolados eram resistentes à polimixina B, enquanto que 37% eram resistentes a este agente quando testados por Etest. Este fenômeno pode ser devido a pobre difusão das grandes moléculas de polimixina em ágar.

Este fato pode ter implicações terapêuticas significativas na prática clínica, pois a polimixina B pode ser classificada como inativa, deixando ainda menos opções de tratamento disponíveis (Lat *et al.*, 2011).

Este é o primeiro estudo sobre as alterações ultraestruturais provocadas por polimixina B, meropenem e pela associação entre polimixina B e meropenem em isolados multirresistentes de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*. Neste estudo foi observado que os dois isolados analisados apresentaram comportamentos diferenciados quando submetidos aos antimicrobianos. A MET mostrou que o isolado K12-A2 sofreu muito mais alterações com meropenem do que o isolado K3-A2, o que pode ser explicado pelo CIM de apenas 8 µg/ml para o isolado K12-A2. No entanto, o isolado K3-A2 também apresentou alterações morfológicas quando submetidas ao meropenem, mesmo apresentando uma maior CIM para o meropenem (128 µg/ml). Provavelmente a ação do meropenem nestes isolados foram em PBPs distintas.

Os β-lactâmicos exercem atividade bactericida por ligação covalente e por inativação das PBPs, resultando em interferência com a síntese e remodelação do peptidoglicano bacteriano o que promove diferentes alterações morfológicas (Tang *et al.*, 2014). Algumas PBPs de bactérias gram-negativas são responsáveis pela síntese do peptidoglicano, outras são necessárias para a manutenção da forma de bastonetes da bactéria, ou para a formação de septos durante a divisão bacteriana.

Cada PBP tem um papel específico na proliferação e na manutenção da morfologia bacteriana, onde o bloqueio da PBP-1 leva a rápida lise bacteriana, da PBP-2 a formação de células esféricas e da PBP-3 a formação de longos filamentos, cusados pela incapacidade de formação de septos de divisão após a duplicação da massa celular bacteriana (Buijs *et al.*, 2008). A eficiência dos carbapenêmicos deve-se a elevada afinidade pela PBP-2 (Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007). Podemos observar que o isolado K3-A2 apresentou formação de células esféricas com a ação do meropenem, provavelmente pelo boqueio da PBP-2, o que não foi observado no isolado K12-A2. Por outro lado, este último isolado apresentou alterações mais intensas, com destaque de compartimento celular membrinado sem material citoplasmático, rompimento de membrana e parede celular com perda de material citoplasmático presença de célula fantasma, provavelmente pela ação na PBP-1.

Isolados produtores de carbapenemases tornaram-se um problema significativo em termos de saúde pública e evolução clínica, devido frequentemente serem capazes de

hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, azetreonam como também os carbapenêmicos, tornando o tratamento clínico um desafio para os médicos (Tumbarello *et al.*, 2012).

As alterações celulares ultraestruturais foram diferentes nos isolados frente a polimixina B e o meropenem, o que era esperado, já que as polimixinas têm como alvo as membranas celulares (Olaitan *et al.*, 2014) e os carbapenêmicos a parede celular (Tang *et al.*, 2014). O isolado K12-A2, proveniente de infecção, apresentou maiores alterações ultraestruturais quando comparado com o isolado K3-A2, de colonização, tanto frente ao meropenem quanto a polimixina B. Este resultado pode ser devido ao fato de que isolado K3-A2 apresentou mutação em *ramR* o que pode levar a superexpressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC neste isolado, tornando-o mais resistente.

O gene *ramR* é um repressor transcricional negativo do gene *ramA*, sendo esse último um regulador positivo do sistema de efluxo AcrAB, ou seja, controla aumentando a expressão de *acrAB* (Bialek-Davenet *et al.*, 2011). A superexpressão de *ramA* parece ser a causa da super expressão de AcrAB em *K.pneumoniae* e *E. cloacae*, mas bases moleculares da “upregulation” não podem ser definidas nessas espécies (Hentschke *et al.*, 2010). Depleção ou mutação em *ramR* tem implicado na ativação de RamA, promovendo a super expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC (Bratu *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2014) sugerindo que o isolado K3-A2 pode expulsar com maior eficiência os antimicrobianos utilizados e sofrer menores danos ultraestruturais.

Neste estudo o isolado K12-A2 apresentou filamentação quando submetido a polimixina B o que pode indicar que AcrEF perdeu sua função e não manteve a divisão celular normal.

AcrEF é um outro transportador conhecido para conferir um fenótipo de resistência a múltiplas drogas em células deficientes em AcrAB e complementar funcionalmente AcrAB-TolC. Sistemas de efluxo desempenham um papel altamente relevante na defesa bacteriana contra agentes antimicrobianos e compostos tóxicos, diminuindo acumulação intracelular de drogas (Kehrenberg *et al.*, 2014).

Lau *et al.* (2005) sugerem que a filamentação celular é provocada pela perda da função de AcrEF e que desempenha um papel importante na manutenção normal da divisão celular). Lau *et al.*, (2005) demonstraram que a expressão aumentada de AcrA, é tóxico apenas em células sem o transportador de efluxo multidrogas AcrEF, ou seja, células deficientes de AcrEF com aumento da expressão de AcrA tem um grave defeito na divisão celular o que resulta em filamentação da célula. Defeitos semelhantes foram

obtidos em células com falta de TolC, que atua com AcrEF, sugerindo que filamentação celular é causada pela perda da função de AcrEF.

No estudo de Rajeshwari *et al.* (2009), ocorreu a formação de filamentos bacterianos em isolados de *K. pneumoniae* resistentes, mostrando que o estresse provocado pela cefotaxima provocaram alongamento, deformação das células bacterianas e superfície rugosa.

O isolado K12-A2 também apresentou maiores danos quando submetidos a polimixina B, mesmo apresentando maior CIM do que K3-A2, com rompimentos na membrana celular e perda de material citoplasmático. Este evento deve-se ação da polimixina B, a qual possui uma cauda hidrofóbica longa, que rompe a estrutura da membrana celular bacteriana por interação com os seus fosfolípidos e lipopolisacarídeos, com ação semelhante a detergentes catiônicos simples deslocando competitivamente os íons Ca^{++} e Mg^{++} que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma, levando à perda do conteúdo celular e ocasionando morte da bactéria (Mendes *et al.*, 2009).

O espessamento da parede celular e a condensação dos ribossomos em bactérias indica a presença de mecanismos de defesa para manter a pressão osmótica após ação dos antimicrobianos e as bactérias produzem mais peptidoglicano para se protegerem (Santhana, 2007), o que foi encontrado nos isolados K3-A2 quando submetido a polimixina B e no isolado K12-A2 quando submetido a associação de Polimixina B e Meropenem. Estes isolados além do espessamento da parede celular e a condensação dos ribossomos apresentaram coagulação do DNA.

O termo DNA coagulado significa que a função da DNA girase parou de funcionar e ela ficaria impedida de cumprir sua função durante a replicação do DNA (Romano *et al.*, 2013 e Dimech *et al.*, 2013). O isolado K3-A2 quando submetido a associação de polimixina B e meropenem também apresentou DNA coagulado.

Novas terapias combinadas para tratamento de isolados multirresistentes tem sido avaliadas. O estudo de Bulik *et al.* (2011), avaliaram a eficiência da combinação de ertapenem e doripenem em modelo *in vitro* e *in vivo* em camundongos, demonstrando que a combinação destes antimicrobianos teve eficácia aumentada quando comparado aos agentes isolados. Hirsh *et al.* (2013) demonstrou a ação *in vivo* e *in vitro* da combinação de antimicrobianos β -lactâmicos e aminoglicosídeos em isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes (MDR), objetivando identificar novas opções terapêuticas para

tratamento de infecções por esta espécie bacteriana. Hirsh *et al.* (2013), demonstrou experimentalmente que a combinação de meropenem e amicacina pode ser bem sucedida.

A polimixina B é um antimicrobiano peptídeo policatiônico que atualmente funciona como último recurso para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas multirresistentes, incluindo *K. pneumoniae* portadora do gene *bla_{KPC}*. A reintrodução de polimixina B na terapia antimicrobiana tem sido seguida por um aumento dos relatos de resistência entre bactérias gram-negativas (Olaitan *et al.*, 2014).

No presente estudo foi avaliado as alterações ultraestruturais provocadas por antimicrobianos usados na terapia para Enterobacteriaceae portadoras do gene *bla_{KPC}* com a combinação entre polimixina B e meropenem, demonstrando que esse associação tem eficácia aumentada quando comparada com os antimicrobianos separadamente. Porém, as ações dos antimicrobianos isoladamente também demonstraram danos ultraestruturais nos isolados analisados. Este é o primeiro estudo que investigou e comparou as alterações ultraestruturais provocadas por polimixina B, meropenem e pela associação entre polimixina B e meropenem em isolados multirresistentes de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*. É importante destacar que mesmo os isolados de *K. pneumoniae* analisados sendo multirresistentes, portadores de gene *bla_{KPC-2}* e bombas de efluxo, sofreram alterações estruturais relevantes com a ação da polimixina B e meropenem.

Tabela 3: Origem, presença dos genes *qnrB*, *acrB*, *acrF*, perfil da ERIC-PCR e perfil de resistência dos isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* do Recife-Brasil.

Identificação dos Isolados ^(a)	Origem	<i>qnrB</i>	<i>acrB</i>	<i>acrF</i>	ERIC ^(b)	Perfil de Resistência ^(c)
K3-A2	Swab retal	+	+	+	5E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, POL, SUT
K8-A2	Swab retal	+	+	+	9E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT,SUT
K9-A2	Swab retal	+	+	+	9E	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO(I), CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, PIT, SUT
K10-A2	Urina	+	+	+	9E	AMC,AMO, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL(I), ERT,GEN, IMP, MPM,
K12-A2	Urina	+	+	+	9E	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, POL, SUT
K14-A2	Swab retal	+	+	+	12E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT,SUT
K15-A2	Swab retal	+	+	+	13E	AMC,AMO, CAZ(I), CFO(I), CPM,CTX, CIP, ERT,GEN, IMP, PIT
K16-A2	Swab retal	+	+	+	13E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO(I), CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT,SUT
K17-A2	Swab retal	+	+	+	13E	AMC,AMO, ATM, AMI(I), CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K18-A2	Swab retal	+	+	+	39E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO(I), CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K19-A2	Swab retal	+	+	+	14E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT,SUT
K20-A2	Swab retal	+	+	+	15E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM, PIT,SUT
K21-A2	Swab retal	+	+	+	5E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT,SUT
K24-A2	Swab retal	+	+	+	17E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR (I), ERT, IMP, MPM, PIT
K25-A2	Swab retal	-	+	+	18E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, MPM, PIT,SUT
K26-A2	Secr. Traqueal	-	+	+	18E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO(int),CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, PIT,SUT
K27-A2	Swab retal	+	+	+	19E	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, PIT, SUT
K29-A2	Swab retal	-	+	+	19E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM, PIT,SUT
K30-A2	Swab retal	+	+	+	40E	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP(I), PIT,SUT
K31-A2	Urina	-	+	+	20E	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO(I), CPM, CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP(I), PIT,SUT
K32-A2	Swab retal	-	+	+	19E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM, PIT,SUT
K33-A2	Swab retal	+	+	+	19E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM, PIT,SUT
K34-A2	Swab retal	+	+	+	21E	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT,SUT
K1-C2	Swab retal	+	+	+	23E	AMC, AMI(I), AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM, CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K2-C2	Swab retal	+	+	+	23E	AMC, AMI(I), AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM, CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT

SCAVUZZI, AML. Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação

K3-C2	Swab retal	+	+	+	41E	AMC, AMI, AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K1-OC	Swab retal	+	+	+	25E	AMC, AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, ERT,GEN, IMP, LEV(I), MPM, NAL, NOR, PIT, SUT
K3-OC	Swab retal	-	+	+	27E	AMC, AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, ERT, IMP, LEV, MPM, NAL, NOR, PIT, SUT
K5-OC	Urina	-	+	+	42E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO(I), CPM,CTX, CIP, ERT, IMP(I), LEV, NAL, NOR, PIT, SUT
K6-OC	Secr. Traqueal	-	+	+	43E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, ERT, IMP(I), LEV, MPM, NAL, NOR, PIT, SUT

Legenda: ^(a): K: *K. pneumoniae*; A2, C2 e OC: hospital público; **ERIC**^(b): PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias -Melo *et al.*, (2014); (*) : amoxicilina-clavulanato (AMC); amoxicilina (AMO); amicacina (AMI); aztreonam (ATM); ceftazidima (CAZ); cefoxitina (CFO); cefotaxima (CTX); cefepime (CPM); piperaciclina/tazobactam (PIT); polimixina B (POL); trimetropim/sulfametoxazol (SUT); gentamicina (GEN). ciprofloxacina (CIP); norfloxacina (NOR); ácido nalidíxico (NAL); levofloxacina (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) e ertapenem (ERT). *Melo *et al.*, (2014).

Tabela 4: Características dos isolados selecionados.

Identificação do Isolado ^(a)	Fonte de isolamento	Substituição em <i>gyrA</i>	<i>acrB</i>	<i>acrF</i>	Mutação em <i>ramR</i>	PMQR Genes ^(b)	Genes de Virulência ^(c)	ERIC ^(d)	PERFIL DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS E CARBAPENÊMICOS ^(e)
K3-A2	Swab retal	-	+	+	40 A>T 122 C>T	<i>qnrB1</i>	-	5E	CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT, IMP, MPM
K12-A2	Urina	-	+	+	-	<i>qnrB1</i>	ND	9E	CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT, IMP, MPM
K19-A2	Swab retal	ND	+	+	ND	<i>qnrB12</i>	<i>fimH, mrkD</i>	14E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM
K25-A2	Swab retal	S(83)L	+	+	-	-	<i>fimH, mrkD, irp2</i>	18E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, MPM
K27-A2	Swab retal	S(83)L	+	+	-	<i>qnrB</i>	ND	19E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT
K3-C2	Swab retal	ND	+	+	ND	<i>qnrB12</i>	ND	41E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM

Legenda: Identificação dos Isolados ^(a): K: *K. pneumoniae*; A2 e C2: hospital público; **(b): PMQR** plasmídeos de resistência a quinolonas; **(c):** Melo *et al.*, (2014); **(d): ERIC:** PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias -Melo *et al.*, (2014); ND: não determinado; **(*):** ciprofloxacina (CIP); norfloxacina (NOR); ácido nalidíxico (NAL); levofloxacina (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) e ertapenem (ERT); I: susceptibilidade intermediária.

Tabela 5: Origem, presença e expressão dos genes *acrB*, *acrF*, mutação em *ramR*, perfil da ERIC-PCR e perfil de resistência pelo método de difusão em disco dos isolados hospitalares selecionados de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* do Recife-Brasil.

Identificação dos Isolados ^(a)	Origem	<i>acrB</i> *	<i>acrF</i> *	RT de <i>acrB</i> e <i>acrF</i> *	Mutação em <i>ramR</i> *	ERIC ^(b)	Meropenem (µg/mL) CIM	Polimixina B (µg/mL) CIM	Perfil de Resistência pelo método de difusão em disco(**)
K3-A2	Swab retal	+	+	+	+	5E	128	16	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K12-A2	Urina	+	+	+	-	9E	8	128	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(I), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, POL, SUT

Legenda: Identificação dos Isolados ^(a): K: *K. pneumoniae*; A2: hospital público; ^(*)Scavuzzi *et al.*, 2015; **ERIC** ^(b): PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias-Melo *et al.*, (2014); **(**)**: amoxicilina-clavulanato (AMC); amoxicilina (AMO); amicacina (AMI); aztreonam (ATM); ceftazidima (CAZ); cefoxitina (CFO); cefotaxima (CTX); cefepime (CPM); piperaciclina/tazobactam (PIT); polimixina B (POL); trimetropim/sulfametoxazol (SUT); gentamicina (GEN). ciprofloxacina (CIP); norfloxacina (NOR); ácido nalidíxico (NAL); levofloxacina (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) e ertapenem (ERT).

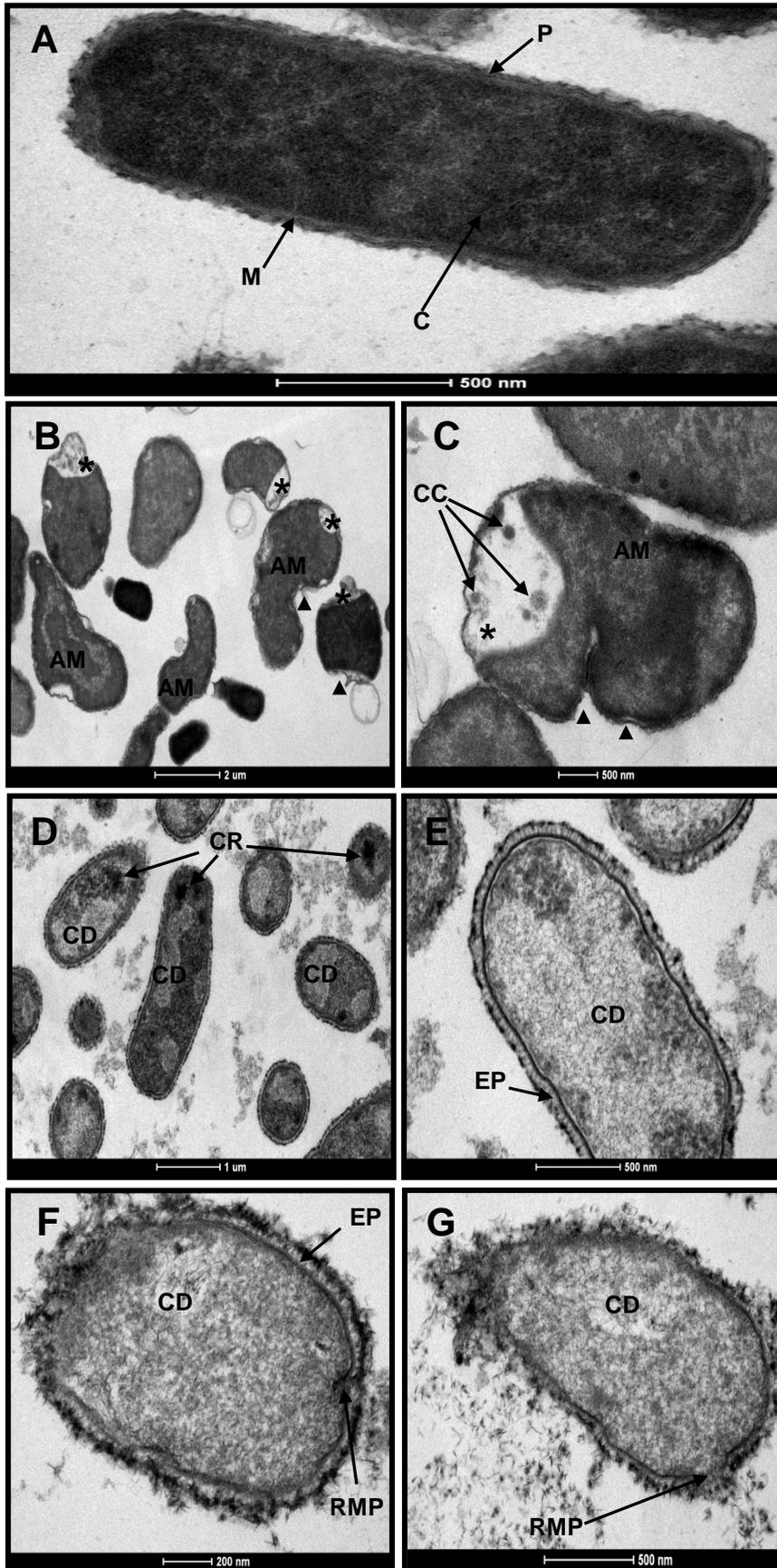


Figura 8(A-G): Eletromicrografias do isolado K3-A2 de *K. pneumoniae*. **(A):** Célula bacteriana controle sem tratamento apresentando morfologia preservada, membrana citoplasmática (M), parede celular (P) e conteúdo citoplasmático (C) íntegros. **(B-C):** Células submetidas a MER (4µg/mL) apresenta alterações morfológicas (AM), retrações citoplasmáticas (asterisco), pequenos compartimentos citoplasmáticos (CC) e irregularidades na parede celular (pontas de seta). **(D-E):** Células submetidas a POL (4µg/mL) com condensação dos ribossomos (CR), coagulação do DNA (CD) e espessamento da parede celular (EP). **(F-G):** Células submetidas a associação de MER+POL (4µg/mL+4µg/mL) apresenta espessamento da parede celular (EP), coagulação do DNA (CD), rompimento da membrana e parede celular (RMP) com perda de material citoplasmático.

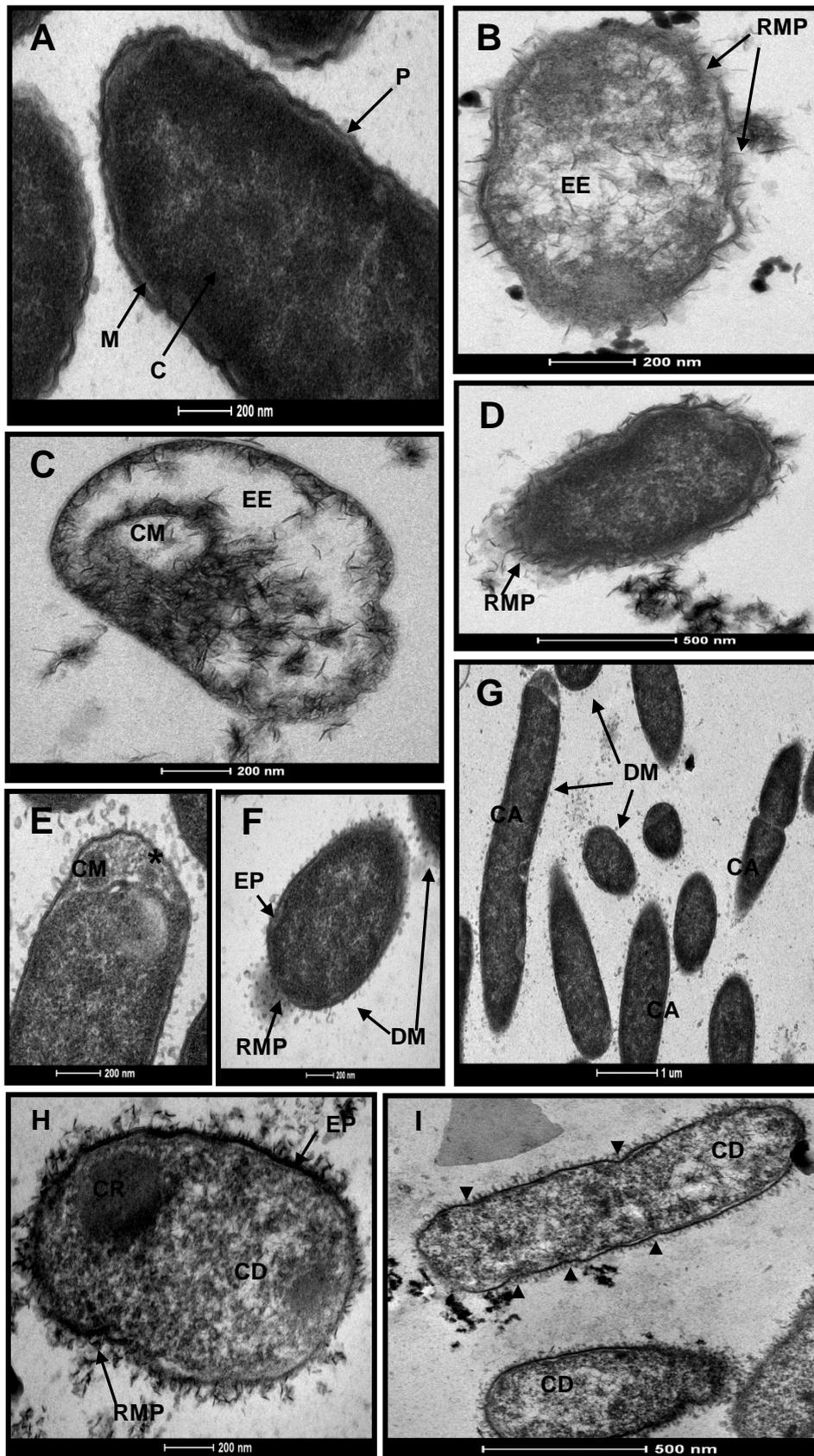


Figura 9(A-I): Eletromicrografias do isolado K12-A2 de *K. pneumoniae*. **(A):** Célula bacteriana controle sem tratamento apresentando morfologia preservada, membrana citoplasmática (M), parede celular (P) e conteúdo citoplasmático (C) íntegros. **(B-D):** Células submetidas a MER (4µg/mL) apresentam rompimento de membrana e parede celular (RMP) com perda de material citoplasmático, compartimentos membranares (CM) e espaço eletróluscentes (EE). **(E-G):** Células submetidas a POL (4µg/mL) apresentam células alongadas (CA), destruição da membrana citoplasmática (DM), compartimentos membranares (CM), retrações citoplasmáticas (asterisco), rompimento de membrana e parede celular (RMP) com perda de material citoplasmático. **(H-I):** Células submetidas a associação de MER+POL (4µg/mL+4µg/mL) apresentam rompimento de membrana e parede celular (RMP) com perda de material citoplasmático, espessamento da parede celular (EP), condensação dos ribossomos (CR), coagulação do DNA (CD) e irregularidades na parede celular (pontas de seta).

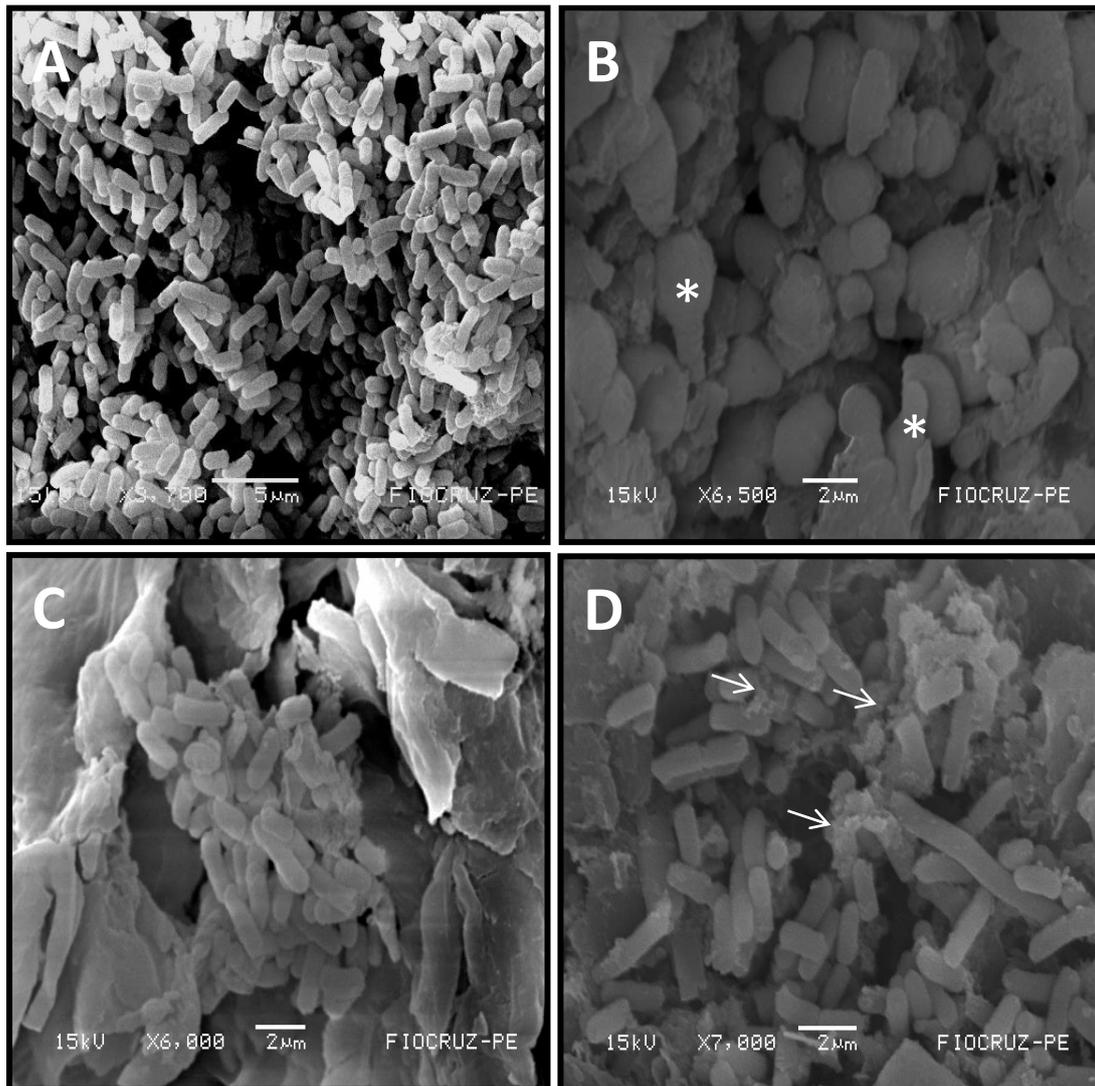


Figura 10(A-D): Eletromicrografias do isolado K3-A2 de *K. pneumoniae*. (A): Células controle sem tratamento com morfologias preservadas. (B): Células submetidas a MER (4µg/mL) apresentam alterações morfológicas (asteriscos). (C): Células submetidas a POL (4µg/mL) não apresentam alterações morfológicas porém encontra-se em número reduzido. (D): Células submetidas a associação de MER+POL (4µg/mL+4µg/mL) sem alterações morfológicas, porém podem ser observadas algumas células rompidas com extravasamento do conteúdo citoplasmático (seta).

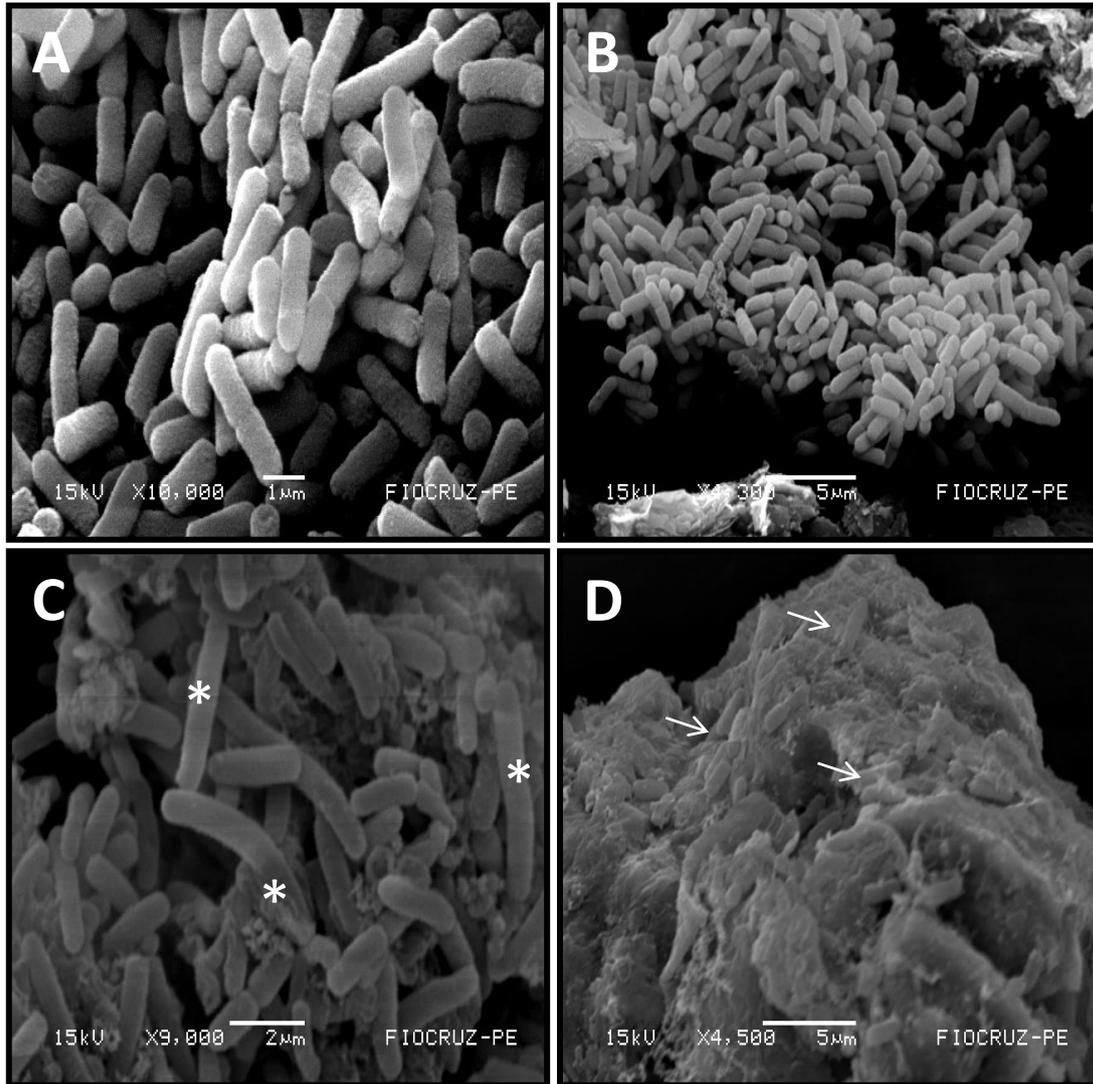


Figura 11(A-D): Eletromicrografias do isolado K12-A2 de *K. pneumoniae*. (A): Célula bacteriana controle sem tratamento apresentando morfologia preservada. (B): Células submetidas a MER (4µg/mL) não apresentam alterações morfológicas. (C): Isolado submetido a POL (4µg/mL) podemos observar células com aspectos alongados (Asteriscos). (D): Células submetidas a associação de MER+POL (4µg/mL+4µg/mL) aparentemente sem alterações morfológicas , porém encontra-se em número bastante reduzido (seta).

7. CONCLUSÕES

- Foi observado nesse estudo, a emergência de diferentes mecanismos de resistência as quinolonas em isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2} provenientes de colonização e infecção de pacientes hospitalizados em Recife-Brasil.
- Os isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC} e resistentes a quinolonas apresentaram resistência a maioria dos antimicrobianos testados, sendo mais susceptível a polimixina B e ampicacina.
- O *qnrB* foi o gene PMQR mais comumente encontrado nos isolados de *K. pneumoniae* analisados em 3 hospitais públicos em Recife-PE, não sendo detectado a presença dos genes *qnrA* e *qnrS*. Este é o primeiro relato publicado da presença de genes *qnrB1* e *qnrB12* com *bla*_{KPC-2} em *K. pneumoniae*, como também o primeiro relato mundial da presença do gene *qnrB12* em *K. pneumoniae*.
- Foram observadas mutações em *gyrA* na posição Ser83 o que pode aumentar os níveis das CIMs frente as quinolonas, porém nenhuma mutação foi detectada em *gyrB* e *parC* nas posições analisadas
- Todos os isolados apresentaram genes *acrB* e *acrF* para as bombas de efluxo. As bombas estavam sendo expressas e a mutação em *ramR* provavelmente levou a superexpressão da bomba de efluxo *acrAB* em um dos isolados analisados (K3-A2).
- Quando submetidos a concentração clinicamente relevante de polimixina B ou meropenem a análise pela microscopia eletrônica mostrou alterações significativas, os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram alterações morfológicas, rompimento da membrana plasmática e parede celular, retração do material citoplasmático, extravasamento do conteúdo citoplasmático, presença de compartimento membranares, espessamento da parede celular, condensação dos ribossomos, coagulação do DNA e irregularidades na parede celular.
- Os isolados de *K. pneumoniae*, quando submetidos a concentração clinicamente relevante de polimixina B associado com meropenem apresentaram uma maior intensidade das alterações ultraestruturais visualizadas quando comparada com os antimicrobianos testados sem associação.
- Os resultados obtidos são preocupantes porque foram detectados isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{KPC-2}, *qnrB*, mutação em *gyrA*, expressão de

bombas de efluxo *acrB* e *acrF* e mutação em *ramR*, infectando e colonizando pacientes, podendo ser importantes reservatórios para disseminação de diversos mecanismos de resistência no ambiente hospitalar.

- Isolados de *K. pneumoniae*, mesmo sendo multirresistentes, portadores do gene *bla*_{KPC-2}, apresentando o gene *qnrB*, mutação em *gyrA*, expressando bomba de efluxo e com mutação em *ramR*, sofreram alterações estruturais relevantes com a ação da polimixina B e meropenem, mostrando que a associação provoca alterações ultraestruturais mais severas.
- Esses achados ressaltam a necessidade de estudos sistemáticos que visem o maior entendimento destes mecanismos na resistência e virulência destas bactérias, para que não ocorram disseminação destas associações, e que intervenções de controle de infecção sejam adotadas precocemente, interrompendo a propagação destes mecanismos de resistência aumentando a sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABOUZEED, Y.M., BAUCHERON, S., CLOECKAERT, A. (2008). *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p.2428–2434.
- ANDERSON, K.F.; LONSWAY, D.R.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J.B. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microbiol**, v.45, p.2723-2725, 2007.
- ALDRED, K.J., KERNS, R.J., OSHEROFF, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**. v.18, p.1565-1574.
- ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, NOTA TÉCNICA Nº 01/2013: **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias Multirresistentes em 17 de abril de 2013.**
- ARAUJO, S.M., MOURAO, T.C., OLIVEIRA, J.L., MELO, I.F., ARAUJO, C.A., ARAUJO, N.A., MELO, M.C., ARAUJO, S.R., DAHER, E.F. (2011). Antimicrobial resistance of uropathogens in women with acute uncomplicated cystitis from primary care settings. **Int. Urol.Nephrol**, v.43, p.461–466.
- AREND, L.N., TOLEDO, P., PILONETTO, M., TUON, F.F. (2015). Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different facilities in Southern Brazil. **Am J Infect Control**, v.43, p.137-140.
- ARSÈNE, S., LECLERG, R. (2007). Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p. 3254–3258.
- BAUCHERON, S., COSTE, F., CANEPA, S. (2012). Binding of the RamR repressor to wild-type and mutated promoters of the *ramA* gene involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 942–948.
- BAUCHERON, S., HELLO, S.L. DOUBLET, B., GIRAUD, E., WEILL, F., CLOECKAERT, A. (2013). *ramR* mutations affecting fluoroquinolone susceptibility in epidemic multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198. **Front Microbiol**, v. 4, p.213.

- BASSETTI, M., MERELLI, M., TEMPERONI, C., ASTILEAN, A. (2013). New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.12, p.1-15.
- BENNETT, J.W., ROBERTSON, J.L., HOSPENTHAL, D.R., WOLF, S.E., CHUNG, K.K., MENDE, K., MURRAY, C.K. (2010). Impact of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections in severely burned patients. **J Amerc Col Surg**, v.211, p.391-399.
- BIALEK-DAVENET, S., MARCON, E., LEFLON-GUIBOUT, V., LAVIGNE, J. P., BERT, F., MOREAU, R., NICOLAS-CHANOINE, M. H. (2011). *In vitro* selection of ramR and soxR mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.2795–2802.
- BIEDENBACH, D.J., MOET, G.J., JONES, R.N. (2004). Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infections isolate from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.50, p.59-69.
- BIEDENBACH, D.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.; JONES, R. (2006). Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.54, p.13-21.
- BILAVSKY, E., SCHWABER, M. J., CARMELI, Y. (2010). How to stem the tide of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae?: proactive vs. reactive strategies. **Curr Opinion Infect Dis** 23, 327–331.
- BORER, A., SAIDEL-ODES, L., ESKIRA, S., NATIV, R., RIESENBERG, K., LIVSHIZRIVEN, I., SCHLAEFFER, F., SHERF, M., PELED, N. (2012). Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. **Am J Infect Control**, v.40, p.421–425.
- BRADFORD, P.A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microb Rev**, v.14, p.933–951.

- BRATU, S., LANDMAN, D., GEORGE, A., SALVANI, J., QUALE, J. (2009). Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. **J Antimicrob Chemother**, v.64, p.278–283.
- BRATU, S., LANDMAN, D., HAAG, R., RECCO, R., ERAMO, A., ALAM, M., QUALE, J. (2005). Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Arch Int Med**, v.165, p.1430–1435.
- BRAYNER, F.A., ARAÚJO, H.R.C., CAVALCANTI, M.G.S., ALVES, L.C., PEIXOTO, C.A. (2005). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). **Micron**, v.36, p.359–367.
- BRISSE, S., VERHOEF, J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.51, p.915–924.
- BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1211-1223
- BUSH, K., JACOBY, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1211-1223.
- BUSH, K. (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. Updated functional classification of beta-lactamases. **Rev Sci Tech**, v.31, p.43-56
- BUIJS, J., DOFFERHOFF, A.S., MOUTON, J.W., WAGENVOORT, J.H, VAN DER MEER, J.W. (2008). Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v.14, p.344-349.
- BULIK, C.C., NICOLAU, D.P. (2011). Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.3002-3004.
- CABRAL, A. B., MELO, R. C. A., MACIEL, M. A. V., LOPES, A. C. S. (2012). Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.45, p.572-578.

- CAI, J.C., ZHOU, H.W., ZHANG, R., CHEN, G.X. (2008). Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.2014-2018.
- CAMPOS, M.A., VARGAS, M.A. REGUEIRO, V. LLOMPART, C.M. ALBERTI, S. BENGOCHEA. J.A. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect Immun**, v.72, p.7107–7114.
- CASTANHEIRA, M., PEREIRA, A. S., NICOLETTI, A. G., PIGNATARI, A. C. C. (2007). First Report of Plasmid-Mediated *qnrA1* in a Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Strain in Latin America. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p.1527-1529.
- CATTOIR, V., POIREL, L., ROTIMI, V., SOUSSY, C. J., NORDMANN, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.60, p.394-397.
- CHANAWONG, A., M'ZALI, F.H., HERITAGE, G., XIONG, J.H., HAWKEY, P.M. (2002). Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the people's Republic of China. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.630-637.
- CHENIA, H.Y., PILLAY, B., AND PILLAY, D. (2006) Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **J Antimicrob Chemother**, v.58, p.1274–1278.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE- CLSI (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement, M100-S24. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA.
- CHIU, S., WU, T., CHUANG, Y., LIN, J., FUNG, C., LU, L., WANG, J., WANG, L., SIU, K. & OTHER AUTHORS (2013). National Surveillance Study on Carbapenem Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: The Emergence and Rapid Dissemination of KPC-2 Carbapenemase. **Pos one**, v. 8, p.1-7.
- CHMELNITSKY, I., NAVON-VENEZIA, S., STRAHILEVITZ, J., CARMELI, Y. (2008). Plasmid-mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *bla*(KPC-2) carried on the

same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.2962-2965.

DELONEY, C.R., AND N.L. SCHILLER. (1999). Competition of various β -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: Antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, p.2702-2709.

DE MAJUMDAR, S., YU, J., SPENCER, J., TIKHONOVA, I. G., SCHNEIDERS, T. (2014). Molecular basis of non-mutational derepression of *ramA* in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v.69, p.2681-2689.

DENISUIK, A. J., LAGAC -WIENS, P.R., PITOUT, J.D., MULVEY, M.R., SIMNER, P.J., TAILOR, F., KARLOWSKY, J.A., HOBAN, D.J., ADAM, H.J., ZHANEL, G.G., CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE.(2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p.57-65.

DERRELL C. M., DAVID L. P. (2003). Peptidoglycan Synthesis in the Absence of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Bacillus subtilis*. **J Bact**, v.45, p.1423-1431.

DIMECH, G.S., L.A. SOARES, M.A. FERREIRA, A.G. DE OLIVEIRA, MDA. C. CARVALHO, AND E.A. XIMENES. 2013. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **Scientific World J**, v.14, p.1-8.

DOMÍNGUEZ-HERRERA, J., VELASCO, C., DOCOBO-PÉREZ, F., RODRÍGUEZ-MART NEZ, J.M., LÓPEZ-ROJAS, R., BRIALES, A., PICHARDO, C., DÍAZ-DE-ALBA, P., RODRÍGUEZ-BA O, J., PASCUAL, A., PACH N, J. (2013). Impact of *qnrA1*, *qnrB1* and *qnrS1* on the efficacy of ciprofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the GyrA mutation Ser83Leu. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p.1609-1615.

DRLICA, K., HIASA, H., KERNS, R., MALIK, M., MUSTAEV, A., ZHAO, X. (2009) Quinolones: action and resistance updated. **Curr Top Med Chem**. 9, 981-98.

- DUBROVSKAYA, Y., T.Y. CHEN, M.R. SCIPIONE, D. ESAIAN, M.S. PHILLIPS, J. PAPADOPOULOS, AND S.A. MEHTA. 2013. Risk factors for treatment failure of polymyxin B monotherapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, p.5394-5397.
- ELKINS, C.A.; MULLIS, L.B.; LACHER, D.W.; JUNG, C.M. (2010). Single Nucleotide Polymorphism Analysis of the Major Tripartite Multidrug Efflux Pump of *Escherichia coli*: Functional Conservation in Disparate Animal Reservoirs despite Exposure to Antimicrobial Chemotherapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.1007-1015.
- ENDIMIANI, A., CARIAS, L. L., HUJER, A. M., BETHEL, C. R., HUJER, K. M., PEREZ, F., HUTTON, R. A., FOX, W. R., HALL, G. S. & OTHER AUTHORS (2008). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolate possessing *blaKPC* in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.2680-2682.
- FANG, C.T.; CHUANG, Y.P.; SHUN, C.T.; CHANG, S.C.; WANG, J.T. (2004). A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **J Exp Med**, v. 199, p. 697-705.
- FÀBREGA, A., MADURGA, S., GIRALT, E., VILA, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microb Biotechnol**, v.2, p.40–61
- FELDMAN, N., ADLER, A., MOLSHATZKI, N., NAVON-VENEZIA, S., KHABRA, E., COHEN, D., CARMELI, Y. (2013). Gastrointestinal colonization by KPC producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. **Clin Microbiol Infect**, v.19, p.190–196.
- FERJANI, S., SAIDANI, M., MOLSHATZKI, N., NAVON-VENEZIA, S., KHABRA, E., COHEN, D., CARMELI, Y. (2014). Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital. **Microb Drug Resist**, DOI: 10.1089/mdr.2014.0053.
- FERRARI, R., GALIANA, A., CREMADES, R., RODRÍGUEZ, J.C., MAGNANI, M., TOGNIM, M.C.B., OLIVEIRA, T.C.R.M., ROYO, G. (2013). Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Braz J Microbiol**, v.44, p.651–656.
- FILLIPA, N., CARRICAJÓ, A., GRATTARD, F., FASCIA, P., EL SAYED, S., DEFILIPPIS, J. P., BERTHELOT, P., AUBERT, G. (2013). Outbreak of multidrug-

resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying qnrB1 and blaCTX-M15 in a French intensive care unit. **Microb Drug Resist**, v.3 p.1-4.

FONSECA,  L., VICENTE, A.C. (2012). Functional characterization of a Cassette-specific promoter in the class 1 integron-associated qnrVC1 gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p.3392-3394.

FONTANA, C., FAVARO, M., SARMATI, L., NATOLI, S., ALTIERI, A., BOSSA, M.C., MINELLI, S., LEONARDIS, F., FAVALLI, C. (2010). Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **BMC Research Notes**, v.3, p.40.

GALES, A.C., R. N. JONES, AND H. S. SADER. (2006). Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 371 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clin Microbiol Infect**, v.12, p.315-321.

GALES, A.C., CASTANHEIRA, M., JONES, R.N., SADER, H.S., (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SEN-TRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v.73, p.354-360.

GIACOBBE, D.R., DEL BONO, V., COPPO, E., MARCHESE, A., VISCOLI, C. (2014). Emergence of a KPC-3-Producing *Escherichia coli* ST69 as a Cause of Bloodstream Infections in Italy. **Microb Drug Resist**. [Epub ahead of print].

GIANI, T., D'ANDREA, M.M., PECILE, P., BORGIANNI, L., NICOLETTI, P., TONELLI, F., BARTOLONI, A., ROSSOLINI, G.M. (2009). Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. **J Clin Microb**, v.47, p.3793-3794.

GOREN, M.G., CARMELI, Y., SCHWABER, M.J., CHMELNITSKY, I., SCHECHNER, V., NAVON-VENEZIA, S. (2010). Transfer of Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. **Emerg Infec Dis** v.16, p. 1014-1017.

GUAN, X., XUE, X., LIU, Y., WANG, J., WANG, Y., WANG, J., WANG, K., JIANG, H., ZHANG, L. & OTHER AUTHORS (2013). Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives. **J Int Med Res**, v.41, p.20-30.

- GUNELL, M., HAKANEN, A. J., JALAVA, J., HUOVINEN, P., O' STERBLAD, M. (2009). Hidden *qnrB12* gene in a Finnish faecal microbiota isolate from 1994. **J Antimicrob Chemother**, v.64, p.861-878.
- HAEGGMAN, S., LOFDAHL, S., PAAUW, A., VERHOEF, J., BRISSE, S. (2004). Diversity and Evolution of the Classe A Chromosomal Beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.2400-2408.
- HAYAKAWA, K., MARCHAIM, D., DIVINE, G. W., POGUE, J. M., KUMAR, S., LEPHART, P., RISKO, K., SOBEL, J. D., KAYE, K. S. (2012). Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at tertiary health care center. **Int J Infect Dis** v.16, p.646–648.
- HELD, T.K., ADAMCZIK, C., TRAUTMANN, M., CROSS, A.S. (1995). Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1093-1096.
- HENTSCHKE, M., WOLTERS, M., SOBOTTKA, I., ROHDE, H., AEPFELBACHER, M. (2010). *ramR* mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.2720-2723.
- HIRSCH, E.B., GUO, K. CHANG, H. CAO, K.R. LEDESMA, M. SINGH, AND V.H. TAM. 2013. Assessment of Antimicrobial Combinations for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. **J Infect Dis**, v.207, p.786–793.
- HORIYAMA, T., AND NISHINO, K. 2014. AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in *Escherichia coli*. **Plos One**, v.9, p.1-7.
- KONEMAM, E.W. et al. (2008). **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan.
- JACOBY, G.A.; WALSH, K.E.; MILLS, D.M.; WALKER, V.J.; OH, H.; ROBICSEK, A.; HOOPER, D.C. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1178-1182, 2006.
- JACOBY, G., BUSH, K. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [<http://www.lahey.org/studies>].

- JÁCOME, P.R.L.A., ALVES, L.R., CABRAL, A.B., LOPES, A.C.S., MACIEL, M.A.V. (2012). First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p.4990.
- JAIN, R., S.T. WALK, D.M. ARONOFF, V.B. YOUNG, D.W. NEWTON, C.E. CHENOWETH, AND L.L. WASHER. (2013). Emergence of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 258 in Michigan, USA. **Infect Dis Rep**, v.5, p.16-20.
- JEONG, S.H., BAE, I.K., LEE, J.H., SOHN, S.G., KANG, G.H., JEON, G.J., KIM, Y.H. (2004). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide survey. **J Clin Microb**, v.42, p.2902-2906.
- JIANG, Y., YU, D., WEI, Z., SHEN, P., ZHOU, Z., YU, Y. (2010). Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.3967-3969.
- KEHRENBURG, C., FRIEDERICHS, S., JONG, A., SCHWARZ, S. (2010). Novel Variant of the *qnrB* Gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.1206-1207.
- KIM, H. B., PARK, C. H., KIM, C. J., KIM, E. C., JACOBY, G. A., HOOPER, D. C. (2009). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.639–645.
- LANDMAN, D., J. SALAMERA, AND J. QUALE. (2013). Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. **J Clin Microbiol**, v.51, p.4106-4111.
- LAU, S.Y., ZGURSKAYA, H.I. (2005). Cell Division Defects in *Escherichia coli* Deficient in the Multidrug Efflux Transporter AcrEF-TolC. **J Bacteriol**, v.187, p.7815–7825.
- LAT, A., S.A. CLOCK, F. WU, S. WHITTIER, P. DELLA-LATTA, K. FAUNTLEROY, S.G. JENKINS, L. SAIMAN, AND J. KUBIN (2011). Comparison of Polymyxin B, Tigecycline, Cefepime, and Meropenem MICs for KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* by Broth Microdilution, Vitek 2, and Etest . **J Clin Microbiol**, v.49, p.1795-1798.

- LAWLOR, M. S., S. A. HANDLEY, AND V. L. MILLER. (2006). Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Infect. Immun.** v.74, p.5402–5407.
- LEAVITT, A., CHMELNITSKY, I., COLODNER, R., ITZHAK OFEK, I., CARMELI, Y., NAVON-VENEZIA, S. (2009). Ertapenem Resistance among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **J Clin Microb,** v.47, p.969–974.
- LEE, G.C., BURGESS, D.S. (2013). Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Clin Med Res.** v.5, p.97-100.
- LESHER, G.Y., FROELICH, E.J., GRUETT, M.D., BAILEY, J.H., BRUNDAGE, R.P. (1962) 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **J Med Chem,** v.5, p.1063–1065.
- LIVERMORE, D.M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis,** v.34, p.634–640.
- LIN, M. Y., LYLES-BANKS, R. D., LOLANS, K., HINES, D. W., SPEAR, J. B., PETRAK, R., TRICK, W. E., WEINSTEIN, R. A., HAYDEN, M. K. (2013). The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 77, p.169-173.
- LOLANS, K., CALVERT, K., WON, S., CLARK, J., HAYDEN, M. K. (2010). Direct Ertapenem Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Surveillance Swab Specimens. **J Clin Microbiology,** v.48, p.836-841.
- LÓPEZ-CERERO, L., EGEA, P., GRACIA-AHUFINGER, I., GONZÁLEZ-PADILLA, M., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, F., RODRÍGUEZ-BA O, J., PASCUAL, A. (2014). Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. **Int J Antimicrob Agents,** v.44, p.538-540.
- MACHUCA, J., BRIALES, A., LABRADOR, G., DI AZ-DE-ALBA, P., LO PEZ-ROJAS, R., DOCOBO-PE REZ, F., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., RODRÍGUEZ-BAN O, J., PACHO N, M. E. & OTHER AUTHORS (2014). Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone

- resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. **J Antimicrob Chemother** 69, 1-13.
- MALTEZOU, H.C., GIAKKOUPI, P., MARAGOS, A., BOLIKAS, M., RAFTOPOULOS, V., PAPAHAZAKI, H., VROUHOS, G., LIAKOU, V., VATOPOULOS, A.C. (2009). Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). **J Infect**, v.58, p.213–219.
- MARCHIARO, P., BALLERINI, V., SPALDING, T., CERA, G., MUSSI, M.A., MORAN-BARRIO, J., VILA, A.J., VIALE, A.M., LIMANSKY, A.S.(2008). A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **J Antimicrob Chemother**, v.62, p.336-344.
- MATHERS, A. J., COX, H. L., KITCHEL, B., BONATTI, H., BRASSINGA, A. K., CARROLL, J., SCHELD, W. M., HAZEN, K. C., SIFRI, C. D. (2011). Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **MBio**, v.2, p.1-7.
- MINARINI, L. A. R., GALES, A. C., DARINI, A. L. C. (2007). First Report of Plasmid-Mediated Resistance to Quinolones and Cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from an Outpatient in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p.401–402.
- MINARINI, L.A., CLÍMACO, E.C., GUIMARÃES, D.B., FERREIRA, J.C., PALAZZO, I.C, MARTINEZ, R., DARINI, A.L. (2008). Clonal transmission of ESBL producing *Klebsiella spp.* at a university hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, v.56, p.587-591.
- MELO, R. C. A., BARROS, E. M. R., LOUREIRO, N. G., MELO, H. R., MACIEL, M. A. V., LOPES, A. C. S. (2014). Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v.69, p.824-31.
- MENDES, R.E; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; YANG, Q.; YU, Y.; SUN, Z.; JONES, R.N. (2008). Carbapenem-Resistant Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and Detection of a Conjugative Plasmid (*bla*KPC-2 plus *qnrB4*) and a *bla*IMP-4 Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 798-799.

- MENDES, C.A.C., BURDMANN, E.A. (2009). Polymyxins - a review focusing on their nephrotoxicity. **Rev Assoc Med Bras.** 55: 752-759.
- MERKIER, A. K., RODRIGUEZ, M. C., TOGNERI, A., BRENGI, S., OSUNA, C., PICHEL, M., CASSINI M. H; SERRATIA MARCESCENS ARGENTINEAN COLLABORATIVE GROUP; CENTRÓN D. (2013). Outbreak of a cluster with epidemic behavior rdueto *Serratia marcescens* after colistinadministration in a hospital setting. **J. Clin.Microbiol.** 51, 2295–2302
- MOELLERING, R.C. JR. (2005). The fluoroquinolones: the last Samurai? **Clin Infect** 41 suppl 2 S111–S112.
- MOFFATT, J.H., M. HARPER, P. HARRISON, J.D. HALE, E. VINOGRADOV, T. SEEMANN, R. HENRY, B. CRANE, F. ST MICHAEL, A.D. COX, B. ADLER, R.L. NATION, J. LI AND J.D. BOYCE. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.4971–4977.
- MONTEIRO, J., SANTOS, A.F., ASENSI, M.D., PEIRANO, G., GALES, A.C. (2009). First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.333–334.
- MORROW, B.J., HE, W., AMSLER, K.M., FOLENO, B.D., MACIELAG, M. J., LYNCH, S., BUSH, K. (2010). *In Vitro* Antibacterial Activities of JNJ-Q2, a New Broad-Spectrum Fluoroquinolone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1955-1964.
- MUNOZ-PRICE, L.S., L. POIREL, R.A. BONOMO, M.J. SCHWABER, G.L. DAIKOS, M. CORMICAN, G. CORNAGLIA, J. GARAU, M. GNIADKOWSKI, M.K. HAYDEN, K. KUMARASAMY, D.M. LIVERMORE, J.J. MAYA, P. NORDMANN, J.B. PATEL, D.L. PATERSON, J. PITOUT, M.V. VILLEGAS, H. WANG, N. WOODFORD, AND J.P. QUINN. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, v. 13, p.785-796.
- NAAS, T., NORDMAN, P., VEDEL, G., POYART, C. (2005). Plasmid-mediated carbapenem hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.4423-4424.
- NAAS, T., CUZON, G., VILLEGAS, M.V., LARTIGUE, M.F., QUINN, J.P., NORDMANN, P. (2008). Genetic Structures at the origin of acquisition of the beta-

- lactamase *bla*_{KPC} gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.1257-1263.
- NAM, Y. S., CHO, S. Y., YANG, H. Y., PARK, K. S., JANG, J. H., KIM, Y. T., JEONG, J. W., SUH, J. T., LEE, H. J. (2013). Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. **Int J Antimicrob Agents**, v.41, p.126-129.
- NAVON-VENEZIA, S., CHMELNITSKY, I., LEAVITT, A., SCHWABER, M.J., SCHWARTZ, D., CARMELI, Y. (2006). Plasmid-mediated imipenem hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.3098–3101.
- NISHINO, K., HAYASHI-NISHINO, M., YAMAGUCHI, A. (2009). H-NS Modulates Multidrug Resistance of Salmonella enterica Serovar Typhimurium by Repressing Multidrug Efflux Genes *acrEF*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.3541–3543.
- OGAWA, W., LI, D. W., YU, P., BEGUM, A., MIZUSHIMA, T., KURODA, T., TSUCHIYA, T. (2005). Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. **Biol Pharm Bull**, v.28, p.1505-1508
- OKADE, H., NAKAGAWA, S., SAKAGAMI, T., HISADA, H., NOMURA, N., MITSUYAMA, J., YAMAGISHI, Y., MIKAMO, H. (2014). Characterization of plasmidmediated quinolone resistance determinants in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Tokai, Japan. **J Infect Chemother**. v, 20, p. 778-783.
- OLAITAN, A.O., MORAND, S., AND ROLAIN, J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol**. 5: 1-18.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. (1984). Serotyping of *Klebsiella*. **Methods Microbiol**, v.14, p.143–164
- PADILLA, E., LLOBET, E., DOMEÑECH-SANNCHEZ, A., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., BENGOCHEA, J.A., ALBERTI, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. **Antimicrob Agents Chemother** 54, 177-183.
- PAIVA, M. C., NASCIMENTO, A. M., CAMARGO, I. L., LIMA-BITTENCOURT, C. I., NARDI, R. M. (2012). The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6)-Ib-cr*

- genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 107, 687-689.
- PALLECCHI, L., RICCOBONO, E., MANTELLA, A., BARTALESI, F., SENNATI, S., GAMBOA, H., GOTUZZO, E., BARTOLONI, A., ROSSOLINI, G. M. (2009). High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. **Antimicrob Agents Chemother** 53, 2632–2635.
- PAN, Y.J., FANG, H.C., YANG, H.C., LIN, T. L., HSIEH, P.F., TSAI, F.C., KEYNAN, Y., WANG, J.T. (2008). Capsular Polysaccharide Synthesis Regions in *Klebsiella pneumoniae* Serotype K57 and a New Capsular Serotype. **J Clin Microbiol**, v.46: p.2231-2240.
- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M., CHRISTOFIDOU, M., FLIGOU, F., BARTZAVALI, C., VRETTOS, T., FILOS, K. S., MARANGOS, M., ANASTASSIOU, E. D. (2014). The role of colonization pressure in the dissemination of colistin or tigecycline resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients. **Infection**, v.42, p.883-890.
- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M., MARANGOS, M., FLIGOU, F., CHRISTOFIDOU, M., SKLAVOU, C., VAMVAKOPOULOU, S., ANASTASSIOU, E. D., FILOS, K. S. (2013). KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. **Clin Microbiol Infect**, v.19, p.169-173.
- PATEL, J.B., RASHEED, J.K., KITCHEL, B. (2009). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.1.
- PATERSON, D.L. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Amer J Infec Cont**, v.34, p.20-28.
- PASTERAN, F.G., OTAEGUI, L., GUERRIERO, L., RADICE, G., MAGGIORA, R., RAPOPORT, M., FACCONI, D., DI MARTINO, A., GALAS, M. (2008). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emer Infect Dis**, v.14, p.1178–1180.
- PAVEZ, M., MAMIZUKA, E.M., LINCOPAN, N. (2009). Early dissemination of KPC-2-producing *K. pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.2702- 2009.

- PEIRANO, G., ASENSI, M. D., PITONDO-SILVA, A., PITOUT, J. D. (2009). Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p.265-268.
- PEIRANO, G., ASENSI, M. D., PITONDO-SILVA, A., PITOUT, J. D. (2011). Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clin Microbiol Infect**, v.17, p.1039-1043.
- PEREIRA, P.S., BORGHI, M., ALBANO, R.M., LOPES, J.C., SILVEIRA, M.C., MARQUES, E.A., OLIVEIRA, J.C., ASENSI, M.D., CARVALHO-ASSEF, A.P. (2015). Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 21, p. 234-236.
- PETRELLA, S., ZIENTAL-GELUS, N., MAYER, C., RENARD, M., JARLIER, V., SOUGAKOFF, W. (2008). Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.3725–3736.
- PFEIFER, Y., CULLIK, A., WITTE, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **Int J Med Microbiol**, v.300, p.371–379.
- PÉREZ, A., M. POZA, A. FERNÁNDEZ, M. DELC. FERNÁNDEZ, S. MALLO, M. MERINO, S. RUMBO-FEAL, M.P. CABRAL, AND G. BOU. (2012). Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56. p.2084–2090.
- PETRELLA, S., GELUS, N.Z., MAYER, C., RENARD, M., JARLIER, V., SOUGAKOFF, W. (2008). Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A β -lactamases KPC-2 identified in *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain from the same patient in France. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p. 3725-3736.
- QUEENAN, A.M., BUSH, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microb Rev**, v.20, p.440-458.
- QUILES, M.G., ROCCHETTI, T.T., FEHLBERG, L.C., KUSANO, E.J., CHEBABO, A., PEREIRA, R.M., GALES, A.C., PIGNATARI, A.C. (2015). Unusual

association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Braz J Med Biol Res.** v. 48, p. 174-177.

RAJESHWARI, H., S. NAGVENI, A. OLI, D. PARASHAR, K. R. CHANDRAKANTH. (2009). Morphological changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to Cefotaxime: a scanning electron microscope study. **World J Microbiol Biotechnol**, v.25, p.2263-2266.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R. J. (2006). **Farmacologia** 6^oed., Elsevier, 920p.

RENSCH, U., K. NISHINO, G. KLEIN, AND C. KEHRENBURG. (2014). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. **Int J Antimicrob Agents.** 44: 179-180.

ROBICSEK, A., STRAHILEVITZ, J., SAHM, D. F., JACOBY, G. A., HOOPER, D. C. (2006). *qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the United States. **Antimicrob Agents Chemother** 50, 2872–2874.

ROCHA, J.L., TUON, F.F., JOHNSON, J.R., (2012). Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive antimicrobial resistance. **Braz. J. Infect. Dis.** 16, 115–121.

RODLOFF, A.C., GOLDSTEIN, E.J.C., TORRES, A. (2006). Two decades of imipenem therapy. **J Antimicrob Chemother**, v.58, p. 916-929.

ROMANO, B., E. PAGANO, V. MONTANARO, A.L. FORTUNATO, N. MILIC, AND F. BORRELLI. (2013). Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytother Res.** 27: 1588-1596.

RUIZ, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, p. 1109-1117, 2003.

SADER, H.S., JONES, R.N., GALES, A.C., SILVA, J.B., PIGNATARI, A.C., SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). (2004) SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **J Infect Dis**, v. 8, p.25-79.

SAMONIS, G., KORBILA, I. P., MARAKI, S., MICHAILIDOU, I., VARDAKAS, K. Z., KOFTERIDIS, D., DIMOPOULOU, D., GKOGKOZOTOU, V. K., FALAGAS,

- M. E. (2014). Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin *Enterobacteriaceae* and association with colistin use in a tertiary hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.** 33,1505–1510.
- SAMRA, Z., OFIR, O., LISHTZINSKY, Y., MADAR-SHAPIRO, L., BISHARA, J. (2007). Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. **Int J Antimicrob Agents**, v.30, p.525-529.
- SANTANA, T.C.F.S., PEREIRA, E.M.M., MONTEIRO, S.G., CARMO, M.S., TURRI, R.J.G., FIGUEIREDO, P.M.S. (2007). Prevalência e Resistência Bacteriana aos Agentes Antimicrobianos de Primeira Escolha nas Infecções do Trato Urinário no Município de São Luís-MA. **Rev Patol Trop**, v.41, p. 409-418.
- SANTHANA, R.L, H.L. HING, O. BAHARUDIN, Z. TEH HAMIDAH, R. AIDA SUHANA, C.P. NOR ASIHA, B. VIMALA, S. PARAMSARVARAN, G. SUMARNI, AND K. HANJEET. (2007). Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Trop Biomed**, v.24, p.105-109.
- SCAVUZZI, A.M.L., M.A.V. MACIEL, H.R.L. MELO, L.C. ALVES, F.A. BRAYNER, AND A.C.S. LOPES. (2015). Occurrence of *qnrB1* and *qnrB12* genes, mutation in *gyrA* and *ramR*, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of *bla_{KPC-2}* in Recife, Brazil. **Microbiology**. in press.
- SCHECHNER, V., KOTLOVSKY, T., KAZMA, M., MISHALI, H., SCHWARTZ, D., NAVON-VENEZIA, S., SCHWABER, M. J., CARMELI, Y. (2013). Asymptomatic rectal carriage of *bla(KPC)* producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected? **Clin Microbiol** 19, 451-456
- SCHWABER, M. J., LEV, B., ISRAELI, A., SOLTER, E., SMOLLAN, G., RUBINOVITCH, B., SHALIT, I., CARMELI, Y. (2011). Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. **Clin Infect Dis** 52, 848–855.
- SEYEDPOUR, S. M., EFTEKHAR, F. (2014). Quinolone Susceptibility and Detection of *qnr* and *aac(6⁷)-Ib-cr* Genes in Community Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Jundishapur J Microbiol** 7, 1-4.

SCAVUZZI, AML. Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação

- SHARMA, J., RAY, P., SHARMA, M. (2010). Plasmid profile of ESBLs producing-Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β -lactam drugs. **Indian J Pathol Microbiol**, v.53, p. 83-86.
- SILVA, O.F., CIFUENTES, D.M., PINTO, C.M. (2011). Results of antimicrobial susceptibility surveillance in Chile: consolidating a network. **Rev Chilena Infectol**, v.28, p.19–27.
- SIU, L. K., YEH, K. M., LIN, J. C., FUNG, C. P., CHANG, F. Y. (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. **Lancet Infect Dis**, v.12, p.881–887.
- SUH, B., AND LORBER, B. (1995). Quinolones. **Med Clin North Am** **79**: 869–894.
- TANG, S.S., A. APISARNTHANARAK, L.Y. HSUC. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Adv Drug Deliv Rev**, v.78, p. 3-13.
- TAKATSUKA, Y., CHEN, C., NIKAIDO, H . (2010). Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p. 6559-6565.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. (2012). **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed.
- TSAKRIS, A., KRISTO, I., POULOU, A., MARKOU, F., IKONOMIDIS, A., POURNARAS, S. (2008). First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. **J Antimicrob Chemother**, v.62, p.1257–1260.
- TU, Y., LU, M., CHIANG, M., HUANG, S., PENG, H. (2009). Genetic Requirements for *Klebsiella pneumoniae*-Induced Liver Abscess in an Oral Infection Model. **Infect Immun**, v.77, p.2657-2671.
- TUMBARELLO, M., P. VIALE, C. VISCOLI, E.M. TRECARICHI, F. TUMIETTO, A. MARCHESE, T. SPANU, S. AMBRETTI, F. GINOCCHIO, F. CRISTINI, A.R. LOSITO, S. TEDESCHI, R. CAUDA, AND M. BASSETTI. (2012). Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella*

- pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clin Infect Dis**, v.55, p.943-950.
- VERAS, D. L., ALVES, L. C., BRAYNER, F. A., GUEDES, D. R., MACIEL, M. A., ROCHA, C. R., SOUZA LOPES, A. C. (2011). Prevalence of the bla (SHV) gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. **Curr Microbiol**, v.62, p.1610-1616.
- VERAS, D. L. (2014). Determinação da ação in vitro de antibióticos B-lactâmicos frente a isolados multidroga-resistentes de *Klebsiella pneumoniae* portadores dos genes blaKPC, blaSHV, blaTEM, ou blaCTX-M. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**.
- VIANA, A. L. M., CAIÔ, R., AVELINO, C. C., GALES, A. C., FRANCO, M. C., MINARINI, L. A. R. (2013). Extended-spectrum b-lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **J Med Microbiol**, v.62, p.1326-1331.
- VILLA, L., FEUDI, C., FORTINI, D., GÁRCIA-FERNÁNDEZ, A., CARATTOLI, A. (2014). Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring Tigecycline Resistance. **Antimicrob Agents Chemother** v.58, p.1707–1712.
- VILLEGAS, M.V., LOLANS, K., CORREA, A., SUAREZ, C.J., LOPEZ, J.A., VALLEJO, M., QUINN, J.P. (2006). Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.2880–2882.
- WALTHER-RASMUSSEN, J., AND N. HØIBY. (2007). Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v.60, p.470-482.
- WANG, M., TRAN, J.H., JACOBY, G.A., ZHANG, Y., WANG, F., HOOPER, D.C. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 2242-2248.
- WENDT, C.(2008). *Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase in Deutschland diese Woche 22/2008 nachgewiesen. **Epidemiol Bull**. v.22, p.173–174.

SCAVUZZI, AML. Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação

- WEI, Z.Q., DU, X.X., YU, Y.S., SHEN, P., CHEN, Y.G., LI, L.J. (2007). Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p.763–765.
- WHITFIELD, C., NAISMITH, J.H. (2008). Periplasmic export machines for outer membrane assembly. **Curr Opin Struct Biol**, v.18, p. 466-474.
- WIRTH, F.W., PICOLI, S.U., CANTARELLI, V.V., GONÇALVES, A.L.S., BRUST, F.R., SANTOS, L.M.O., BARRETO, M.F. (2009). Metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.13, p.170-172.
- WOLTER, D.J., KHALAF, N., ROBLEDO, I.E., VAZQUEZ, G.J., SANTE, M.I., AQUINO, E.E., GOERING, R.V., HANSON, N.D. (2009). Surveillance of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Puerto Rico medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.1660–1664.
- WON, S., MUNOZ-PRICE, L.S., LOLANS, K., CALVERT, K., LIN, M.Y., WEINSTEIN, R.A., HAYDEN, M.K. (2009). Multi-facility emergence and rapid spread of KPC *Enterobacteriaceae* in Northwest Indiana and Chicago area, abstr. 67. Abstr. **19th Annu. Sci. Meet. Soc. Healthc. Epidemiol. Am.**, San Diego, CA.
- WU, W. Y., WANG, H., LU, J., WU, J., CHEN, M., XU, Y., LU, Y. (2010). Genetic diversity of *Salmonella enterica serovar Typhi* and *Paratyphi* in Shenzhen, China from 2002 through 2007. **BMC Microbiol** 10, 1-7.
- YAMASAKI, S., NIKAIDO, E., NAKASHIMA, R. ET AL.(2013). The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. **Nat Commun**, v.4, p.2078.
- YANG, J., LUO, Y., LI, J., MA, Y., HU, C., JIN, S., YE, L., CUI, S. (2010). Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. **J Antimicrob Chemother** 65: 453-459.
- YANG, H. Y., NAM, Y. S., LEE, H. J. (2014). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. **Can J Infect Dis Med Microbiol** 25, 163-169.

ZAVASCKI, A.P., MACHADO, A.B., DE OLIVEIRA, K.R., SUPERTI, S.V., PILGER, D.A., CANTARELLI, V.V., PEREIRA, P.R., LIEBERKMECHT, A.C., BARTH, A.L. (2009). KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, p.286–288.

ZHANG, Z., MENG, X., WANG, Y., XIA, X., WANG, X., XI, M., MENG, J., SHI, X., WANG, D. & OTHER AUTHORS (2014). Presence of qnr, aac(6 ϕ)-Ib, qepA, oqxAB, and Mutations in Gyrase and Topoisomerase in Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella* Isolates Recovered from Retail Chicken Carcasses. **Foodborne Pathog Dis** 11, 698-705.

ZHANG, R., WANG, X. D., CAI, J. C., ZHOU, H. W., LV, H. X., HU, Q. F., CHEN, G. X. (2011). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2- producing *K. pneumoniae* with high qnr prevalence in a Chinese hospital. **J Med Microbiol** 60, 977-982

Zhang, R.; Zhou, H.W.; Cai, J.C.; Chen, G.X. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.574–576, 2007.

Zhao, F., Bai, J., Wu, J., Liu, J., Zhou, M., Xia, S., Wang, S., Yao, X., Yi, H., Lin, M., Gao, S., Zhou, T., Xu, Z., Niu, Y., Bao, Q. (2010). Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v.5, p.1-9.

ZHENG, J., S. CUI, MENG, J. (2009). Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhimurium*. **J Antimicrob Chemother**. 63: 95–102.

APÊNDICE

Microbiology

Occurrence of *qnrB1* and *qnrB12* genes, mutation in *gyrA* and *ramR*, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of *blaKPC-2* in Recife, Brazil.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MIC-D-15-00043
Full Title:	Occurrence of <i>qnrB1</i> and <i>qnrB12</i> genes, mutation in <i>gyrA</i> and <i>ramR</i> , and expression of efflux pumps in isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> carriers of <i>blaKPC-2</i> in Recife, Brazil.
Short Title:	Quinolone resistance in <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
Article Type:	Standard
Section/Category:	Genomics and systems biology
Keywords:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>qnrB1</i> ; <i>qnrB12</i> ; Efflux pump; <i>gyrA</i> ; <i>ramR</i> .
Corresponding Author:	Aexsandra Scavuzzi Universidade Federal de Pernambuco Recife, BRAZIL
First Author:	Aexsandra Scavuzzi
Order of Authors:	Aexsandra Scavuzzi Maria Amélia Maciel Heloísa Melo Luiz Alves Fábio Brayner Ana Catarina Lopes
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	The occurrence of quinolone-resistance genes (<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> and <i>qnrS</i>), the presence of mutations in <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> and <i>parC</i> , as well as the expression of efflux pumps (<i>acrB</i> and <i>acrF</i>) and mutations in the gene <i>ramR</i> were investigated in 30 <i>blaKPC</i> positive isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> taken from infection and colonization in hospital patients from Recife, Brazil. The detection of the <i>qnr</i> , <i>acrB</i> and <i>acrF</i> genes and analysis of the mutations in <i>ramR</i> and the QRDRs of <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> and <i>parC</i> were performed by PCR followed by DNA sequencing. Among the isolates analyzed, 73.3% (n = 22) presented the <i>qnrB</i> gene. For the DNA sequencing six isolates (K3-A2, K12-A2, K25-A2, K27-A2, K19-A2 and K3-C2) were selected, and the <i>qnrB1</i> and <i>qnrB12</i> variants were detected. This is the first report in Brazil of the presence of <i>qnrB1</i> or <i>qnrB12</i> with <i>blaKPC-2</i> in <i>K. pneumoniae</i> . It is also the first report in the world of the presence of <i>qnrB12</i> in <i>K. pneumoniae</i> . Mutations were observed in <i>gyrA</i> S83 in two isolates and mutation in <i>ramR</i> in one isolate. All isolates presented genes for the <i>acrB</i> and <i>acrF</i> efflux pumps and the RT-PCR performed showed that the pumps were being expressed. <i>KPC-2</i> -positive isolates colonizing patients, which also showed <i>qnrB</i> , mutation in <i>gyrA</i> and efflux pumps, may be important reservoirs for disseminating these resistance mechanisms in the hospital environment. This study relates the emergence of different quinolone resistance mechanisms in <i>K. pneumoniae</i> isolates from colonization and infection in Recife, Brazil.

Manuscript Including References (Word document)

[Click here to download Manuscript Including References \(Word document\): Alexandra Scavuzzi.doc](#)

1 **Short title:** Quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*.

2

3 **Occurrence of *qnrB1* and *qnrB12* genes, mutation in *gyrA* and *ramR*, and**
4 **expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of *bla_{KPC-2}***
5 **in Recife, Brazil.**

6

7 Alexandra Maria Lima Scavuzzi^{1,2}, Maria Amélia Vieira Maciel¹, Heloísa Ramos
8 Lacerda de Melo^{1,3}, Luiz Carlos Alves², Fábio André Brayner^{1,2}, Ana Catarina Souza
9 Lopes¹

10

11 ¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
12 50.732-970, Recife-PE, Brasil.

13 ²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-Fiocruz), Recife-PE, Brasil.

14 ³Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
15 50.732-970, Recife-PE, Brasil.

16

17 **Correspondenceto:**

18 MSc. Alexandra Maria Lima Scavuzzi

19 Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.

20 Morais Rego, s/n. Recife-PE,

21 Brazil 50.732-970

22 Tel.: +55 81 21268526

23 Fax: +55 81 21268528

24 e-mail address: alexsandramariah@gmail.com

25

26 **Financial Support:** FACEPE.

27 Occurrence of *qnrB1* and *qnrB12* genes, mutation in *gyrA* and *ramR*, and
28 expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of *bla_{KPC-2}*
29 in Recife, Brazil.

30

31 Abstract

32

33 The occurrence of quinolone-resistance genes (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*), the presence of
34 mutations in *gyrA*, *gyrB* and *parC*, as well as the expression of efflux pumps (*acrB* and
35 *acrF*) and mutations in the gene *ramR* were investigated in 30 *bla_{KPC}* positive isolates of
36 *Klebsiella pneumoniae* taken from infection and colonization in hospital patients from
37 Recife, Brazil. The detection of the *qnr*, *acrB* and *acrF* genes and analysis of the
38 mutations in *ramR* and the QRDRs of *gyrA*, *gyrB* and *parC* were performed by PCR
39 followed by DNA sequencing. Among the isolates analyzed, 73.3% (n = 22) presented
40 the *qnrB* gene. For the DNA sequencing six isolates (K3-A2, K12-A2, K25-A2, K27-
41 A2, K19-A2 and K3-C2) were selected, and the *qnrB1* and *qnrB12* variants were
42 detected. This is the first report in Brazil of the presence of *qnrB1* or *qnrB12* with
43 *bla_{KPC-2}* in *K. pneumoniae*. It is also the first report in the world of the presence of
44 *qnrB12* in *K. pneumoniae*. Mutations were observed in *gyrA* S83 in two isolates and
45 mutation in *ramR* in one isolate. All isolates presented genes for the *acrB* and *acrF*
46 efflux pumps and the RT-PCR performed showed that the pumps were being expressed.
47 KPC-2-positive isolates colonizing patients, which also showed *qnrB*, mutation in *gyrA*
48 and efflux pumps, may be important reservoirs for disseminating these resistance
49 mechanisms in the hospital environment. This study relates the emergence of different
50 quinolone resistance mechanisms in *K. pneumoniae* isolates from colonization and
51 infection in Recife, Brazil.

52

53 **Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, *qnrB1*; *qnrB12*; Efflux pump; *gyrA* and *ramR*.

54

55 **1.INTRODUCTION**

56

57 *Klebsiella pneumoniae* is an important pathogen associated with a variety of
58 infections related to health care, which causes mainly septicemia, pneumonia and
59 urinary tract infections (Siu *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2013, and Nam *et al.*, 2013). This is
60 the main bacterial species producing the enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
61 (KPC) which confers resistance to all β -lactam antibiotics, including carbapenems
62 (Lolans *et al.*, 2010, Cabral *et al.*, 2012, Melo *et al.*, 2014). Some bacteria that produce
63 carbapenemase usually also present associated resistance to quinolones, which can be
64 justified by the presence of the *bla_{KPC}* gene accompanied by the *qnr* gene in resistance
65 plasmids (Endimiani *et al.*, 2008). Since the introduction of quinolones, the resistance to
66 these agents in the *Enterobacteriaceae* family has become common and widespread.

67 The mechanisms of resistance to quinolones emerged from mutations of
68 chromosomal genes which encode the DNA gyrase and topoisomerase IV (3) *gyrA* and
69 *gyrB*, *parC* and *parE*, respectively, in regions called quinolone-resistance-determining
70 (QRDRs) (Nam *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Two other main mechanisms have also
71 been reported, consisting of an active efflux mediated by the AcrAB-TolC efflux
72 system, chromosomally encoded, and the protection of the *qnr* target proteins, most of
73 which are plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes acquired by
74 horizontal transfer (Paiva *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

75 To date, different variants of the PMQR genes have been described: *qnrA* (7
76 variants), *qnrB* (74 variants), *qnrC* (1 variant), *qnrD* (2 variants), *qnrS* (9 variants) and
77 *qnrVc* (5 variants) (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>). In Brazil, PMQR genes have
78 been detected in *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter*

79 *cloacae*) bearing *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB19* and *qnrS1* with the co-occurrence of extended-
80 spectrum beta-lactamase (ESBLs) (Peirano *et al.*, 2011; Paiva *et al.*, 2012; Viana *et al.*,
81 2013).

82 The AcrAB efflux system, present in most species of Enterobacteriaceae, uses
83 the protein of the outer membrane of TolC, thus reducing susceptibility to macrolides,
84 fluoroquinolones, chloramphenicol, trimethoprim and tetracyclines (Villa *et al.*, 2014).
85 The AcrEF efflux pump is highly homologous to AcrAB in *Salmonella enterica* with an
86 amino acid identity of 81.4% and similar substrate specificities, since the
87 overexpression of AcrEF confers a similar effect to AcrAB.

88 The overexpression of *ramA* seems to be the cause of the overexpression of
89 AcrAB in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* (Hentschke *et al.*, 2010) and the expression of
90 *ramA* is negatively controlled by the regulator *RamR* leading to overexpression of the
91 efflux pump AcrAB (Vila *et al.*, 2014). *RamR*, is a protein of the TFR family of
92 regulators, and is the repressor of the *romA-ramA* locus. Reports on *Salmonella*,
93 *Klebsiella* and *Enterobacter* have shown that mutations located throughout the protein
94 *RamR* lead to the non-suppression of the transcription of *romA-ramA* and subsequently
95 to the overexpression of the AcrAB operon, resulting in a multiresistance phenotype
96 (De Majumdar *et al.*, 2014; Villa *et al.*, 2014; Bialek-Davenet *et al.*, 2011).

97 Therefore, the objective of this study was to investigate the occurrence of *qnr*
98 genes, the presence of mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *ramR* genes, as well as to
99 assess the presence and expression of efflux pumps in multi-resistant *bla_{KPC}* positive
100 isolates of *K. pneumoniae*, coming from colonization and infection in patients in public
101 hospitals of Recife, Brazil.

102

103 **2.MATERIALS AND METHODS**

104

105 2.1. Bacterial isolates

106

107 An analysis was made of 30 hospital isolates of *K. pneumoniae* previously
108 selected due to their being resistant to quinolones and positive for the *bla_{KPC}* gene,
109 coming from colonization (rectal swab), urinary tract infections or respiratory
110 infections, from three public hospitals in the city of Recife-PE, Brazil, between 2011
111 and 2012. The *K. pneumoniae* isolates selected are stored in the Bacteriology and
112 Molecular Biology Laboratory, of the Department of Tropical Medicine, Federal
113 University of Pernambuco, Brazil, and were identified biochemically before hand by the
114 automated system Bactec 9120/Phoenix-BD and typed as to their resistance profile, the
115 presence of virulence genes, ERIC-PCR, and the presence of the *bla_{KPC}* gene (Melo *et*
116 *al.*, 2014). For DNA sequencing of the genes found, six isolates (K3-A2, K12-A2, K25-
117 A2, K27-A2, K19-A2 and K3-C2) were selected that had no clonal relationship and
118 were resistant to 15 or more antimicrobials, including their being resistant to four
119 quinolones. The cultures are preserved in 20% glycerol at -70°C and to conduct the
120 analysis, they were grown in Brain Heart Infusion (BHI) at 37°C for 18 hours.

121

122 2.2. Test of susceptibility to antimicrobials

123

124 The 30 *K. pneumoniae* isolates were seeded with Mueller-Hinton agar (Biolife)
125 and the susceptibility of the isolates was detected by the automated BD Phoenix system,
126 and the disc diffusion method for quinolones proposed by Kirby and Bauer. The
127 following antimicrobials were used: amoxicillin-clavulanic acid (AMC); amoxicillin
128 (AMO); amikacin (AMI); aztreonam (ATM); ceftazidime (CAZ); cefoxitin (CFO);
129 cefotaxime (CTX); cefepime (CPM); piperacillin/tazobactam (PIT); polymyxin B

130 (POL); trimethoprim/sulfamethoxazole (SUT); gentamicin (GEN); ciprofloxacin (CIP);
131 norfloxacin (NOR); nalidixic acid (NAL); levofloxacin (LEV); imipenem (IPM);
132 meropenem (MPM) and ertapenem (ERT) (CLSI 2014).

133

134 2.3. PCR and sequencing of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *ramR* genes.

135

136 Genomic DNA of 30 isolates was extracted directly from colonies suspended in
137 200µl of distilled water. The suspension was heated at 100 ° C for 10 minutes,
138 centrifuged (5min / 10,000g) and 100 ul of the supernatant containing the DNA was
139 kept at -20 ° C until the time of use. After extraction, the DNA was quantified in
140 NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer.

141 The *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *ramR* genes were amplified in four *K. pneumoniae*
142 isolates (K3-A2, K12-A2, K25-A2 and K27- A2), the primers of which are described in
143 Table 1. In each PCR, a negative control and a positive control were included. The
144 amplification conditions were previously described for the *gyrA* gene by Brisse and
145 Verhoef *et al.*, (2001), for the *gyrB* and *parC* genes by Nam *et al.*, (2013) and for the
146 *ramR* gene by Bialek-Davenet *et al.*, (2011). The amplified products were subjected to
147 electrophoresis on 1% agarose gel under constant voltage of 100V, in TBE buffer (Tris-
148 boric-acid EDTA). The amplicons of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *ramR* genes were
149 purified (Kit: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega). After
150 purification, they were measured in nano-drops and sequenced (Sequencer 3500 Genetic
151 Analyzer- Applied Biosystems).

152

153 2.4. Analysis of mutations in the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *ramR* genes

154

155 For the analysis of mutations in the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *ramR* genes, 4 isolates
156 (K3-A2, K12-A2, K25-A2 and K27-A2) were selected. The sequences were compared
157 with the sequences deposited in the GenBank. The amino-acid sequences of *gyrA*, *gyrB*
158 and *parC* were analyzed to identify precise mutations with the respective changes in
159 their protein sequence (Sequence manipulation Suite -
160 http://www.bioinformatics.org/sms2/trans_map.html).

161 For the analysis of the sequences of the *ramR* regulator, the sequences were
162 compared with the sequence of the *K. pneumoniae* isolate MGH 78578 deposited in the
163 GenBank accession number: NC_009648 (Ogawa *et al.*, 2005). The *ramR* amino-acid
164 sequences were analyzed to identify precise mutations which foster superexpression of
165 the AcrAB-TolC efflux pumps. The sequences of this analysis have been deposited in
166 the GenBank under the following accession numbers: KP144334; KP144337;
167 KP144338 and KP271121.

168

169 2.5. Amplification of the *qnr*, *acrB* and *acrF* genes.

170

171 The *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *AcrB* and *acrF* resistance genes were investigated using
172 the PCR technique on 30 *K. pneumoniae* isolates, the primers of which are described in
173 Table 1. The amplification conditions were previously described for *qnrA*, *qnrB* and
174 *qnrS* genes by Robicsek *et al.*, (2006), Kim *et al.*, (2009) and Cattoir *et al.*, (2007) and
175 for the *acrB* and *acrF* genes by Bratu *et al.*, (2009) and Padilla *et al.*, (2010),
176 respectively. Four positive isolates (K3-A2, K12-A2, K19-A2 and K3-C2) for the *qnrB*
177 gene and four positive isolates (K3-A2, K12-A2, K25-A2 and K27-A2) for the *acrB* and
178 *acrF* genes were purified (Kit: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega)
179 and sequenced (Sequencer 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). All the

180 sequences were deposited in the GenBank under the following accession numbers:
181 KP144336; KP184842; KP184843 and KP184844.

182

183 2.6. RT-PCR for the *acrB* and *acrF* genes (efflux pumps).

184

185 The RNA (ribonucleic acid) of 4 *K. pneumoniae* isolates (K3-A2, K12-A2, K25-
186 A2 and K27-A2) was extracted using the SV Total RNA Isolation System Kit
187 (Promega) in accordance with the manufacturer's instructions, was quantified in nano-
188 drops and stored in a deep-freezer at -70°C. To evaluate the expression of the efflux
189 pumps by means of the presence or absence of the *acrB* and *acrF* transcripts, qualitative
190 RT-PCR was undertaken using the Access RT-PCR System Kit (Promega) in
191 accordance with the manufacturer's instructions. The amplified products were subjected
192 to electrophoresis on 1% agarose gel under constant voltage of 100V. In all the
193 reactions, a positive control supplied with the Kit and a negative control were used.

194

195 3. RESULTS

196

197 3.1. Profile of susceptibility to antimicrobials

198

199 All 30 isolates of *K. pneumoniae* analyzed showed resistance to amoxicillin,
200 amoxicillin/clavulanate, cefepime, cefotaxime, and piperacillin/tazobactam, amongst
201 which 96.7% (n=29) were resistant to aztreonam and ceftazidime, 93.4% (n=28) to
202 trimethoprim/sulfamethoxazole, 73.3% (n=22) to cefoxitin and 63.3% (n=19) to
203 gentamicin. As to the quinolones tested, the isolates demonstrated 100% resistance to
204 ciprofloxacin, 96.7% (n=29) resistance to nalidixic acid, 93.4% (n=28) resistance to

205 norfloxacin and 60% (n=18) resistance to levofloxacin, as well as high levels of
206 resistance to the carbapenems tested, there being 100% (n=30) resistance to ertapenem,
207 80% (n=24) resistance to meropenem and 73.3% (n=22) resistance to imipenem. The *K.*
208 *pneumoniae* isolates analyzed were more susceptible to polymyxin B and amikacin
209 when compared to the other antimicrobials: only 6.7% (n=2) were resistant to amikacin
210 and 10% (n=3) were resistant to polymyxin B (Table 2).

211

212 3.2. Analysis of mutation in the QRDRs of the *gyrA*, *gyrB* and *parC* genes

213

214 Analysis of gene mutations was performed on the representatives (K3-A2, K12-
215 A2, K25-A2 and K27-A2) with different clonal profiles. The isolates were analyzed for
216 the presence of mutations at the Ser83 and Asp87 positions for the *gyrA* gene, Ser80
217 and Glu84 for the *parC* gene and Ser359, Ser367 and Glu466 for the *gyrB* gene. In this
218 study, of the four isolates tested, two (K25-A2 and K27-A2) presented mutation in *gyrA*
219 in the Ser83 position where the exchange of one amino-acid resulted in the change of a
220 Serine to a Leucine. The mutated sequence has been deposited in the GenBank under
221 accession number: KP271120.

222 The isolate K25-A2, which is fluoroquinolone resistant, presents a mutation in
223 the QRDR of *gyrA* and did not present any of the *qnr* genes investigated (Table 3). On
224 the other hand, the isolate K27-A2 presents the *qnrB* gene associated with a mutation in
225 the QRDR of *gyrA* (Table 3). No mutation in *gyrB* nor in *parC* was found at the
226 positions analyzed (Table 3).

227

228 3.3. *qnr* genes

229

230 In this study, the PCR analysis showed that 73.3% (n = 22) of the isolates
231 showed the *qnrB* gene (Table 2). Sequencing of the selected isolates revealed the
232 presence of the *qnrB1* variant in 2 other isolates and the presence of the *qnrB12* gene in
233 other 2 isolates (Table 3). The isolates K3-A2 and K12-A2 showed both the *qnrB1* and
234 *bla_{KPC-2}* genes and the K19-A2 and K3-C2 isolates showed the *qnrB12* and *bla_{KPC-2}*
235 genes. No *qnrA* nor *qnrS* genes were found in the *K. pneumoniae* isolates analyzed.

236

237 3.4. Efflux pumps and the *ramR* regulator

238

239 The investigation of efflux pumps AcrB revealed the presence of the *acrB* gene
240 which encodes the TolC pump and the presence of the *acrF* gene which encodes the
241 acrEF-TolC pump in all of the 30 *K. pneumoniae* isolates analyzed. Using RT-PCR, the
242 transcription of the *acrB* and *acrF* genes in the 4 isolates selected was confirmed, thus
243 revealing the expression of both pumps investigated.

244 The K3-A2 and K12-A2 isolates, which express the two efflux pumps showed
245 no mutation in *gyrA*, but did in *qnrB1*. The isolate K25-A2, also with the two pumps,
246 showed mutation in *gyrA* but did not carry any of the *qnr* genes tested and the isolate
247 K27-A2, as well as the two pumps, presented mutation in *gyrA* and the presence of *qnrB*
248 (Table 3).

249 In the analysis of the sequence of the *ramR* regulator, mutations were investigate
250 at positions 58 G> C and 104 G>C in accordance with (Bialek-Davenet *et al.*, 2011)
251 and at positions 40 and A> T, 122 C> T, and 136 C> T in accordance with (Hentschke
252 *et al.*, 2010). The isolate K3-A2 presented mutations at positions 40 and 122. The 3
253 other isolates analyzed did not present mutation in *ramR* at the positions evaluated
254 (Table 3). The mutated sequence has been deposited in the GenBank with the following
255 Access number: KP730602.

256

257 **4. DISCUSSION**

258

259 Since the introduction of fluoroquinolones, resistance to these agents in the
260 Enterobacteriaceae family has become common and widespread. Nosocomial infections
261 by *K. pneumoniae* are often treated with extended-spectrum cephalosporins,
262 carbapenems, and fluoroquinolones. However, the mechanisms of resistance such as *qnr*
263 genes and carbapenemases were found to be promoting serious therapeutic problems
264 (Seyedpour *et al.*, 2014).

265 *Qnr* genes were mostly identified in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*,
266 including *K. pneumoniae* and have been shown to play not only an important role in
267 resistance to quinolones but also the resistance to other antibiotics, especially β -lactams
268 and aminoglycosides (Seyedpour *et al.*, 2014).

269 The resistance profile of *K. pneumoniae* isolates of this study suggests that the
270 high levels of resistance to quinolones and carbapenems are related to the junction of
271 more than one resistance mechanism which may be justified in this study because of the
272 presence of *bla*_{KPC-2}, *qnrB* genes and efflux pumps and may be well represented by the
273 K3-A2, K12-A2, K19-A2 and K3-C2 isolates (Table 3).

274 The data from this study reveal the presence of *bla*_{KPC-2} and *qnrB1*, as well as
275 *bla*_{KPC-2} and *qnrB12* in *K. pneumoniae* isolates. To date there are no reports published
276 in Brazil about the presence of *bla*_{KPC-2} with *qnrB1* or with *qnrB12*. Other studies have
277 demonstrated the presence of *qnr* genes together with other β -lactamases. Ferjani *et al.*,
278 (2014), in Tunisia, detected *qnrB1* associated with *bla*_{CTX-M-15} or *bla*_{SHV-12}. In France,
279 Fillipa *et al.*, (2013) found *qnrB1* with *bla*_{CTX-M-15}. In Brazil, Viana *et al.*, (2013)
280 reported the association of *qnrB1* with *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11} or *bla*_{OXA-18/45-like}. In
281 other countries there are also already some reports which associate *qnr* and *bla*_{KPC}.

282 Chmelnitsky *et al.*,(2008), described for the first time, in Israel, the presence of *bla*_{KPC}
283 and *qnrB2* in the same plasmid of *E. cloacae* isolate. In China, Jiang *et al.*, (2010) and
284 Zhang *et al.*, (2011), report, respectively, the presence of *bla*_{KPC-2} and *qnrB4*. And
285 *bla*_{KPC-2} and *qnrB2*, in *K. pneumoniae* isolates.

286 The isolates K19-A2 and K3-C2 presented the *qnrB12* gene, which was the first
287 report of this gene in *K. pneumoniae*. The *qnrB12* gene had previously been described
288 only in *Citrobacter werkmanii*, in Germany (Kehrenberg *et al.*, 2008) and in
289 *Citrobacter youngae*, in Finland (Gunell *et al.*, 2009). This study demonstrates the
290 emergence of this gene in isolates of *K. pneumoniae*, *bla*_{KPC-2} producers, in Brazil. It
291 should be noted that in *Citrobacter* spp., *qnrB12* seems to be a chromosomal gene.
292 While most *qnr* genes are present in plasmids in enterobacteria, there are few reports
293 that suggest a chromosomal location (Kehrenberg *et al.*, 2008). Kehrenberg *et al.*,
294 (2008) suggest that a plasmid harboring the *qnrB12* gene, similar to the pTN60012
295 plasmid of *K. pneumoniae*, may have been integrated into the chromosomal DNA of *C.*
296 *werkmanii*.

297 In this study, the *qnrB* was the plasmid-mediated quinolone resistance (PMRQ)
298 gene most commonly found in *K. pneumoniae* isolates in Recife, Brazil. The presence
299 of *qnrA* and *qnrS* genes was not detected. Few reports have detected the *qnrA* gene in
300 Brazil; the first report being in Minas Gerais, in isolates of *Enterobacter cloacae*
301 (Minarini *et al.*, 2007). Castanheira *et al.*, (2007), reported *qnrA1* in nosocomial isolates
302 of *E. coli*. in Porto Alegre (Yang *et al.*, 2014;Viana *et al.*, 2013).

303 Studies showed a high prevalence of *qnr* genes found in enterobacteria from
304 faeces of healthy children in South America (Peru and Bolivia), 54% of which
305 contained *qnrB* (Pallecchi *et al.*, 2009; Gunnel *et al.*, 2009). In Brazil, Veras *et al.*,
306 (2011) detected the *bla*_{SHV} gene in *K. pneumoniae* isolates from enteric microbiota of

307 healthy children in Recife-PE. These studies show the importance of commensal
308 bacteria as carriers of genes that are resistant to antimicrobials.

309 In this study, 80% of the isolates (n=24) resistant to quinolones and carriers of
310 *bla_{KPC}* are from colonization that may serve as a source of clinical infection or as an
311 important reserve for disseminating *bla_{KPC-2}* and *qnrB* in the hospital environment.
312 Colonization isolates can disseminate *bla_{KPC-2}* and *qnrB* among other organisms of the
313 same species or different species of bacteria in the same patient, since the *bla_{KPC-2}* gene
314 may be transmitted by plasmids from one strain to another (Mathers *et al.*, 2011).
315 Consequently, active surveillance of the spread of KPC-positive *K. pneumoniae*, and
316 other carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) has become an integral part of
317 programs designed to control the spread of CRE in various hospitals (Bilavsky *et al.*,
318 2010; Schwaber *et al.*, 2011; Borer *et al.*, 2012; Feldman *et al.*, 2013).

319 Papadimitriou-Olivgeris *et al.* (2014) reported that the high prevalence of enteric
320 *K. pneumoniae* carriers of *bla_{KPC}* resistant to colistin or tigecycline in ICU patients
321 indicate that dissemination is due to its transfer from patient to patient via professionals
322 and this also indicates the importance of stringent protocols to control hospital infection.

323 The K19-A2 and K25-A2 isolates, also investigated in another study with regard
324 to virulence (Melo *et al.*, 2014), presented *fimH* and *mrkD* virulence genes (fimbrial
325 adhesins), and K25-A2 besides these genes, the *irp2* gene (siderophore yersinia bacteria)
326 was also present. These findings bring out the gravity and importance of the fact that
327 colonization isolates besides having efflux pumps (*AcrAB* and *AcrEF*), the presence of
328 resistance genes (*qnrB* and *bla_{KPC-2}*) and mutations in *gyrA*, leading to resistance to
329 quinolones and other antimicrobial agents, also have virulence genes that are important
330 for the establishment of the infection (Table 3).

331 In this study, no mutations the QRDRs of *gyrB* and *parC* were detected. These
332 findings corroborate those of Paiva *et al.*, (2012) who also did not detect any mutation
333 in *gyrB*. According to Kim *et al.*, (2009) and Nam *et al.*, (2013), mutations in *gyrB* and
334 *parE* are substantially less frequently detected and confer lower levels of resistance
335 when compared with *gyrA* and *parC*. In this study, a mutation was detected in *gyrA*
336 (S83L) in two isolates of *K. pneumoniae*. Machuca *et al.*, (2014) have shown that a
337 single substitution in *gyrA* increases the values of the MICs for fluoroquinolones by up
338 to 16 times, a fact that may explain the resistance to fluoroquinolone, even without the
339 presence of the *qnr* gene in the K25-A2 isolate. Interactions between mutations in
340 QRDRs and *qnr* and may result in a higher level of resistance to fluoroquinolone. The
341 *qnr* gene alone confers low-level resistance to quinolones. Its main contribution is to
342 facilitate the development of mutations in QRDRs (Wu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014.).
343 Machuca *et al.*, (2014) observed that the presence of any *qnr* gene increases the levels of
344 MICs in all genotypes of *E. Coli* and that combinations of only one chromosomal
345 mechanism, with mutations in QRDRs, with *qnr* genes increased the values of the MICs
346 from 4 to 32 times and from 32 to 128 times greater than the genetic equivalent without
347 the *qnr* gene.

348 Overexpression of efflux pumps may also play a high role in the resistance level.
349 It is believed that the efflux systems by themselves produce low levels of resistance to
350 different classes of antimicrobial agents including quinolones, chloramphenicol and β -
351 lactam (Biaek-Davenet *et al.*, 2011), and become clinically relevant when combined
352 with mutations in target enzymes or membrane changes (Guan *et al.*, 2013). In this
353 study, we found that 73.3% (n=22) of isolates, besides efflux pumps, presented *qnrB*
354 genes. It was also detected that the isolate K3-A2 showed mutation in *ramR* which can
355 lead to an overexpression of the AcrAB efflux pump. The location of the mutations in

356 the *ramR* sequence, detected in this study, corroborate both Hentschke *et al.*, (2010),
357 and Biaek-Davenet *et al.*, (2011), since mutations in the locations described in both
358 studies are presented. Prompt mutations occur in different positions and these genetic
359 changes are distributed throughout the *ramR* gene which can lead to further
360 modification of the amino acid, a premature "stop codon" or truncated synthesis of the
361 protein RamR (Biaek-Davenet *et al.*, 2011).

362 Hentschke *et al.*, (2010) found precise mutations in the *ramR* gene in 8 of 17
363 mutants and these mutations proved to be responsible for the overexpression of both
364 *ramA* and *acrB* genes. Biaek-Davenet *et al.*, (2011) report that the *ramR* gene controls
365 the expression of the efflux system in *K. pneumoniae*. However, the location of the
366 mutations in the sequence found in their study were different from those described by
367 Hentschke *et al.*,(2010).

368 The AcrEF efflux system, also detected in all the isolates of *K. pneumoniae*
369 analyzed in this study, may confer an advantage on the organisms because AcrEF may
370 be necessary for the resistance to medications when AcrAB does not work. Further
371 investigations of the regulation of multidrug efflux systems are needed to elucidate the
372 biological significance of their regulatory networks (Nishino, Hayashi-Nishino;
373 Yamaguchi, 2009).

374 The colonization isolate K3-A2 besides being the carrier of the *bla_{KPC-2}* gene,
375 also showed the *qnrB1* gene, an expression of both efflux pumps analyzed and mutation
376 in *ramR*, which may result in overexpression of the AcrAB efflux pump. Additionally,
377 all the other isolates presented at least one resistance mechanism to quinolone
378 associated with *bla_{KPC-2}*, which can already cause failure in therapy.

379 This study shows patients colonized with *K. pneumoniae*, carriers of the *bla_{KPC-2}*
380 gene, *qnrB*, mutation in *gyrA*, expression of efflux pumps and mutation in *ramR*.

381 Colonized patients usually require long-term medical care and can play an important
382 role in the spread of these extremely resistant pathogens. The high prevalence of these
383 isolates in ICU patients and significant mortality rates associated with infection by *K.*
384 *pneumoniae*, carriers *bla_{KPC}*, demonstrate the importance of identifying, isolating and
385 treating these patients early (Lin *et al*, 2013; Papadimitriou- Olivgeris *et al.*, 2013).

386 To date there are no published Brazilian studies evaluating the presence of *qnr*
387 genes, as well as the presence of mutations in *gyrA*, *gyrB* and *parC* in KPC-2-positive
388 *K. pneumoniae* isolates. Additionally, in Brazil, there are no reports in the literature
389 surveyed of the *acrAB-TolC*, *acrEF-TolC* efflux systems and their regulators in *K.*
390 *pneumoniae*. In this study, was observed the emergence of different resistant
391 mechanisms to quinolones in KPC-2-positive isolates of *K. pneumoniae*, from
392 colonization and infection of patients hospitalized in Recife, Brazil. These findings
393 underscore the need for systematic studies aimed at a better understanding of these
394 mechanisms in the resistance and virulence of these bacteria, to prevent any spread of
395 these associations, and that infection control measures be adopted early, thus
396 interrupting the spread of these resistance mechanisms and increasing patient survival.

397

398 5. ACKNOWLEDGEMENTS

399

400 We are grateful to the Central Laboratory of the CCB/UFPE- LABCEN for the
401 sequencing, especially Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes and Heidi Lacerda. MSc.
402 We are also grateful to Adriane Cabral Borges. MSc for the support in the deposit of the
403 sequences in GenBank and to Dayse Vasconcelos, MSc for her assistance in the analysis
404 of mutations.

405

406

407 6. REFERENCES

408

- 409 Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J. P., Bert, F.,
410 Moreau, R., Nicolas-Chanoine, M. H. (2010). *In*
411 *vitro* selection of ramR and soxR mutants overexpressing efflux systems by
412 fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob*
413 *Agents Chemother* 55, 2795–2802.
- 414 Bilavsky, E., Schwaber, M. J., Carmeli, Y. (2010). How to stem the tide of
415 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae?: proactive vs. reactive strategies.
416 *Curr Opinion Infect Dis* 23, 327–331.
- 417 Borer, A., Saidel-Odes, L., Eskira, S., Nativ, R., Riesenber, K., Livshiz-Riven,
418 I., Schlaeffer, F., Sherf, M., Peled, N. (2012). Risk factors for developing
419 clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital
420 patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Am J*
421 *Infect Control* 40, 421–425.
- 422 Bratu, S., Landman, D., George, A., Salvani, J., Quale, J. (2009). Correlation of the
423 expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with
424 antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to
425 New York City. *J Antimicrob Chemother* 64, 278–283.
- 426 Brisse, S., Verhoef, J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and
427 *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic
428 DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol*
429 *Microbiol* 51, 915–924.

- 430 Cabral, A. B., Melo, R. C. A., Maciel, M. A. V., Lopes, A. C. S. (2012). Multidrug
431 resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae*
432 isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **45**, 572-578.
- 433 Castanheira, M., Pereira, A. S., Nicoletti, A. G., Pignatari, A. C. C. (2007). First
434 Report of Plasmid-Mediated *qnrA1* in a Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*
435 Strain in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 1527-1529.
- 436 Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., Nordmann, P. (2007). Multiplex
437 PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-
438 producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* **60**, 394-397.
- 439 Clinical Laboratory Standards Institute- CLSI (2014). Performance Standards for
440 Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement,
441 M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.,
- 442 Chiu, S., Wu, T., Chuang, Y., Lin, J., Fung, C., Lu, L., Wang, J., Wang, L., Siu, K.
443 & other authors (2013). National Surveillance Study on Carbapenem Non-
444 Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: The Emergence and Rapid
445 Dissemination of KPC-2 Carbapenemase. *Pos one* **8**, 1-7.
- 446 Chmelnitsky, I., Navon-Venezia, S., Strahilevitz, J., Carmeli, Y. (2008). Plasmid-
447 mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *bla(KPC-2)* carried on the same plasmid
448 in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates.
449 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 2962-2965.
- 450 De Majumdar, S., Yu, J., Spencer, J., Tikhonova, I. G., Schneiders, T. (2014).
451 Molecular basis of non-mutational derepression of *ramA* in *Klebsiella*
452 *pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **69**, 2681-2689.
- 453 Endimiani, A., Carias, L. L., Hujer, A. M., Bethel, C. R., Hujer, K. M., Perez, F.,
454 Hutton, R. A., Fox, W. R., Hall, G. S. & other authors (2008). Presence of

- 455 plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolate
456 possessing *bla*KPC in the United States. *Antimicrobial Agents and*
457 *Chemotherapy* 52, 2680-2682.
- 458 **Feldman, N., Adler, A., Molshatzki, N., Navon-Venezia, S., Khabra, E., Cohen,**
459 **D., Carmeli, Y. (2013).** Gastrointestinal colonization by KPC
460 producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of
461 carriage and risk factors for persistent carriage. *Clin Microbiol Infect* 19,190–196.
- 462 **Ferjani, S., Saidani, M., Molshatzki, N., Navon-Venezia, S., Khabra, E., Cohen,**
463 **D., Carmeli, Y. (2014).** Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated
464 Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing
465 Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital. *Microb Drug Resist*,DOI:
466 10.1089/mdr.2014.0053.
- 467 **Fillipa, N., Carricajo, A., Grattard, F., Fascia, P., El Sayed, S., Defilippis, J. P.,**
468 **Berthelot, P., Aubert, G. (2013).** Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella*
469 *pneumoniae* carrying *qnrB1* and *bla*CTX-M15 in a French intensive care unit.
470 *Microb Drug Resist*,3 1-4.
- 471 **Guan, X., Xue, X., Liu, Y., Wang, J., Wang, Y., Wang, J., Wang, K., Jiang,**
472 **H., Zhang, L. & other authors (2013).** Plasmid-mediated quinolone resistance--
473 current knowledge and future perspectives. *J Int Med Res* 41, 20-30.
- 474 **Gunell, M., Hakanen, A. J., Jalava, J., Huovinen, P., Osterblad, M. (2009).** Hidden
475 *qnrB12* gene in a Finnish faecal microbiota isolate from 1994. *J Antimicrob*
476 *Chemother* 64, 861-878.
- 477 **Hentschke, M., Wolters, M., Sobottka, I., Rohde, H., Aepfelbacher, M. (2010).**
478 *ramR* mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced
479 susceptibility to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2720-2723.

- 480 **Jacoby, G., Bush, K.** β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM,
481 SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes
482 [<http://www.lahey.org/studies>].
- 483 **Jiang, Y., Yu, D., Wei, Z., Shen, P., Zhou, Z., Yu, Y.** (2010).
484 Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plas
485 mid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. *Antimicrob*
486 *Agents Chemother* **54**, 3967-3969.
- 487 **Kehrenberg, C., Friederichs, S., Jong, A., Schwarz, S.** (2010). Novel Variant of the
488 *qnrB* Gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**,
489 1206-1207.
- 490 **Kim, H. B., Park, C. H., Kim, C. J., Kim, E. C., Jacoby, G. A., Hooper, D. C.**
491 (2009). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over
492 a 9-Year Period. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 639–645.
- 493 **Lin, M. Y., Lyles-Banks, R. D., Lolans, K., Hines, D. W., Spear, J. B., Petrak,**
494 **R., Trick, W. E., Weinstein, R. A., Hayden, M. K.** (2013). The importance of
495 long-term acute care hospitals in the regional epidemiology
496 of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Centers
497 for Disease Control and Prevention Epicenters Program. *Diagn Microbiol Infect*
498 *Dis* **77**, 169-173.
- 499 **Lolans, K., Calvert, K., Won, S., Clark, J., Hayden, M. K.** (2010). Direct Ertapenem
500 Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing *Klebsiella*
501 *pneumoniae* and *Escherichia coli* in Surveillance Swab Specimens. *Journal of*
502 *Clinical Microbiology* **48**, 836-841.
- 503 **Machuca, J., Briales, A., Labrador, G., Díaz-de-Alba, P., López-Rojas, R.,**
504 **Docobo-Pérez, F., Mart nez-Mart nez, L., Rodríguez-Ban o, J., Pacho n,**

- 505 M. E. & other authors (2014). Interplay between plasmid-mediated and
506 chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in
507 *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **69**, 1-13.
- 508 Mathers, A. J., Cox, H. L., Kitchel, B., Bonatti, H., Brassinga, A. K., Carroll,
509 J., Scheld, W. M., Hazen, K. C., Sifri, C. D. (2011). Molecular dissection of an
510 outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae reveals intergenus KPC
511 carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *MBio* **2**, 1-7.
- 512 Minarini, L. A. R., Gales, A. C., Darini, A. L. C. (2007). First Report of Plasmid-
513 Mediated Resistance to Quinolones and Cefotaxime in an *Enterobacter cloacae*
514 Strain Isolated from an Outpatient in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **51**,
515 401-402.
- 516 Melo, R. C. A., Barros, E. M. R., Loureiro, N. G., Melo, H. R., Maciel, M. A. V.,
517 Lopes, A. C. S. (2014). Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in
518 KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. *Current*
519 *Microbiology* **69**, 824-31.
- 520 Nam, Y. S., Cho, S. Y., Yang, H. Y., Park, K. S., Jang, J. H., Kim, Y. T., Jeong, J.
521 W., Suh, J. T., Lee, H. J. (2013). Investigation of mutation distribution in DNA
522 gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible
523 Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university
524 hospital in South Korea, 2005-2010. *Int J Antimicrob Agents* **41**, 126-129.
- 525 Nishino, K., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. (2009). H-NS Modulates
526 Multidrug Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by Repressing
527 Multidrug Efflux Genes *acrEF*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3541-3543.

- 528 **Ogawa, W., Li, D. W., Yu, P., Begum, A., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T.**
529 **(2005).** Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of
530 genes responsible for the resistance. *Biol Pharm Bull* **28**, 1505-1508
- 531 **Padilla, E., Llobet, E., Dome´nech-Sa´nchez, A., Martınez-Martınez, L., Bengoechea,**
532 **J.A., Albertı, S. (2010).** *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to
533 Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 177-183.
- 534 **Paiva, M. C., Nascimento, A. M., Camargo, I. L., Lima-Bittencourt, C. I., Nardi, R.**
535 **M. (2012).** The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6´)-Ib-cr genes in
536 urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. *Mem Inst*
537 *Oswaldo Cruz* **107**, 687-689.
- 538 **Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Bartalesi, F., Sennati, S., Gamboa,**
539 **H., Gotuzzo, E., Bartoloni, A., Rossolini, G. M. (2009).** High prevalence of qnr
540 genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia.
541 *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2632–2635.
- 542 **Peirano, G., Asensi, M. D., Pitondo-Silva, A., Pitout, J. D. (2011).** Molecular
543 characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from
544 Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1039-1043.
- 545 **Papadimitriou-Olivgeris, M., Christofidou, M., Fligou, F., Bartzavali, C., Vrettos,**
546 **T., Filos, K. S., Marangos, M., Anastassiou, E. D. (2014).** The role
547 of colonization pressure in the dissemination of colistin or tigecycline
548 resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients.
549 *Infection* **42**, 883-890.
- 550 **Papadimitriou-Olivgeris, M., Marangos, M., Fligou, F., Christofidou, M., Sklavou,**
551 **C., Vamvakopoulou, S., Anastassiou, E. D., Filos, K. S. (2013).** KPC-
552 producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive

- 553 care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact
554 on mortality. *Clin Microbiol Infect* **19**, 169-173.
- 555 Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D. F., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. (2006).
556 *qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the
557 United States. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2872–2874.
- 558 Schechner, V., Kotlovsky, T., Kazma, M., Mishali, H., Schwartz, D., Navon-
559 Venezia, S., Schwaber, M. J., Carmeli, Y. (2013). Asymptomatic rectal carriage
560 of bla(KPC) producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to
561 become clinically infected? *Clin Microbiol* **19**, 451-456
- 562 Schwaber, M. J., Lev, B., Israeli, A., Solter, E., Smollan, G., Rubinovitch,
563 B., Shalit, I., Carmeli, Y. (2011). Containment of a country-wide outbreak of
564 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally
565 implemented intervention. *Clin Infect Dis* **52**, 848–855.
- 566 Seyedpour, S. M., Eftekhar, F. (2014). Quinolone Susceptibility and Detection of *qnr*
567 and *aac(6′)-Ib-cr* Genes in Community Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Jundishapur*
568 *J Microbiol* **7**, 1-4.
- 569 Siu, L. K., Yeh, K. M., Lin, J. C., Fung, C. P., Chang, F. Y. (2012). *Klebsiella*
570 *pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect Dis* **12**, 881–
571 887.
- 572 Veras, D. L., Alves, L. C., Brayner, F. A., Guedes, D. R., Maciel, M. A., Rocha, C.
573 R., Souza Lopes, A. C. (2011). Prevalence of the bla (SHV) gene in *Klebsiella*
574 *pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from
575 the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* **62**, 1610-
576 1616.

- 577 **Viana, A. L. M., Caiô, R., Avelino, C. C., Gales, A. C., Franco, M. C., Minarini, L.**
578 **A. R. (2013).** Extended-spectrum b-lactamases in Enterobacteriaceae isolated in
579 Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes.
580 *Journal of Medical Microbiology* **62**, 1326-1331.
- 581 **Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., García-Fernández, A., Carattoli, A. (2014).**
582 **Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone**
583 **Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring**
584 **Tigecycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 1707–1712.**
- 585 **Wu, W. Y., Wang, H., Lu, J., Wu, J., Chen, M., Xu, Y., Lu, Y. (2010).** Genetic
586 diversity of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* and *Paratyphi* in Shenzhen, China
587 from 2002 through 2007. *BMC Microbiol* **10**, 1-7.
- 588 **Yang, H. Y., Nam, Y. S., Lee, H. J. (2014).** Prevalence of plasmid-mediated
589 quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli*
590 and *Klebsiella pneumonia* isolated from blood cultures in Korea. *Can J Infect Dis*
591 *Med Microbiol* **25**, 163-169.
- 592 **Zhang, Z., Meng, X., Wang, Y., Xia, X., Wang, X., Xi, M., Meng, J., Shi, X., Wang,**
593 **D. & other authors (2014).** Presence of qnr, aac(6 ϕ)-Ib, qepA, oqxAB, and
594 Mutations in Gyrase and Topoisomerase in Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella*
595 Isolates Recovered from Retail Chicken Carcasses. *Foodborne Pathog Dis* **11**,
596 698-705.
- 597 **Zhang, R., Wang, X. D., Cai, J. C., Zhou, H. W., Lv, H. X., Hu, Q. F., Chen, G. X.**
598 **(2011).** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2- producing *K.*
599 *pneumoniae* with high qnr prevalence in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* **60**,
600 977-982.
- 601

Table

[Click here to download Table: Tabelas artigo 1.docx](#)**Table 1: Primers used in PCR and DNA sequencing for detection of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *ramr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *AcrB* and *acrF* genes.**

Primer	Sequencing (5' - 3')	temp. ^(*)	References	Gene
<i>gyrA</i> F	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	55°C	Brisse e Verhoef <i>et al.</i> , (2001)	<i>gyrA</i>
<i>gyrA</i> R	ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG			
<i>gyrB</i> F	ATGGATAAAGAAGGCTACAGCA	65°C	Nam <i>et al.</i> , (2013)	<i>gyrB</i>
<i>gyrB</i> R	TCGACGTCCGCATCGGTCAT			
<i>parC</i> F	ATGTACGTGATCATGGACAG	55°C	Nam <i>et al.</i> , (2013)	<i>parC</i>
<i>parC</i> R	ATTCGGTGTAACGCATGGC			
<i>ramR</i> F	CACGGTTCATATCCTGACCA	60°C	Bialek-Davenet <i>et al.</i> , (2011)	<i>ramR</i>
<i>ramR</i> R	CCRTCACCTTAAACACGTC			
<i>qnrA</i> F	ATTTCTCACGCCAGGATTG	54°C	Robicsek <i>et al.</i> , (2006)	<i>qnrA</i>
<i>qnrA</i> R	GATCGGCAAAGGTTAGGTC			
<i>qnrB</i> -For	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	63°C	Kim <i>et al.</i> , (2009)	<i>qnrB</i>
<i>qnrB</i> -Rev	ATGAGCAACGATGCCTGGTA			
<i>qnrS</i> F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	64°C	Cattoir <i>et al.</i> , (2007)	<i>qnrS</i>
<i>qnrS</i> R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG			
<i>acrB</i> F	TCAAACCAGGTGTGCAGGTA	61°C	Bratu <i>et al.</i> , (2009)	<i>acrB</i>
<i>acrB</i> R	TTAATACCCAGACCGGATGC			
<i>acrU7</i>	GAGCTGATTGACCAGG	61°C	Padilha <i>et al.</i> , (2010)	<i>acrF</i>
<i>acrL4</i>	CTGATAAGACATCCCGGTCCA			

Legend: temp.^(*): annealing temperature.

Table 2: Origin, presence of the *qnrB*, *acrB*, *acrF* genes, ERIC-PCR profile and resistance profile of the hospital of KPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates of Recife, Brazil.

Identification of Isolates ^(a)	Origin	<i>qnrB</i>	<i>acrB</i>	<i>acrF</i>	ERIC ^(b)	Resistance Profile ^(c)
K3-A2	Rectal swab	+	+	+	5E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,POL,SUT
K8-A2	Rectal swab	+	+	+	9E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K9-A2	Rectal swab	+	+	+	9E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO(γ),CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,PIT,SUT
K10-A2	Urine	+	+	+	9E	AMC,AMO,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL(γ),ERT,GEN,IMP,MPM,
K12-A2	Urine	+	+	+	9E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,POL,SUT
K14-A2	Rectal swab	+	+	+	12E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K15-A2	Rectal swab	+	+	+	13E	AMC,AMO,CAZ(γ),CFO(γ),CPM,CTX,CIP,ERT,GEN,IMP,PIT
K16-A2	Rectal swab	+	+	+	13E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO(γ),CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K17-A2	Rectal swab	+	+	+	13E	AMC,AMO,ATM,AMI(γ),CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K18-A2	Rectal swab	+	+	+	39E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO(γ),CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K19-A2	Rectal swab	+	+	+	14E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K20-A2	Rectal swab	+	+	+	15E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,IMP,MPM,PIT,SUT
K21-A2	Rectal swab	+	+	+	5E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K24-A2	Rectal swab	+	+	+	17E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV(γ),NAL,NOR(γ),ERT,IMP,MPM,PIT
K25-A2	Rectal swab	-	+	+	18E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,MPM,PIT,SUT
K26-A2	Tracheal aspirate	-	+	+	18E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO(int),CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,PIT,SUT
K27-A2	Rectal swab	+	+	+	19E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,PIT,SUT
K29-A2	Rectal swab	-	+	+	19E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,IMP,MPM,PIT,SUT
K30-A2	Rectal swab	+	+	+	40E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP(γ),PIT,SUT
K31-A2	Urine	-	+	+	20E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO(γ),CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,IMP(γ),PIT,SUT
K32-A2	Rectal swab	-	+	+	19E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,IMP,MPM,PIT,SUT
K33-A2	Rectal swab	+	+	+	19E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,IMP,MPM,PIT,SUT
K34-A2	Rectal swab	+	+	+	21E	AMC,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K1-C2	Rectal swab	+	+	+	23E	AMC,AMI(γ),AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K2-C2	Rectal swab	+	+	+	23E	AMC,AMI(γ),AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT
K3-C2	Rectal swab	+	+	+	41E	AMC,AMI,AMO,ATM,CAZ,CFO,CPM,CTX,CIP,LEV,NAL,NOR,ERT,GEN,IMP,MPM,PIT,SUT

K1-OC	Rectal swab	+	+	+	25E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM, CTX, CIP, LEV(†), NAL, NOR, ERT, GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K3-OC	Rectal swab	-	+	+	27E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM, CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM, PIT, SUT
K5-OC	Urine	-	+	+	42E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO(†), CPM, CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP(†), PIT, SUT
K6-OC	Tracheal aspirate	-	+	+	43E	AMC, AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM, CTX, CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP(†), MPM, PIT, SUT

Legend: Identification of Isolates ^(a): *K. pneumoniae*; A2, C2 and OC: public hospital; ERIC^(b): Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus -Melo *et al.*, (

2014); (*): amoxicillin-clavulanic acid (AMC); amoxicillin (AMO); amikacin (AMK); aztreonam (ATM); ceftazidime (CAZ); cefoxitin (CFO); cefotaxime (CTX); cefepime (CEP); piperacillin/tazobactam (PIT); polynyxin B (POL); trimethoprim/sulfamethoxazole (SUT); gentamicin (GEN); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); nalidixic acid (NAL); levofloxacin (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) and ertapenem (ERT).

Table 3: Characteristics of the isolates selected.

Identification of Isolates ^(a)	Origin	Mutation in the <i>gyrA</i>	<i>acrB</i>	<i>acrF</i>	Mutation in the <i>ramR</i>	PMQR Genes ^(b)	Virulence genes ^(c)	ERIC ^(d)	PROFILE OF RESISTANCE TO QUINOLONES AND CARBAPENEMS ^(e)
K3-A2	Swab rectal	-	+	+	40 A>T 122 C>T	<i>qnrB1</i>	-	5E	CIP, LEV(†), NAL, NOR, ERT, IMP, MPM
K12-A2	Urina	-	+	+	-	<i>qnrB1</i>	ND	9E	CIP, LEV(†), NAL, NOR, ERT, IMP, MPM
K19-A2	Swab rectal	ND	+	+	ND	<i>qnrB12</i>	<i>flmH, mrkD</i>	14E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM
K25-A2	Swab rectal	S(83)L	+	+	-	-	<i>flmH, mrkD, irp2</i>	18E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, MPM
K27-A2	Swab rectal	S(83)L	+	+	-	<i>qnrB</i>	ND	19E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT
K3-C2	Swab rectal	ND	+	+	ND	<i>qnrB12</i>	ND	41E	CIP, LEV, NAL, NOR, ERT, IMP, MPM

Legend: Identification of Isolates ^(a): *K. pneumoniae*; A2 and C2: public hospital; (b): PMQR: plasmid-mediated quinolone resistance; (c): Melo *et al.*, (2014); (d):

ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus -Melo *et al.*, (2014); ND: not determined; (*): ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); nalidixic acid (NAL);

levofloxacin (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) and ertapenem (ERT); I: intermediate susceptibility.

Microbial Drug Resistance

Microbial Drug Resistance

Mechanisms, Epidemiology, and Disease

Microbial Drug Resistance: <http://mc.manuscriptcentral.com/mdr>

Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in *Klebsiella pneumoniae* multiresistant isolates carrying blaKPC-2 gene and efflux pumps.

Journal:	<i>Microbial Drug Resistance</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Mechanisms
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lima, Alexsandra; UFPE, LIKA Veras, Dyana; UFPE, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Alves, Luiz; UFPE, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Santos, F�bio; UFPE, Departamneto de Medicina Tropical
Keyword:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , Meropenem
Abstract:	The ultrastructural alterations caused by polymyxin B, meropenem and by the association between polymyxin B and meropenem were investigated in 2 multiresistant isolates of <i>K. pneumoniae</i> (K3-A2 and K12-A2) carriers of blaKPC-2 and efflux pumps (acrAB and acrEF), coming from infection and colonization in patients of a public hospital in Recife, Brazil. The ultrastructural changes were detected by transmission electron microscopy and scanning. The susceptibility of the isolates to antimicrobials was tested by the disk diffusion method and microdilution in broth. The analysis by electron microscopy showed that the isolates presented morphological and ultrastructural cellular changes when subjected to a clinically relevant concentration of antimicrobials alone or associated ones. When subjected to meropenem, they presented retraction of the cytoplasmic material, rupture of the cell wall and extravasation of the cytoplasmic content. When submitted to polymyxin B, the isolates showed condensation of the ribosomes, DNA clotting, cell wall thickening and the presence of membrane compartment. When subjected to the association of polymyxin B and meropenem, the isolates showed a higher intensity of the ultrastructural changes visualized. This is the first report of the ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant isolates of <i>K. pneumoniae</i> carriers of the blaKPC-2 gene. It should be noted that even when the <i>K. pneumoniae</i> isolates analyzed were multi-resistant, carriers of the blaKPC-2 gene and efflux pumps, they underwent important structural change with the action of polymyxin B and meropenem.

SCHOLARONE™
Manuscripts

Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only/Not for Distribution

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Short title: Alterações ultraestruturais in *Klebsiella pneumoniae*.

Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in *Klebsiella pneumoniae* multiresistant isolates carrying *bla_{KPC-2}* gene and efflux pumps.

Alexsandra Maria Lima Scavuzzi^{1,2}, Luiz Carlos Alves², Dyana Leal Veras², Fábio André Brayner^{1,2} Ana Catarina Souza Lopes¹

¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50.732-970, Recife-PE, Brasil.

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-Fiocruz), Recife-PE, Brasil.

Correspondence to:

MSc. Alexsandra Maria da Silva Lima

Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.

Morais Rego, s/n. Recife-PE, Brazil 50.732-970

Tel.: +55 81 21268526

Fax: +55 81 21268528

e-mail address: alexsandramariah@gmail.com

Financial Support: FACEPE.

1
2
3 **Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in *Klebsiella***
4
5 ***pneumoniae* multiresistant isolates carrying *bla*_{KPC-2} gene and efflux pumps.**
6
7

8
9
10 **Abstract**

11 The ultrastructural alterations caused by polymyxin B, meropenem and by the
12 association between polymyxin B and meropenem were investigated in 2 multiresistant
13 isolates of *K. pneumoniae* (K3-A2 and K12-A2) carriers of *bla*_{KPC-2} and efflux pumps
14 (*acrAB* and *acrEF*), coming from infection and colonization in patients of a public
15 hospital in Recife, Brazil. The ultrastructural changes were detected by transmission
16 electron microscopy and scanning. The susceptibility of the isolates to antimicrobials
17 was tested by the disk diffusion method and microdilution in broth. The analysis by
18 electron microscopy showed that the isolates presented morphological and
19 ultrastructural cellular changes when subjected to a clinically relevant concentration of
20 antimicrobials alone or associated ones. When subjected to meropenem, they presented
21 retraction of the cytoplasmic material, rupture of the cell wall and extravasation of the
22 cytoplasmic content. When submitted to polymyxin B, the isolates showed
23 condensation of the ribosomes, DNA clotting, cell wall thickening and the presence of
24 membrane compartment. When subjected to the association of polymyxin B and
25 meropenem, the isolates showed a higher intensity of the ultrastructural changes
26 visualized. This is the first report of the ultrastructural changes caused by polymyxin B
27 and meropenem in multiresistant isolates of *K. pneumoniae* carriers of the *bla*_{KPC-2} gene.
28 It should be noted that even when the *K. pneumoniae* isolates analyzed were multi-
29 resistant, carriers of the *bla*_{KPC-2} gene and efflux pumps, they underwent important
30 structural change with the action of polymyxin B and meropenem.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, polymyxin B, meropenem, ultrastructure.

INTRODUCTION

Carbapenems have become the treatment of choice for severe infections caused by gram-negative nosocomial pathogens, including the Enterobacteriaceae family, producers of β -lactamases of extended spectrum (ESBLs). The increasing use of carbapenems was predictably followed by the appearance of resistance to these antimicrobials^{8,17}. The enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) confers resistance to all β -lactams including carbapenems^{23,24}.

The high prevalence of colonized patients in an intensive care unit (ICU) and significant mortality rates associated with the infection of *K. pneumoniae* carriers of the *bla*_{KPC-2} gene demonstrate the importance of identifying, isolating and treating these patients early^{22,31}.

Polymyxins are reserved for the therapy remaining from infections caused by KPC-producing bacteria, as most of these organisms remained susceptible to this antimicrobial¹². The most common treatment modality for KPC-producing organisms, including in Brazil, is the use of combined therapy, for example, polymyxin B or polymyxin E, in association with carbapenem, aminoglycosides or tigecycline¹. These associations have recently been associated with the improved survival of patients with bacteremia^{27,21}.

In the age of increasing resistance associated with a decrease in the arsenal of antibiotics, attention should be drawn to the role of combination therapy²¹. The global problem of the advance of antimicrobial resistance has recently led to a renewed interest in using polymyxin B².

1
2
3 AcrAB-TolC and AcrEF-TolC are multi-drug efflux systems present in most
4
5 enteric bacteria and the increased in the expression of these pumps results in reducing
6
7 intracellular concentrations of various antimicrobials, including fluoroquinolones, β -
8
9 lactams, macrolides, tetracycline, polymyxin B, chloramphenicol and tigecycline ^{43,3,28}.

10
11
12
13
14 Bacteria employ various means to protect themselves from adverse
15
16 environmental stimuli, including exposure to antimicrobial cationic peptides such as
17
18 polymyxin B. These strategies include changes in their lipopolysaccharides, which have
19
20 generally negative loads and are the initial targets of polymyxins ²⁶, as well as the
21
22 formation of the capsule and the use of the efflux pump AcrAB-TolC ^{9,30}.

23
24
25 When the bacteria divide in the presence of a β -lactam, deficient forms of cell
26
27 wall are produced. As the bacterial intracellular environment is hyperosmotic, the cells
28
29 swell up and rupture ⁴². To date, there are no published studies that enable an
30
31 assessment and comparison to be made of the ultrastructural changes caused by
32
33 antibiotics used in the treatment suggested for infections by *K. pneumoniae*, the carrier
34
35 of the *bla*_{KPC-2} gene, such as, for example, polymyxin and associations.

36
37
38 The objective of this study was to investigate and compare the ultrastructural
39
40 changes caused by polymyxin B and meropenem, by the association between
41
42 polymyxin B and meropenem in multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates carrying
43
44 the *bla*_{KPC-2} gene and efflux pumps, coming from colonization and infection in patients
45
46 from a public hospital in Recife, Brazil.

47 48 49 50 51 52 2. MATERIALS AND METHODS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.1. Bacterial isolates

For this study 2 isolates were selected of *K.pneumoniae* (K3-A2 and K12-A2) resistant to 18 antimicrobials and positive for the *bla_{KPC-2}* gene, coming from colonization (rectal swab) and urinary tract infection of patients from a public hospital in the city of Recife, Brazil, identified biochemically by the automated system Bactec 9120/ Phoenix-BD. (Table 1). The selected isolates are part of the stock of bacterial cultures already typed as to the resistance profile, the ERIC-PCR profile and presence of the *bla_{KPC-2}* gene²⁴, and do not present a clonal relationship. The *K.pneumoniae* isolates also have *acrAB* and *acrEF* efflux pumps, and the presence of mutations in the regulatory *ramR* gene³⁶. Bacterial cultures are preserved in 20% glycerol at -70°C and to conduct the analyses, they were grown in a Brain Heart Infusion (BHI) medium at 37°C for 18 hours.

2.2. Test of susceptibility to antimicrobials

The *K. pneumoniae* isolates were seeded on Mueller-Hinton agar (Biolife) and the susceptibility of the isolates to different classes of antimicrobials was detected by the automated BD Phoenix system and the disk diffusion method proposed by Kirby and Bauer. The following antimicrobials were tested: amoxicillin-clavulanate acid (AMC); amoxicillin (AMO); amikacin (AMI); aztreonam (ATM); ceftazidime (CAZ); cefoxitin (CFO); cefotaxime (CTX); cefepime (CPM); piperacillin/tazobactam (PIT); polymyxin B (POL); trimethoprim/sulfamethoxazole (SUT); gentamicin (GEN); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); nalidixic acid (NAL); levofloxacin (LEV);

5

1
2
3 imipenem (IPM); meropenem (MPM) and ertapenem (ERT). The results were
4
5 interpreted on respecting the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute-
6
7 CLSI (2014)¹⁰.
8

9 The microdilution test on broth was carried out for polymyxin B (Eurofarma)
10
11 and meropenem (European Pharmacopoeia - Reference Standard- Sigma) as per the
12
13 recommendations of CLSI (2014)¹⁰. Prior to determining the Minimum Inhibitory
14
15 Concentrations (MICs), quality control testing of the antimicrobials was carried out
16
17 with the reference strain *E. coli* ATCC 25922, in accordance with the CLSI standards
18
19 (2014)¹⁰. To interpret the MICs of polymyxin B and meropenem, the "breakpoints" for
20
21 *Acinetobacter baumannii* (sensitive $\leq 2\text{mg/ml}$, resistant $\geq 4 \mu\text{g/ mL}$) since the CLSI
22
23 (2014)¹⁰ does not provide interpretive criteria for polymyxin B for *Enterobacteriaceae*.
24
25
26
27
28

29 **2.3. Transmission electron microscopy (TEM)**

30
31
32
33
34 For the analysis by transmission electron microscopy, 2 *K. pneumoniae* isolates
35
36 were analyzed in the presence of clinically relevant concentrations (defined as the
37
38 concentrations needed to achieve exposures of the drug in plasma in adults with normal
39
40 renal and normal hepatic functions, a concentration which is based on "breakpoints") for
41
42 polymyxin B (4 $\mu\text{g/ ml}$), meropenem (4 $\mu\text{g/ ml}$), and the association between polymyxin
43
44 B and meropenem (4 $\mu\text{g/ ml} + 4\mu\text{g/ ml}$).
45
46

47 In all processes, a negative control of the isolate in the same conditions without
48
49 the presence of the antibiotic, was included. All strains were inoculated into Cation-
50
51 Adjusted Mueller-Hinton (CAMHB) medium for 6 hours at 37°C in the presence or
52
53 absence of the antimicrobial to be analyzed. After growth, the isolates were fixed and
54
55 processed, the cultures were washed in sterile 0.1M phosphate buffer, pH 7.2-7.4 and
56
57
58
59
60

1
2
3 centrifuged at 3500 rpm for 2 minutes for subsequent fixation in 0.1 M phosphate
4
5 buffer, 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich)⁵. After fixation,
6
7 they were washed 3 times in 0.1 M phosphate buffer, post-fixation in 1% osmium
8
9 tetroxide in 0.1M phosphate buffer for 1 hour and then counterstained on block using
10
11 5% ethyl uranyl (Electron Microscopy Science). Subsequently they were washed three
12
13 times, twice in in 0.1M phosphate buffer and once in in distilled water for 10 minutes
14
15 each and then dehydrated, using an increasing series of acetone (Sigma Aldrich) at 30%,
16
17 50%, 70%, 90% and three times at 100% for 10 minutes each step. After dehydration,
18
19 the material was infiltrated so as to replace acetone with Epon 812 resin in an increasing
20
21 series overnight in 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and pure resin (Electron Microscopy Sciences). The
22
23 material was put into blocks, after making ultrathin cuts for staining with 5% uranyl
24
25 acetate for 30 minutes and lead citrate for 10 minutes (Electron Microscopy Science).
26
27 Then the samples were observed under a transmission electron microscope (Tecnai
28
29 Spirit G1 G2 BioTwin-FEI Company).
30
31
32
33
34
35

36 2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

37
38
39
40
41 For the analysis by scanning electron microscopy, the *K. pneumoniae* isolates
42
43 were analyzed in the presence of a clinically relevant concentration for polymyxin B
44
45 (4µg/ mL), meropenem (4µg/mL), and the association between polymyxin B (4µg/mL +
46
47 4µg/ml) and meropenem. In all processes, a negative control of the isolate in the same
48
49 conditions, without the presence of the antibiotic, was included. All strains were
50
51 inoculated in CAMHB medium for 6 hours at 37°C in the presence or absence of the
52
53 antibiotic to be analyzed. After growth, the isolates were fixed and processed, the
54
55 cultures were washed in sterile 0.1M phosphate buffer, pH 7.2-7.4 and centrifuged at
56
57
58
59
60

7

Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

1
2
3 3500 rpm for 2 minutes for subsequent fixation in 0.1 M phosphate buffer, 2.5%
4
5 glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich)⁵. After fixation, they were
6
7 washed 3 times in 0.1 M phosphate buffer, the post-fixation was performed in 1%
8
9 osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer for 1 hour (Sigma Aldrich). Subsequently,
10
11 they were washed three times, twice in 0.1M phosphate buffer and once in distilled
12
13 water for 10 minutes each and subsequently dehydrated, using an increasing ethanol
14
15 series of 30%, 50%, 70%, 90% and 3 times at 100% for 10 minutes each step (Sigma
16
17 Aldrich). After dehydration the critical point was found at which to replace ethanol with
18
19 carbon dioxide, resulting in drying the material so as to mount the dried material on
20
21 metal stubs using double-sided carbon tape. Then they were plated by covering the
22
23 material with a thin layer of gold and the surface of the bacterial isolates was visualized
24
25 using scanning electron microscopy (ZEISS EVO LF-15).
26
27
28
29
30
31

32 3. RESULTS

33 3.1. Susceptibility to Antimicrobials

34
35
36 The *K. pneumoniae* isolates analyzed both of colonization and infection showed
37
38 the same resistance profile including resistance to polymyxin B and meropenem, and
39
40 were only sensitive to amikacin and with intermediate resistance to levofloxacin (Table
41
42 1). The MICs with a microdilution in broth for meropenem in the isolates confirmed the
43
44 resistance rate found when compared with the disc diffusion method. On the other hand,
45
46 the MICs for polymyxin B with a microdilution in broth proved to be divergent from the
47
48 disk diffusion method. The K3-A2 isolate considered sensitive in the disk diffusion
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 method, when re-assessed by the microdilution in broth was classified as resistant to
4
5 polymyxin B (Table 2).
6
7

8 9 10 **3.2 Analysis and ultrastructural morphological**

11
12
13
14 The control cells of the 2 *K. pneumoniae* isolates, analyzed by TEM without
15
16 addition of antimicrobials, had preserved morphology with an integral cell wall and a
17
18 cytoplasmic content of electron-dense aspect, it being possible to observe the presence
19
20 of ribosomes and genetic material distributed by the bacterial cytoplasm (Figures 1A
21
22 and 2A). The analysis of the control cells by SEM showed a bacterial morphology
23
24 preserved in a rod-shaped, large number of cells and a cell length of between 1 and 5µm
25
26 (Figures 3A and 4A).
27
28

29 30 31 32 **K3-A2 Isolate**

33
34
35
36 The K3-A2 isolate even presenting the *bla_{KPC-2}* gene, efflux pumps, mutation in
37
38 *ramR* and resistance to meropenem and polymyxin B, showed ultrastructural cell
39
40 changes compared with the control cells, when subjected to these antimicrobial agents
41
42 alone or to associated ones.
43
44

45
46 The TEM analysis showed that the cells of the K3-A2 cells subjected to
47
48 meropenem presented numerous morphological changes, an increase in the periplasmic
49
50 space with a greater visualization at the extremities of the cells suggesting cytoplasmic
51
52 retractions (Figure 1B). Small cytoplasmic compartments were observed as were a
53
54 structural disorganization in the cytoplasmic membrane and the cell wall without
55
56 maintaining the normal form of the bacterial cells (Figure 1C). The morphological
57
58
59
60

9

1
2
3 changes were also reproduced in the SEM analysis, in which different formats in the
4
5 cells of the K3-A2 isolates were found. These formats were seen to be oval and
6
7 spherical, with aberrant forms or undefined forms.
8

9
10 Using the TEM, the bacterial cells of the K3-A2 isolate submitted to polymyxin
11
12 B presented condensation of the ribosomes and coagulation of the DNA (Figure 1D).
13
14 No morphological changes were observed by TEM, as the cytoplasmic membrane and
15
16 the cell wall are undamaged, but cell wall thickening can be visualized (Figure 1E). By
17
18 SEM it was possible to assess that the cells the K3-A2 isolate maintained their
19
20 morphology, but 4µg/ml of polymyxin B was able to greatly reduce a large number of
21
22 viable cells (Figure 3C).
23

24
25 The TEM analysis also showed that the cells of the K3-A2 isolate when
26
27 submitted to the association of polymyxin B and meropenem presented more intense
28
29 damage than when the antimicrobials were used separately, presenting cell wall
30
31 thickening, coagulation of the DNA, rupture of the cytoplasmic membrane and cell wall
32
33 with loss of cytoplasmic material (Figures 1F-G). According to SEM, the cells
34
35 subjected to the association of polymyxin B and meropenem did not show any
36
37 morphological changes. However, some ruptured cells can be seen with extravasation of
38
39 cytoplasmic contents, and with a reduced number of cells (Figure 3D).
40
41
42
43
44

45 **K12-A2 Isolate**

46
47 The K12-A2 isolate even presenting the *bla*_{KPC-2} gene, efflux pump, resistance to
48
49 polymyxin B and meropenem, showed ultrastructural cell changes compared with the
50
51 control cells, when subjected to these antimicrobial agents alone or associated ones.
52

53
54 Through the TEM analysis, the cells subjected to meropenem showed rupture of
55
56 the membrane and cell wall with loss of cytoplasmic material, (Figures 2B and D); the
57
58
59
60

1
2
3 presence of large electron-luscent spaces, highlighting a membrane cellular
4 compartment without cytoplasmic material and the presence of a ghost cell (Figure 2C).
5
6
7 Showing by using TEM that the K12-A2 isolate suffered more changes with the
8 meropenem than the A2-K3 isolate. SEM analysis revealed that the bacterial cells of the
9 K12-A2 isolate subjected to meropenem did not show any morphological changes
10 (Figure 4B).

11
12
13
14
15
16 It could be observed by using TEM that the bacterial cells of the K12-A2 isolate
17 submitted to polymyxin B were elongated, with several membrane remains at their full
18 extension because of the action of polymyxin B, which led to the disorganization and
19 and destruction of the cellular cytoplasmic membrane (Figure 2E-G). The TEM analysis
20 revealed cytoplasmic retractions with a cell membrane compartment containing
21 cytoplasmic material located between the membrane and the cell wall (Figure 2E). Cell
22 wall thickening as well as rupture of the cytoplasmic membrane and cell wall with loss
23 of cytoplasmic material can be seen in Figure 2F.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 In general, the K12-A2 isolate showed more severe changes when subjected to
34 meropenem than when subjected to polymyxin B. The SEM analysis showed elongated
35 cells when subjected to polymyxin B (Figure 4C), which was also seen in the TEM
36 analysis.

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 The TEM analysis showed that the cells of the K12-A2 isolate subjected to the
association of polymyxin B and meropenem showed more intense damage than when
the antimicrobials were used separately. Rupture of the cytoplasmic membrane and cell
wall with loss of cytoplasmic material, cell wall thickening, condensation of ribosomes,
DNA clotting and irregularities in the cell wall were observed (Figures 2H-I). By SEM
it can be seen that the cells of the K12-A2 isolate subjected to the association of
polymyxin B and meropenem, apparently, showed no morphological changes, but the

1
2
3 association of 4µg/ml + 4µg/ml of polymyxin B and meropenem was able to reduce
4
5 most of the number of viable cells (Figures 4G-H).
6
7

8 9 10 **4. DISCUSSION**

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
There is increasing concern that the results of susceptibility test for commercially available KPC-producing *K. pneumoniae* KPC may indicate false susceptibility to some antimicrobials, although often this is still unknown²⁰. It is known that poor dissemination of polymyxins in agar results in imprecise results by the disk diffusion method¹⁸. In the present study, with the MICs with microdilution in broth were determined for both isolates analyzed, which showed resistance to polymyxin B and meropenem and showed discordance compared with the disk diffusion test. The treatment of infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae* is often dependent on the results of the antimicrobial susceptibility tests predicted by clinical microbiology laboratories. Therefore, it is essential to elucidate the precision of the methods commonly used for susceptibility testing²⁰.

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Gales *et al.* (2006)¹³ identified poor concordance with MIC results obtained by Etest for polymyxins and microdilution in broth MICs for *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The reference method (microdilution in broth) found that 15% of the isolates were resistant to polymyxin B, whereas 37% were resistant to this agent when tested by the Etest. This phenomenon may be due to the poor diffusion of the large polymyxin molecules on agar. This may have significant therapeutic implications in clinical practice, because polymyxin B can be classified as inactive, thus leaving still fewer treatment options available²⁰.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

This is the first study on the ultrastructural changes caused by polymyxin B, meropenem and by the association between polymyxin B and meropenem in multiresistant isolates of *K. pneumoniae* carriers of the *bla_{KPC-2}* gene. In this study it was observed that the two isolates analyzed showed different behavior when subjected to antimicrobials. TEM showed that the K12-A2 isolate underwent more changes with meropenem than the A2-K3 isolate, which can be explained by the MIC of only 8 mg/ml for the K12-A2 isolate. However, the K3-A2 isolate also showed morphological changes when subjected to meropenem, and even presented a greater MIC for meropenem (128 µg/ml). Probably the action of meropenem on these isolates were in different Penicillin-binding Proteins (PBP).

The β -lactam antibiotics exert bactericidal activity by covalent binding and inactivating the PBPs, resulting in interference with the synthesis and remodeling of the bacterial peptidoglycan which promotes different morphological changes³⁸. Some PBPs of gram-negative bacteria are responsible for the synthesis of peptidoglycan, others are required to maintain the rod-shaped bacterium, or to form septa during bacterial division. Each PBP has a specific role in proliferating and maintaining the bacterial morphology, where blocking PBP-1 leads to the rapid bacterial lysis, from PBP-2 to forming spherical cells and from PBP-3 to forming long filaments, caused by the inability of forming division septa after the duplication of the bacterial cell mass⁶. The efficiency of the carbapenems is due to the high affinity for PBP-2⁴¹. We can see that the K3-A2 isolate presented formation of spherical cells with the action of the meropenem, probably because of the blockage of the PBP-2, which was not observed in the K12-A2 isolate. On the other hand, the latter isolate showed more intense changes, especially of membrane cellular compartment without cytoplasmic material, membrane

1
2
3 rupture and cell wall with loss of cytoplasmic material, the presence of a ghost cell,
4
5 probably by the action on PBP-1.
6

7 Carbapenemase-producing isolates have become a significant problem in terms
8
9 of public health and clinical evolution, due often to their being able to hydrolyze
10
11 penicillins, cephalosporins, aztreonam as well as carbapenems, which makes clinical
12
13 treatment a challenge for physicians ³⁹.
14

15
16 The ultrastructural cell changes were different in the isolates with regard to
17
18 polymyxin B and meropenem which was expected since polymyxins target cell
19
20 membranes ²⁹ and carbapenems the cell wall ³⁸. The K12-A2 isolate, coming from
21
22 infection, presented greater ultrastructural changes when compared with the K3-A2
23
24 isolate, of colonization, with regard to both meropenem and polymyxin B. This result
25
26 may be due to the fact that the K3-A2 isolate showed mutation in *ramR* which can lead
27
28 to overexpression of the AcrAB-TolC efflux pump in this isolate, thus making it more
29
30 resilient.
31
32

33
34 The *ramR* gene is a negative transcriptional repressor of the *ramA* gene, the
35
36 latter being a positive regulator of the AcrAB efflux system, namely, it controls
37
38 increasing the expression of *acrAB*³. Overexpression of *ramA* seems to be the cause of
39
40 the overexpression of *acrAB* in *K.pneumoniae* and *E. cloacae*, but molecular bases of
41
42 the "upregulation" cannot be defined in these species ¹⁴. Deletion or mutation in *ramR*
43
44 has implied activation in *ramR*, promoting the overexpression of the AcrAB-TolC
45
46 efflux pump ^{4,32,40} suggesting that the K3-A2 isolate can more efficiently expel the
47
48 antimicrobials used and suffer less ultrastructural damage.
49
50

51
52 In this study, the K12-A2 isolate studied presented filamentation when subjected
53
54 to polymyxin B which may indicate that the AcrEF lost its function and did not keep the
55
56 normal cell division.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

AcrEF is another transporter known to confer a phenotype of multidrug resistance in cells deficient in AcrAB and to complement AcrAB-TolC functionally. Efflux systems play an extremely important role in the bacterial defense against antimicrobial agents and toxic compounds, by decreasing the intracellular accumulation of drugs³⁵.

Lau *et al.* (2005)¹⁹ suggest that cell filamentation is caused by the loss of the function of AcrEF and plays an important role in the normal maintenance of the cell division. These authors demonstrated that the increased expression of AcrA is toxic only in cells without the AcrEF multidrug efflux transporter, i.e. cells deficient in AcrEF with an increase in the expression of AcrA have a serious defect in the cell division resulting in cell filamentation. Similar defects were obtained in cells lacking TolC, which acts with AcrEF, suggesting that cell filamentation is caused by the loss of the function of AcrEF.

In the study by Rajeshwari *et al.* (2009)³³, the formation of bacterial filaments occurred in resistant *K. pneumoniae* isolates, showing that the stress caused by cefotaxime caused elongation, deformation of the bacterial cells and a rough surface.

The K12-A2 isolate also presented further damage when subjected to polymyxin B, even presenting a MIC higher than that of K3-A2, with ruptures in the cellular membrane and loss of cytoplasmic material. This event is due to the action of polymyxin B which has a long hydrophobic tail, which breaks down the structure of the bacterial cellular membrane because of its interaction with phospholipids and lipopolysaccharides, with an action similar to cationic detergents competitively displacing Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ that act as membrane stabilizers, thus causing them to rupture, leading to loss of the cellular content and causing death of bacteria²⁵.

1
2
3 The cell wall thickening and condensation of ribosomes in bacteria indicate the
4
5 presence of defense mechanisms to maintain the osmotic pressure after action of the
6
7 antimicrobials and the bacteria produce more peptidoglycan to protect themselves ³⁴.
8
9 This was found in the K3-A2 isolates when subjected to the association of polymyxin B
10
11 and in the K12-A2 isolate when subjected to the association of polymyxin B and
12
13 meropenem. These isolates besides the thickening of the cell wall and the condensation
14
15 of the ribosomes showed coagulation of the DNA.
16
17

18
19 The term coagulated DNA means that the function of the DNA gyrase stopped
20
21 working and it would be prevented from performing its function during DNA
22
23 replication ^{37,11}. The K3-A2 isolate when subjected to the association of polymyxin B
24
25 and meropenem also presented coagulated DNA.
26
27

28
29 New combination therapies for treating multidrug-resistant isolates have been
30
31 evaluated. The study of Bulik *et al.* (2011) evaluated the efficiency of the combination
32
33 of ertapenem and doripenem in an *in vitro* model and *in vivo* in mice, showing that the
34
35 combination of these antimicrobials had enhanced efficacy compared to the isolate
36
37 agents. Hirsh *et al.* (2013) ¹⁵ demonstrated the action *in vivo* and *in vitro* of the
38
39 combination of β -lactam antibiotics and aminoglycosides in multidrug-resistant (MDR)
40
41 *K. pneumoniae* isolates in order to identify new therapy options for treating infections
42
43 caused by this bacterial species. Hirsh *et al.* (2013) ¹⁵ demonstrated experimentally that
44
45 the combination of meropenem and amikacin can be successful.
46
47

48
49 Polymyxin B is a polycationic antimicrobial peptide that currently functions as a
50
51 last resort for treating infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria,
52
53 including *K. pneumoniae*, the carrier of the *bla_{KPC}* gene. The re-introduction of
54
55 polymyxin B in antimicrobial therapy has been followed by an increase in reports of
56
57 resistance between gram-negative bacteria ²⁹.
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In the present study, the ultrastructural alterations provoked caused by antimicrobials used in therapy for Enterobacteriaceae, carriers of the *bla*_{KPC-2} gene with the combination between polymyxin B and meropenem, demonstrating that this association has enhanced efficacy when compared with the antimicrobials separately. However, the actions of the antimicrobials alone also demonstrated ultrastructural damage in the isolates analyzed. This is the first study that investigated and compared the ultrastructural changes provoked by polymyxin B, meropenem and by the association between polymyxin B and meropenem in multiresistant isolates of *K. pneumoniae* carriers of the *bla*_{KPC-2} gene.

It is important to stress that even the *K. pneumoniae* isolates analyzed since they are multidrug-resistant, carriers of the *bla*_{KPC-2} gene and efflux pumps, underwent important structural change with the the action of polymyxin B and meropenem.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Nucleus of Technological Platforms of the Aggeu Magalhães Research Center - CPQAM/ FIOCRUZ, particularly to Marlos de Medeiros Chaves, MSc. for assisting with the transmission electron microscope and Prof. Dr. Eulalia Ximenes for having given antimicrobials to conduct the experiments.

6. REFERENCES

1. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, nota técnica nº 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias Multirresistentes em 17 de abril de 2013.
2. Bassetti, M., M. Merelli, C. Temperoni, and A. Astilean. 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 12: 1-15.
3. Bialek-Davenet, S., E. Marcon, V. Leflon-Guibout, J. Lavigne, F. Bert, R. Moreau, and M. Nicolas-Chanoine. 2011. *In Vitro* Selection of *ramR* and *soxR* Mutants Overexpressing Efflux Systems by Fluoroquinolones as Well as Cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 2795-2802.
4. Bratu, S., D. Landman, A. George, J. Salvani, and J. Quale. 2009. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. *J Antimicrob Chemother.* 64: 278–283.
5. Brayner, F.A., H.R.C. Araújo, M.G.S. Cavalcanti, L.C. Alves, and C.A. Peixoto. 2005. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). *Micron* 36: 359–367.
6. Buijs, J., A.S. Dofferhoff, J.W. Mouton, J.H. Wagenvoort, and J.W. van der Meer. 2008. Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 14: 344-349.
7. Bulik, C.C., and D.P. Nicolau. 2011. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. 55: 3002-3004.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

8. Cabral, A.B., R.C. A. Melo, M.A.V. Maciel, and A.C.S. Lopes. 2012. Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 572-578.
9. Campos, M.A., M.A. Vargas, V. Regueiro, C.M. Llompарт, S. Alberti, and J.A. Bengoechea. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 72: 7107–7114.
10. Clinical Laboratory Standards Institute- CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement, M100-S24. CLSI, Wayne, PA.
11. Dimech, G.S., L.A. Soares, M.A. Ferreira, A.G. de Oliveira, Mda. C. Carvalho, and E.A. Ximenes. 2013. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *ScientificWorldJournal*. 14: 862763.
12. Dubrovskaya, Y., T.Y. Chen, M.R. Scipione, D. Esaian, M.S. Phillips, J. Papadopoulos, and S.A. Mehta. 2013. Risk factors for treatment failure of polymyxin B monotherapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 57: 5394-5397.
13. Gales, A.C., R. N. Jones, and H. S. Sader. 2006. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 371 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 315–321.
14. Hentschke, M., M. Wolters, I. Sobottka, H. Rohde, and M. Aepfelbacher. (2010). *ramR* mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 2720-2723.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

15. Hirsch, E.B., B. Guo, K. Chang, H. Cao, K.R. Ledesma, M. Singh, and V.H. Tam. 2013. Assessment of Antimicrobial Combinations for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. *J Infect Dis.* 207: 786-93.
16. Horiyama, T., and Nishino, K. 2014. AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in *Escherichia coli*. *Plos One.* 9: 1-7.
17. Jain, R., S.T. Walk, D.M. Aronoff, V.B. Young, D.W. Newton, C.E. Chenoweth, and L.L. Washer. 2013. Emergence of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 258 in Michigan, USA. *Infect Dis Rep.* 5: 16-20.
18. Landman, D., J. Salamera, and J. Quale. 2013. Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol.* 51: 4106-4111.
19. Lau, S.Y., and H.I. Zgurskaya. 2005. Cell Division Defects in *Escherichia coli* Deficient in the Multidrug Efflux Transporter AcrEF-TolC. *J Bacteriol.* 187: 7815-7825.
20. Lat, A., S.A. Clock, F. Wu, S. Whittier, P. Della-Latta, K. Fauntleroy, S.G. Jenkins, L. Saiman, and J. Kubin. 2011. Comparison of Polymyxin B, Tigecycline, Cefepime, and Meropenem MICs for KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* by Broth Microdilution, Vitek 2, and Etest. *J Clin Microbiol.* 49: 1795-1798.
21. Lee, G.C., and D.S. Burgess. 2013. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res.* 5: 97-100.
22. Lin, M.Y., R.D. Lyles-Banks, K. Lolans, D.W. Hines, J.B. Spear, R. Petrak, W.E. Trick, R.A. Weinstein, and M.K. Hayden. 2013. The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*

1
2
3 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Centers for Disease Control and
4
5 Prevention Epicenters Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 77: 169-173.

6
7 23. Lolans, K., K. Calvert, S. Won, J. Clark, and M.K. Hayden. 2010. Direct
8
9 Ertapenem Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing *Klebsiella*
10
11 *pneumoniae* and *Escherichia coli* in Surveillance Swab Specimens. *J Clin Microbiol.*
12
13 48: 836-841.

14
15 24. Melo, R.C.A., E. M. R. Barros, N. G. Loureiro, H. R. Melo, M. A. V.
16
17 Maciel, and A. C. S. Lopes. 2014. Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes
18
19 in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. *Current*
20
21 *Microbiology.* 69: 824-831.

22
23 25. Mendes, C.A.C., and Burdmann, E.A. 2009. Polymyxins - a review focusing
24
25 on their nephrotoxicity. *Rev Assoc Med Bras.* 55: 752-759.

26
27 26. Moffatt, J.H., M. Harper, P. Harrison, J.D. Hale, E. Vinogradov, T.
28
29 Seemann, R. Henry, B. Crane, F. St Michael, A.D. Cox, B. Adler, R.L. Nation, J. Li and
30
31 J.D. Boyce. 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by
32
33 complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:
34
35 4971-4977.

36
37 27. Munoz-Price, L.S., L. Poirel, R.A. Bonomo, M.J. Schwaber, G.L. Daikos,
38
39 M. Cornican, G. Cornaglia, J. Garau, M. Gniadkowski, M.K. Hayden, K.
40
41 Kumarasamy, D.M. Livermore, J.J. Maya, P. Nordmann, J.B. Patel, D.L. Paterson, J.
42
43 Pitout, M.V. Villegas, H. Wang, N. Woodford, and J.P. Quinn. Clinical epidemiology of
44
45 the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 13:
46
47 785-796.

48
49 28. Nam, Y. S., S.Y. Cho, H.Y. Yang, K.S. Park, J.H. Jang, Y.T. Kim, J.W.
50
51 Jeong, J.T. Suh, and H.J. Lee. (2013). Investigation of mutation distribution in DNA
52
53

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int J Antimicrob Agents*. 41: 126-129.

29. Olaitan, A.O., Morand, S., and Rolain, J.M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 5: 1-18.

30. Padilla, E., E. Llobet, A. Dome'nech-Sa'nchez, L. Martinez-Martinez, J.A. Bengoechea, and S. Alberti'. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 177-183.

31. Papadimitriou-Olivgeris, M., M. Marangos, F. Fligou, M. Christofidou, C. Sklavou, S. Vamvakopoulou, E.D. Anastassiou, and K.S. Filos. 2013. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Clin Microbiol Infect*. 19: 169-173.

32. Pérez, A., M. Poza, A. Fernández, M.delC. Fernández, S. Mallo, M. Merino, S. Rumbo-Feal, M.P. Cabral, and G. Bou. 2012. Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 2084-2090.

33. Rajeshwari, H., S. Nagveni, A. Oli, D. Parashar, K. R. Chandrakanth. 2009. Morphological changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to Cefotaxime: a scanning electron microscope study. *World J Microbiol Biotechnol*. 25: 2263-2266.

34. Santhana, R.L, H.L. Hing, O. Baharudin, Z. Teh Hamidah, R. Aida Suhana, C.P. Nor Asiha, B. Vimala, S. Paramsarvaran, G. Sumarni, and K. Hanjeet. Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Trop Biomed*. 24: 105-109.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

35. Rensch, U., K. Nishino, G. Klein, and C. Kehrenberg. 2014. *Salmonella enterica serovar Typhimurium* multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. *Int J Antimicrob Agents*. 44: 179-180.

36. Scavuzzi, A.M.L., M.A.V. Maciel, H.R.L. Melo, L.C. Alves, F.A. Brayner, and A.C.S. Lopes. 2015. Occurrence of *qnrB1* and *qnrB12* genes, mutation in *gyrA* and *ramR*, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of *bla_{KPC-2}* in Recife, Brazil. *Microbiology*. in press.

37. Romano, B., E. Pagano, V. Montanaro, A.L. Fortunato, N. Milic, and F. Borrelli. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. 2013. *Phytother Res*. 27: 1588-1596.

38. Tang, S.S., A. Apisarnthanarak, and L.Y. Hsuc. 2014. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev*. 78: 3-13.

39. Tumbarello, M., P. Viale, C. Viscoli, E.M. Trecarichi, F. Tumietto, A. Marchese, T. Spanu, S. Ambretti, F. Ginocchio, F. Cristini, A.R. Losito, S. Tedeschi, R. Cauda, and M. Bassetti. 2012. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 55: 943-950.

40. Villa, L., C. Feudi, D. Fortini, A. García-Fernández, and A. Carattoli. 2014. Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring Tigecycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 1707-1712.

41. Walther-Rasmussen, J., and N. Hoiby. 2007. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 60: 470-482.

23

Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

42. Whitfield, C., and J.H. Naismith. 2008. Periplasmic export machines for outer membrane assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 18: 466-474.

43. Zheng, J., S. Cui, and J. Meng. 2009. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother.* 63: 95-102.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
..

7. TABLE 1

Table 1: Origin, presence and expression of the *acrB*, *acrF* genes, mutation in *ramR*, profile of the ERIC-PCR and resistance profile by disk diffusion method of the selected nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of the *bla*_{KPC} gene of Recife, Brazil.

Identificatio n of Isolates ^(a)	Origin	<i>acrB</i> ⁺	<i>acrF</i> ⁺	RT de <i>acrB</i> e <i>acrF</i> ⁺	Mutation in the <i>ramR</i> ⁺	ERIC ^(b)	Meropenem (µg/mL) CIM	Polymyxin B (µg/mL) CIM	Resistance Profile by disk diffusion method ^(c)
K3-A2	Racal swab	+	+	+	+	5E	128	16	AMC,AMO,ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(D), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, SUT
K12-A2	Racal swab	+	+	+	-	9E	8	128	AMC,AMO, ATM, CAZ, CFO, CPM,CTX, CIP, LEV(D), NAL, NOR, ERT,GEN, IMP, MPM, PIT, POL, SUT

Legend: Identification of Isolates ^(a): K: *K. pneumoniae*; A2: public hospital; ^(b)Scavuzzi *et al.*, 2015; ERIC^(b): Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus -Melo *et al.*, (2014); ^(c): amoxicillin-clavulanic acid (AMC); amoxicillin (AMO); amikacin (AMK); aztreonam (ATM); ceftazidime (CAZ); cefoxitin (CFO); cefotaxime (CTX); cefepime (CPM); piperacillin/tazobactam (PIT); polymyxin B (POL); trimethoprim/sulfamethoxazole (SUT); gentamicin (GEN); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); nalidixic acid (NAL); levofloxacin (LEV); imipenem (IPM); meropenem (MPM) and ertapenem (ERT).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

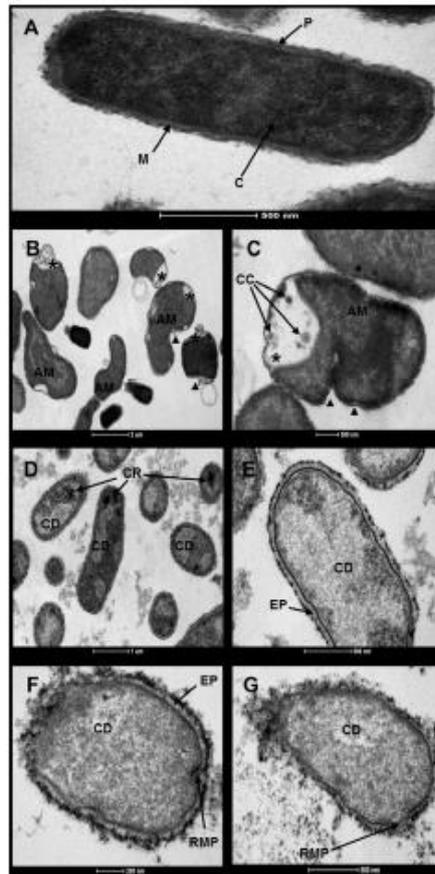


Figure 1 (AG): Electron micrographs of isolated K3-A2 from *K. pneumoniae* (A) untreated control bacterial cell have preserved morphology, cytoplasmic membrane (M), cell wall (P), and cytoplasmic contents (C) intact. (BC): Cells submitted to MER (4µg / mL) showed morphological changes (AM), cytoplasmic retractions (asterisk), small cytoplasmic compartments (CC) and irregularities in the cell wall (arrowheads). (DE): Cells submitted to POL (4µg / mL) with condensation of ribosomes (CR), DNA coagulation (CD) and cell wall thickening (EP). (FG): cells submitted to MER+POL association (4µg / ml + 4µg / ml) present cell wall thickening (EP), DNA coagulation (CD) of the membrane and cell wall rupture (SMR) with loss of material cytoplasmic.

114x230mm (150 x 150 DPI)

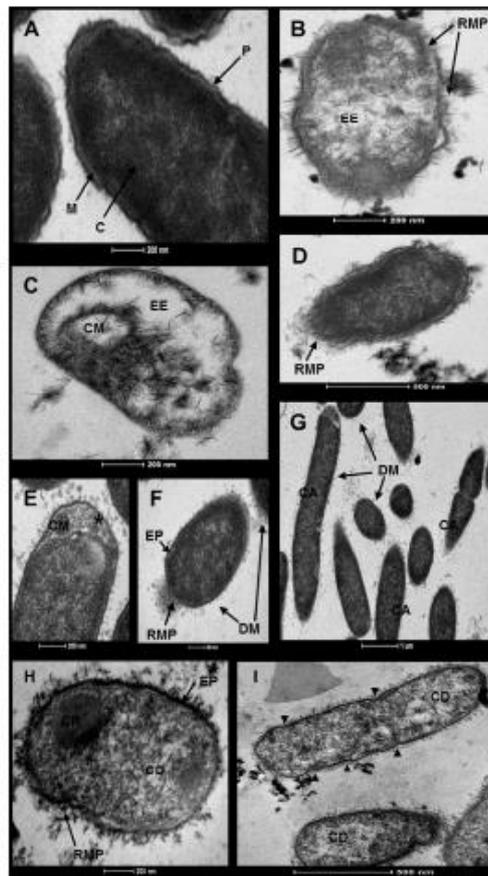


Figure 2 (AI): Electron micrographs of isolated K12-A2 *K. pneumoniae*. (A) untreated control bacterial cell have preserved morphology, cytoplasmic membrane (M), cell wall (P), and cytoplasmic contents (C) intact. (BD): Cells submitted to MER (4µg / mL) present membrane disruption and cell wall (RMP) with loss of cytoplasmic material, membrane compartments (CM) and electron-lucent space (EE). (EG): Cells submitted to POL (4µg / ml) have elongated cells (CA), destruction of the cell membrane (DM) membrane compartments (CM), cytoplasmic shrinkage (asterisk), membrane and cell wall rupture (SMR) with loss of cytoplasmic material. (HI): Cells submitted to MER + POL association (4µg / ml + 4µg / mL) present membrane disruption and cell wall (RMP) with loss of cytoplasmic material, cell wall thickening (EP), condensation of ribosomes (CR), DNA coagulation (CD) and irregularities in the cell wall (arrowheads). 125x223mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

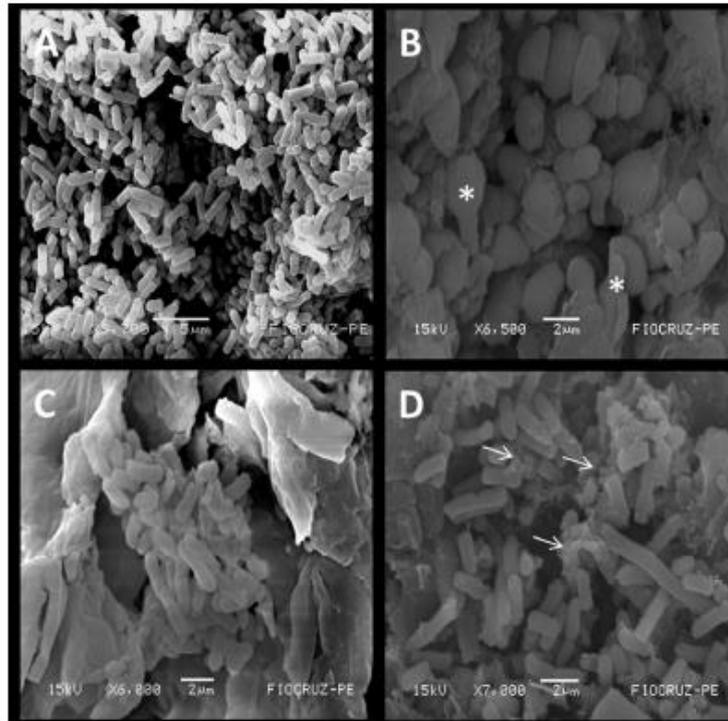


Figure 3 (AD): Electron micrographs of isolated K3 A2 from *K. pneumoniae*. (A) untreated control cells with preserved morphology. (B): Cells submitted to MER (4µg / ml) showed morphological changes (asterisks). (C) Cells submitted to POL (4µg / ml) but do not exhibit morphological alterations found in small numbers. (D): cells submitted to MER + POL association (4µg / ml + 4µg / mL) without morphological changes, but may be visible cells disrupted with leakage of cytoplasmic contents (arrow).
146x144mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

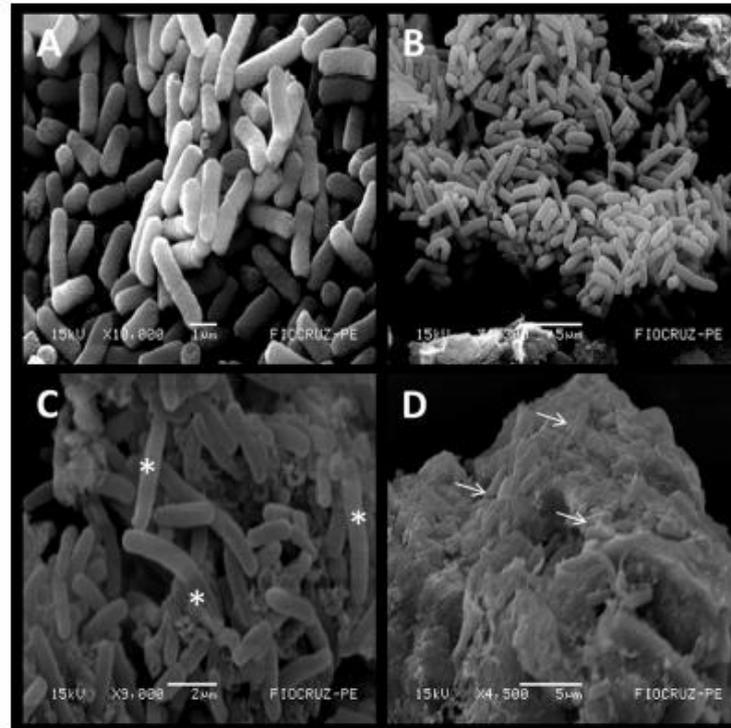


Figure 4 (A-D): Electron K12 A2 isolated from *K. pneumoniae*. (A) untreated control cells are preserved morphology. (B): Cells submitted to MER (4µg / ml) did not show morphological changes. (C) Cells submitted to POL (4µg / mL) we can observe cells with elongated features (asterisks). (D): cells submitted to MER + POL association (4µg / ml + 4µg / mL) apparently without morphological changes, but is in a very small number (arrow).
145x145mm (150 x 150 DPI)

