



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JOÃO CARLOS CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR

RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM ISOLADO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTOR DE CARBAPENEMASE: UM RELATO DE CASO

Recife
2023

JOÃO CARLOS CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR

RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM ISOLADO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTOR DE CARBAPENEMASE: UM RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: MSc. Carlos Alberto das Neves de Andrade

Coorientador: Dr. Igor Vasconcelos Rocha

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do
SIB/UFPE

Albuquerque Junior, João Carlos Cavalcanti de .
RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM ISOLADO DE *Klebsiella pneumoniae*
PRODUTOR DE CARBAPENEMASE: UM RELATO DE CASO / João
Carlos Cavalcanti de Albuquerque Junior. - Recife, 2023.
74 p. : il., tab.

Orientador(a): Carlos Alberto das Neves de Andrade
Cooorientador(a): Igor Vasconcelos Rocha
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.
Inclui referências, anexos.

1. Resistência à Polimixina. 2. Carbapenemase. 3. Infecções Relacionadas à
Saúde Assistencial (IRAS). 4. *Klebsiella pneumoniae*. 5. Antibioticoterapia. I.
Andrade, Carlos Alberto das Neves de. (Orientação). II. Rocha, Igor Vasconcelos
. (Cooorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

JOÃO CARLOS CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR

RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM ISOLADO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTOR DE CARBAPENEMASE: UM RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 27/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: MSc. Carlos Alberto das Neves de Andrade
Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco - HC/UFPE

MSc. Lamartine Martins Rodrigues
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Msc. Cláudia Fernanda Azevedo Braga de Albuquerque
Hospital das Clínicas da UFPE

Dedico este trabalho aos meus amados pais
João Carlos Cavalcanti de Albuquerque
Adriana Maria da Conceição Pinheiro de
Albuquerque.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de viver e poder chegar até aqui.

A meus pais, por todo amor dado a mim durante toda a minha vida, por todos os ensinamentos e lições que sem dúvida fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

A minha irmã Karla, por sempre cuidar de mim e me apoiar nos melhores e piores momentos da minha vida.

A minha filha e a minha namorada, Maitê e Thamires, por estarem comigo diariamente dando forças para continuar lutando.

Aos familiares por todas as energias positivas emanadas durante essa caminhada

Ao meu orientador Prof. Msc. Carlos Alberto por toda dedicação, atenção, paciência e confiança.

Ao Dr. Igor Vasconcelos, coorientador, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio e colaboração.

Ao Msc. Lamartine Martins e a Msc. Cláudia Azevedo por aceitarem o convite de compor a minha banca examinadora e pela disponibilidade de avaliar o estudo.

Aos colegas de graduação Evandro, Mikely e Poliana pelo companheirismo que fez este percurso ser mais agradável.

Aos amigos de longa data que de alguma forma me deram apoio e suporte durante o processo.

Aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas – UFPE pelos ensinamentos e apoio.

E por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

“Enquanto você sonha, você está fazendo o rascunho do seu futuro.”

Charles Chaplin

ALBUQUERQUE JUNIOR, J. C. C. Resistência à polimixina em isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemase: um relato de caso. 2023. 74 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A terapia antimicrobiana é um dos componentes essenciais para a prática médica e o pilar para a intervenção clínica em pacientes acometidos por Infecções Relacionadas à Saúde Assistencial (IRAS), infecções que acometem pacientes no âmbito hospitalar durante o processo de diagnóstico, tratamento e procedimentos médicos invasivos. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* são Bacilos Gram Negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* que fazem parte da microbiota, mas que podem provocar doenças em casos de imunossupressão do hospedeiro. O aumento das condições que induzem à internação de indivíduos cada vez mais graves e imunocomprometidos, somado ao surgimento da resistência aos antimicrobianos, faz com que o uso de fármacos de última linha seja cada vez mais recorrente. O Objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana às polimixinas em isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemase proveniente de amostra clínica de paciente assistido em um hospital terciário de Recife-PE. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelas técnicas de microdiluição em caldo, teste rápido Polimixina NP e Drop Test. Também foi realizado ensaio de transferência interespecífica para avaliar a presença de elementos móveis de resistência às polimixinas. Os principais genes de resistência aos carbapenêmicos (KCP-1, KPC-2, NDM e BKC) foram investigados pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e identificados por sequenciamento de DNA. As técnicas de Drop Test e Polimixina NP revelaram fenótipo de resistência às polimixinas no isolado avaliado. A microdiluição em caldo, por sua vez, apresentou padrão inespecífico variando entre 2 e 8 µg/ml e indicando a presença de heterorresistência de baixo nível em relação ao antimicrobiano de reserva. O ensaio de transferência interespecífica demonstrou a presença de elemento móvel de resistência às polimixinas no isolado avaliado. A amplificação por PCR e o posterior sequenciamento de DNA revelaram a presença de carbapenemase KPC-2, endêmica no Brasil em isolados de *K.pneumoniae*. A presença de isolados PR-CRKP (*Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e polimixinas) em amostras clínicas de pacientes hospitalizados reforça a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para combater a ameaça da resistência aos antimicrobianos de última linha e também a necessidade de fomentar estudos de epidemiologia molecular para compreender esses mecanismos genéticos de resistência antimicrobiana com baixos níveis de expressão, um grande desafio para o diagnóstico microbiológico de rotina, buscando fundamentar estudos clínicos para prospecção de novos compostos antimicrobianos e condutas terapêuticas cada vez mais eficazes.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Infecções Relacionadas à Saúde Assistencial (IRAS). Carbapenemase. Antibioticoterapia. *Klebsiella pneumoniae*.

ALBUQUERQUE JUNIOR, J. C. C. Polymyxin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate: a case report. 2023. 75 pages. Completion of course work (Graduation in Biomedicine) - Federal University of Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Antimicrobial therapy is one of the essential components of medical practice and the pillar for clinical intervention in patients affected by Healthcare Associated Infections (HAI), infections that affect patients in hospitals during the process of diagnosis, treatment and invasive medical procedures. . Isolates of *Klebsiella pneumoniae* are Gram Negative Bacilli belonging to the Enterobacteriaceae family that are part of the microbiota, but can cause diseases in cases of Immunosuppression of the host. The increase in conditions that lead to the hospitalization of increasingly severe and immunocompromised individuals, in addition to the emergence of resistance to antimicrobials, makes the use of last-line drugs increasingly recurrent. The objective of this study was to analyze the profile of antimicrobial susceptibility to polymyxins in an isolate of *Klebsiella pneumoniae* that produces carbapenemase from a clinical sample of a patient assisted at a tertiary hospital in Recife-PE. The antimicrobial susceptibility profile was determined by broth microdilution, Polymyxin NP rapid test and Drop Test. An interspecific transfer assay was also carried out to evaluate the presence of mobile elements of resistance to polymyxins. The main carbapenem resistance genes (KCP-1, KPC-2, NDM and BKC) were investigated using the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique and identified by DNA sequencing. The Drop Test and Polymyxin NP techniques revealed polymyxin resistance phenotype in the evaluated isolate. Broth microdilution, in turn, showed a nonspecific pattern ranging from 2 to 8 µg/ml, indicating the presence of low-level heteroresistance to the reserve antimicrobial. The interspecific transfer assay demonstrated the presence of a mobile element of resistance to polymyxins in the evaluated isolate. PCR amplification and subsequent DNA sequencing revealed the presence of KPC-2 carbapenemase, endemic in Brazil in *K.pneumoniae* isolates. The presence of PR-CRKP isolates (*Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxins) in clinical samples from hospitalized patients reinforces the need to develop new strategies to combat the threat of resistance to last-line antimicrobials and also the need to encourage epidemiological studies to understand these genetic mechanisms of antimicrobial resistance with low levels of expression, a great challenge for routine microbiological diagnosis, seeking to support clinical studies for prospecting new antimicrobial compounds and increasingly effective therapeutic approaches.

Keywords: Antimicrobial resistance. Healthcare Related Infections (HAI). Enterobacteriaceae. Antibiotic therapy. Public health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01A – Características microbiológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . (<i>K.pneumoniae</i> cultivada em ágar MacConkey)	14
Figura 01B – Características microbiológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (coloração de Gram de <i>K. pneumoniae</i>)	14
Figura 02 – Representação da cápsula polissacarídica em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Figura 03 - Esquema da estrutura do Lipopolissacarídeo de <i>K. pneumoniae</i>	17
Gráfico 01: Incidência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenêmicos e <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente à polimixina em diferentes países.	18
Figura 04 - Teste Colispor para determinação de suscetibilidade à polimixina	24
Figura 05 - Resultados representativos do teste de microdiluição em caldo	26
Figura 06 - Resultados representativos de teste rápido Polimixina NP.	27
Figura 07 - Estrutura química dos carbapenêmicos em comparação com a estrutura da penicilina V.	31
Figura 08 - Classificação de Ambler com as principais Beta-lactamases encontradas em Enterobacterales	32
Figura 09 - Representação genética do regulador negativo do sistema de dois componentes (<i>PhoP/PhoQ</i>).	35
Figura 10 - Representação esquemática da ativação de genes modificadores de lipopolissacarídeos envolvidos na resistência às polimixinas em bactérias Gram-negativas.	37

Figura 11- Teste de microdiluição em caldo realizado com diferentes concentrações de polimixina B	47
Figura 12- Representação do resultado do teste rápido Polimixina NP.	48
Figura 13- Eletroforese em gel de agarose do produto obtido após PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores KPC-F e KPC-R.	49
Figura 14- Eletroferograma gerado após sequenciamento de Sanger	50
Figura 15- Ensaio de transferência para detecção da presença de elementos móveis relacionados à resistência à polimixina B e aos carbapenêmicos em isolado de <i>K. pneumoniae</i> testado.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teste fenotípico de resistência aos antimicrobianos

48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
AmpC	Beta-lactamase classe C
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Infusão Cerebro Coração
BrCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana
CA	Concordância de Categoria
CA-MHB	Muller Hinton Cátion Ajustado
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CIP	Ciprofloxacina
CoR	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente à colistina
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CR-KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos
CRO	Ceftriaxona
ESBL	Beta lactamases de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

FEP	Cefepime
GEN	Gentamicina
GLASS	Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System
HC	Hospital das Clínicas
ICS	Infecção de Corrente Sanguínea
ID/AST	Identificação e Teste de Suscetibilidade a Antibióticos
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecções de Trato Urinário
KB	Quilobases
KPC-KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LAra4N	Arabinose
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeos
MC	Agar MacConkey
MCR	Resistência à colistina móvel
MDR	Multiple Drug Resistance
MER	Meropenem
MIC	Concentração mínima inibitória

NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NDM	Metallo beta-Lactamase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDR	Pan resistência
PEtN	Fosfoetanolamina
PIP	Pieracilina -tazobactam
PR-CRKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos e polimixinas
RM	Resistência microbiana
RM	Resistência microbiana
RPM	Rotações por minuto
TGI	Trato GastroIntestinal
TRI	Sulfametoxazol.
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de tratamento intensivo
UV	Ultra violeta

XDR

Fenótipos de resistência extensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>: microbiologia, patogenicidade e fatores de virulência	14
2.1.1 Cápsula polissacarídica	15
2.1.2 Lipopolissacarídeos	16
2.2 Epidemiologia das <i>Klebsiellas pneumoniae</i> multirresistentes	17
2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> e IRAS	19
2.4 Impacto das IRAS	21
2.5 Controle das IRAS	22
2.6 Fatores de risco associados à infecção por KPC-KP	22
2.7 Métodos de detecção de produção de carbapenemase e resistência às polimixinas	23
2.7.1 Teste Colispor e Drop Test	23
2.7.2 Microdiluição em caldo	25
2.7.3 Teste rápido Polimixina NP	26
2.8 Dificuldade de detecção de baixo nível de resistência às polimixinas	27
2.9 Principais mecanismos de resistência antimicrobiana encontrados em <i>K.pneumoniae</i>	29
2.9.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> e a produção de carbapenemase	30
2.9.2 Mecanismos de resistência às polimixinas	33
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 Isolado clínico	40
4.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	40

4.3 Teste fenotípico de detecção enzimática das principais carbapenemases de interesse clínico	42
4.4 Detecção dos principais determinantes genéticos de resistência aos carbapenêmicos	42
4.5 Avaliação da capacidade de transferência interespecífica dos mecanismos de resistência às polimixinas	44
4.6 Considerações éticas	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana do isolado de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
5.2 Identificação das principais enzimas relacionadas ao fenótipo de resistência	48
5.3 Detecção dos principais genes codificadores de carbapenemase	48
5.4 Avaliação da capacidade de transferência interespecífica dos mecanismos de resistência à polimixina	51
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A - Carta de aprovação do CEP	73
ANEXO B- Carta de anuência do Hospital das Clínicas da UFPE	74

1 INTRODUÇÃO

A adaptabilidade dos isolados bacterianos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* é tão impressionante quanto a sua patogenicidade em humanos e animais. Apesar de apresentarem ampla distribuição na natureza e de colonizarem diversos hospedeiros, são responsáveis por diversas infecções graves. Dentre as espécies pertencentes à família, a *Klebsiella pneumoniae* emerge como a principal Enterobactéria multirresistente no cenário mundial nos últimos anos (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2022). No contexto das IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde), esta espécie destaca-se pela sua prevalência e capacidade de adquirir resistência, aumentando em cerca de 35% os índices de mortalidade quando associadas às Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2022).

Neste cenário, a disseminação de isolados de *Klebsiella pneumoniae* simultaneamente resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas (PR-CRKP), duas das principais classes de antimicrobianos empregadas na prática clínica, tem representado um grave risco para a Saúde Pública, especialmente em países em desenvolvimento com acesso limitado a medicamentos recém desenvolvidos.

O mecanismo mais prevalente de resistência aos carbapenêmicos, nesses isolados, é a produção de carbapenemases, enzimas que hidrolisam também outras classes de antibióticos Beta-lactâmicos. A resistência à polimixina, importante antimicrobiano de reserva (última linha) utilizado para tratar infecções causadas por isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (CR-KPN), tem sido extensivamente associada à aquisição de genes *mcr* (*mobile colistin resistance*) e mutações cromossômicas, levando ao aparecimento de fenótipos de resistência Extensiva (XDR) e Pan resistência (PDR) entre isolados de *Klebsiella pneumoniae*. (LI *et al.*, 2023).

A incidência crescente de isolados de *Klebsiella pneumoniae* simultaneamente resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas (PR-CRKP) tem provocado o aumento dos custos, tempo de internamento, toxicidade e gravidade das infecções relacionadas à assistência a saúde causando impacto na morbimortalidade (CORREA, 2022). Aliado a isto, a dificuldade de diagnóstico desses isolados tem se mostrado um fator preocupante nos laboratórios de microbiologia, principalmente em casos de baixo nível de resistência às polimixinas (ou seja,

MIC entre 4–16 µg/mL), pois estes isolados estão sendo apontados como a causa principal de disseminação da resistência por mecanismos de plasmídeo e também por gene *mcr* (LAI *et al*, 2018). Diante disto, o escasso arsenal de métodos de detecção associado a falta de recursos para otimizar os métodos conhecidos torna o cenário ainda mais preocupante.

Neste contexto, o uso indiscriminado de antimicrobianos tem exercido considerável pressão evolutiva sobre microrganismos cada vez mais dotados de mecanismos de resistência antimicrobiana. Dentro dessa perspectiva, o presente trabalho foi conduzido para avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana à polimixina em isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemase obtido a partir de amostra clínica de paciente assistido em Hospital Terciário do Recife-PE. A análise desses perfis de resistência pode contribuir para aprimorar programas de vigilância epidemiológica e ajudar a estabelecer novos patógenos de prioridade crítica dentro de uma perspectiva de saúde pública.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*: microbiologia, patogenicidade e fatores de virulência

Em 1882, Carl Friedlander descreveu pela primeira vez a *Klebsiella pneumoniae* como um bacilo encapsulado após isolar esse microrganismo de pulmões de pacientes que morreram de pneumonia. Originalmente chamado de bacilo de Friedlander, somente em 1886 é que essa bactéria ganhou o nome de *Klebsiella* (COULTER, 1917).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, encapsulado, imóvel, produtor de citratase e urease, Voges-Proskauer positivo, indol negativo, fermentador de lactose, sacarose e glicose e não produtor de H₂S. Quando inoculada em meios de cultura como ágar Eosina Azul Metileno (EMB) e ágar MacConkey (MC), produzem colônias largas, circulares, lisas e convexas, levemente elevadas, rosáceas e mucóides quando incubadas a 37°C por 24 horas (Figura 01A). Em relação a coloração de Gram, apresentam aspecto de bacilo Gram-negativo com cápsula (Figura 01B) (SALAUDDIN *et al.*, 2019).

Figura 01. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae*.



Legenda: A- *K.pneumoniae* cultivada em ágar MacConkey destacando a fermentação de Lactose (coloração rosácea) e o aspecto mucóide das colônias que medem aproximadamente 04 mm de diâmetro. B- Coloração de Gram de *K. pneumoniae* evidenciando a presença de bacilos Gram negativos curtos. Aumento (1000x).

Fonte: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/klebsiella%20pneumoniae>. Acesso em 18 de abril de 2023.

As infecções por *Klebsiella pneumoniae* ocorrem com maior frequência em pacientes com sistema imunológico debilitado. Entretanto, infecções em pacientes previamente hígidos

de origem comunitária têm sido relatadas (HABIB *et al.*, 2022; LIN *et al.*, 2022). Esses microrganismos podem causar infecções de trato urinário (ITU), abscesso hepático, pneumonia, enterite, meningite, infecções de ferida operatória e sepse (DE SOUSA *et al.*, 2020). *Klebsiella pneumoniae* se dissemina muito fácil e rapidamente, sendo o contato pessoa a pessoa por mãos contaminadas a principal forma de disseminação. Dessa maneira, as medidas de prevenção mais relevantes compreendem a correta higiene das mãos com água e sabão ou álcool em gel (AHMAD; JOJI; SHAHID, 2022). Pacientes sob ventilação mecânica, em uso de dispositivos invasivos como cateteres ou submetidos a procedimentos cirúrgicos apresentam riscos de infecções causadas por estes patógenos (CHANG *et al.*, 2021).

Os fatores de virulência das bactérias são os principais meios de conferir a estes microrganismos o poder de burlar as defesas imunológicas de outro indivíduo e assim gerar um processo patológico nele. Nesse sentido, a *K. pneumoniae* possui diversas estruturas morfológicas e genéticas que atribuem proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, possibilitando sua reprodução e sobrevivência (WYRES *et al* 2020; WANG *et al* 2020; PACZOSA *et al* 2016). Com isso, destacam-se a produção de cápsula, os lipopolissacarídeos (LPS) e a síntese de sideróforos (PACZOSA *et al* 2016). Abaixo, alguns dos fatores de virulências mais importantes da *K. pneumoniae* encontram-se descritos.

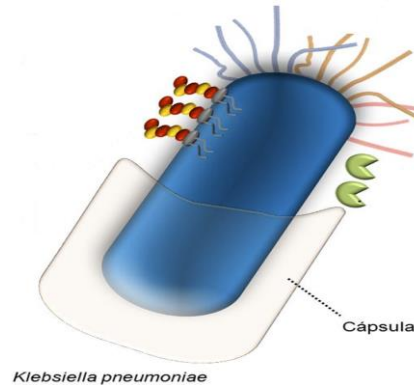
2.1.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula de *K. pneumoniae* é considerada seu principal fator de virulência, pois cepas hipervirulentas desse microrganismo possuem grande quantidade de polissacarídeo capsular, característica que lhes confere fenótipo de hipermucoviscosidade e alta resistência à fagocitose. A cápsula é uma matriz extracelular rica em polissacarídeos que envolve a bactéria e tem o intuito de garantir proteção contra as primeiras linhas de defesa do hospedeiro e além disso é responsável por garantir cor da colônia e o aspecto mucóide (CHUNG, 2016; MARTIN *et al* 2018). Algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae* não a apresentam, o que as torna pouco virulentas. Os que apresentam a cápsula possuem proteção contra dessecação no meio externo, contra a atividade bactericida do soro e fagocitose por macrófagos.

Dentre as *Klebsiella pneumoniae* capsuladas existem algumas que produzem maior quantidade de material capsular resultando em cápsulas maiores que contribuem para o aumento da patogenicidade (PACZOSA M. K., MECSAS J., 2016). Ela permite que a bactéria ultrapasse

as barreiras que protegem o hospedeiro para iniciar uma infecção que é seu principal mecanismo de evasão do sistema imunológico. Além disso, certas cepas de *K. pneumoniae* podem converter LPS em situações que não são reconhecidas pelas células hospedeiras, enquanto outras podem usar a cápsula para esconder o LPS da detecção por TLR4 (PIPERAKI *et al.*, 2017).

Figura 02: Representação da cápsula polissacarídica em *Klebsiella pneumoniae*

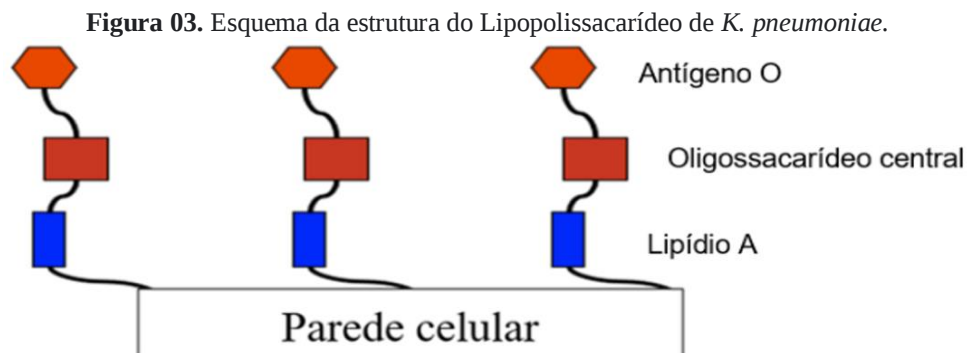


Fonte: Extraído e adaptado de GOMES (2018)

2.1.2 Lipopolissacarídeos

Além da cápsula, como citado anteriormente, o lipopolissacarídeo também é um dos principais mecanismos que a bactéria possui para promover sua defesa e resistência, e por conseguinte seu crescimento, por possuir em sua estrutura o Lipídeo A e o Antígeno O que contribuem para virulência na atividade de síntese de toxinas e modificação estrutural do LPS além de auxiliar na proteção contra o sistema complemento (ROCHA, 2021). Para o sistema imunológico do hospedeiro identificar o agente patológico, ele precisa que as células imunológicas reconheçam e se liguem ao lipídeo A do LPS por meio de um receptor Toll-like e iniciar a cascata de reações imunes do hospedeiro (BRYANT C. E. *et al.*, 2010). Porém, as modificações do componente lipídico A ajudam o patógeno a escapar do reconhecimento pelas células imunes do hospedeiro, favorecendo o patógeno a estabelecer a infecção com sucesso (LLOBET E. *et al.*, 2015).

O antígeno O presente na estrutura do LPS consiste em um polímero de repetição de cadeias de oligossacarídeos e fica localizado na parte mais externa do LPS. As diversas repetições deste antígeno são responsáveis pelas variações da estrutura do LPS. Por isso, cepas que contêm um antígeno longo são mais resistentes à eliminação pelo sistema complemento (PACZOSA M. K, MECSAS J., 2016).



Fonte: Extraído de TAVARES, (2019).

2.2 Epidemiologia das *Klebsiellas pneumoniae* multirresistentes

A *Klebsiella pneumoniae* leva a óbito cerca de 5,8 milhões de pessoas por complicações geradas em consequência de infecções em pacientes hospitalizados. Dessa maneira, esse patógeno representa um grave problema de saúde pública (DE SOUSA *et al.*, 2020).

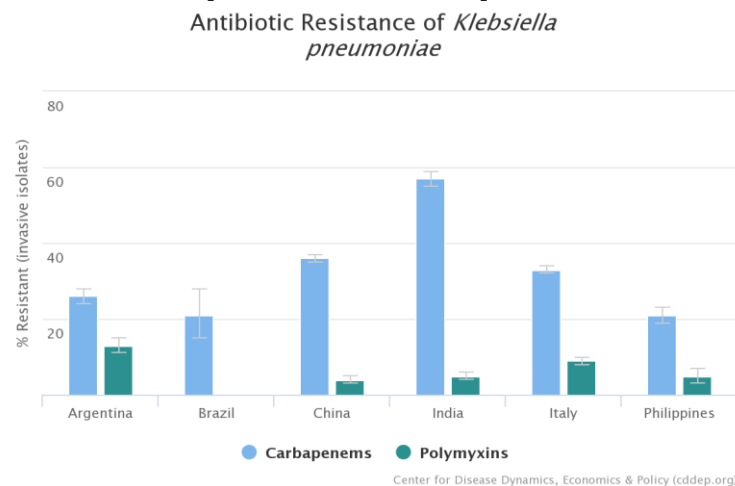
De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os grupos de resistência de monitoramento prioritário incluem: *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp.* e *Escherichia coli*) produtores de carbapenemase (WHO, 2019).

Nesse contexto, o relatório do *Surveillance Systems Reporting Data to GLASS-AMR* (2022) baseado em dados coletados de 87 países entre 2016 e 2020 revelou que 8% das Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) registradas nesse período foram causadas por *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos, sendo este, o patógeno mais frequente neste sítio de infecção junto com *Acinetobacter spp.* e *Escherichia coli*. Esse tipo de incidência aumenta consideravelmente o uso de polimixinas. Durante este período, houve um crescimento de 111% do nível de resistência em *K.pneumoniae* às cefalosporinas de terceira geração (isolados produtores de ESBL) e 57% de aumento dos índices de resistência aos carbapenêmicos.

Neste cenário, o gráfico 01 mostra dados do *One Health Trust* (que fornece dados coletados da OMS e órgãos privados) sobre o panorama de incidência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e polimixina em diferentes países do mundo. De acordo com este relatório, a incidência média de resistência aos carbapenêmicos foi superior a

20% em todos os países participantes, sendo mais prevalente na China e Índia, com índices de 37% e 57%, respectivamente. O Brasil relatou que 21% (157 isolados testados) foram resistentes aos carbapenêmicos em 2019. Em relação aos índices de resistência às polimixinas, o relatório apontou que a incidência média foi de 5%, sendo mais prevalente na Argentina e Itália com índices de 13% e 9%, respectivamente. Quanto aos índices do Brasil de resistência às polimixinas em *K.pneumoniae*, até aquele momento, não existiam índices consolidados, demonstrando o problema da subnotificação dos dados de resistência antimicrobiana e a ausência de uma epidemiologia centralizadora que permita avaliar a real extensão desse problema.

Gráfico 01: Incidência de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e *Klebsiella pneumoniae* resistente à polimixina em diferentes países do mundo.



Fonte: ResistantMAP of OneHealthTrust. Disponível em:

<https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>. Acesso em 23 de abril de 2023.

A colistina é um antibiótico eficaz contra bastonetes Gram-negativos e tem sido utilizada tanto na clínica quanto como promotor de crescimento para fins veterinários, principalmente para o tratamento de infecções urinárias causadas por Enterobacterales. No entanto, a resistência à colistina foi encontrada em *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Campylobacter spp.* em pacientes ou no ambiente (CATRY et al., 2015; Sherry et al., 2018).

A resistência à colistina em *Enterobacteriaceae* se espalhou por todo o mundo desde então (ANTONIADOU et al., 2017). Um estudo epidemiológico da Tunísia analisou os dados

do CoR *K. pneumoniae* em um hospital nacional de 2002 a 2013 e descobriu que a taxa de resistência à colistina em *K. pneumoniae* aumentou de 3,57% em 2002 para 9,68% em 2013 (BATIKKH *et al.*, 2017). Um estudo retrospectivo em Dubai descobriu que 27% dos *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem eram resistentes à colistina em 05 grandes hospitais e uma taxa de resistência maior foi descoberta apenas na Itália (43%) (MOUBARECK *et al.*, 2018).

Um contexto ainda mais preocupante é quando esses dois tipos de mecanismos de resistência estão correlacionados. O uso empírico da polimixina como antibioticoterapia para infecções causadas por KPC está sendo associado às altas taxas de resistência simultânea entre as espécies (BARTOLLETTI *et al.*, 2016). Sabendo disso, o aumento da resistência aos carbapenêmicos na última década, causado pela disseminação do KPC, consequentemente também aumentou a resistência às polimixinas, como observado em estudo realizado em São Paulo: 0% em 2011, 4,8% em 2014 e 27,1% em 2015 (BARTOLLETTI *et al.*, 2016), semelhante ao resultado de outro estudo brasileiro que utilizou isolados obtidos em 2016 (29,5%)(CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2022). Esse padrão de aumento da resistência à polimixina que sendo observado era esperado, tendo em vista a pressão seletiva que esses microrganismos estão sofrendo no ambiente hospitalar, pois a KPC continua sendo a enzima mais frequentemente associada à resistência aos carbapenêmicos no Brasil, e sua prevalência nacional foi confirmada por outros autores (DA SILVA *et al.*, 2020).

2.3 *Klebsiella pneumoniae* e IRAS

O termo infecções hospitalares vem sendo substituído nos últimos anos por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), no qual a prevenção e o controle das infecções passam a ser considerados para todos os locais onde se presta o cuidado e a assistência à saúde. IRAS são definidas como qualquer infecção adquirida após a internação do paciente, ou mesmo após a alta, podendo ser relacionada com procedimentos hospitalares realizados durante a internação, no ambulatório, durante cuidados domiciliares e também relacionado a infecção ocupacional adquirida por profissionais de saúde (médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, entre outros (SILVA e PADOVEZE, 2015).

Alguns fatores podem contribuir para o aumento dos riscos de IRAS, como a idade (recém-nascidos ou idosos), obesidade, desnutrição, diabetes, uso de alguns medicamentos,

como os quimioterápicos, e o tabagismo. Outros fatores, como o tempo de permanência nos serviços de saúde (quanto maior o tempo, maior o risco de adquirir infecções), a necessidade de procedimentos invasivos (como o uso de sondas, cateter e cirurgias) e o uso excessivo de antibióticos, favorecem a quebra de proteção do organismo, aumentando a chance de infecção (SILVA e PADOVEZE, 2015). Atualmente, a pandemia da COVID-19 representou um grande aumento na incidência de IRAS relatado em todo o mundo (BONAZZETTI *et al.*, 2021; OCHOA-HEIN *et al.*, 2021; ADVANI *et al.*, 2022). Nos EUA esse aumento significou uma reversão de quase 5 anos de redução nas taxas de infecção de corrente sanguínea associada a cateter central (CDC, 2022). Porém, o aumento das IRAS parecia ser proporcional ao número de casos de COVID-19. A Alemanha, onde apenas 5% do país estava infectado com COVID-19 no início de 2020, não registrou aumento de IRAS durante os primeiros meses da pandemia (GEFFERS *et al.*, 2022).

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), seguida por infecção de corrente sanguínea (ICS) e infecção do trato urinário (ITU), principalmente causadas por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, são os eventos mais frequentes associados à IRAS e um grave problema de saúde pública, pois aumentam a morbidade, a mortalidade, além de afetar de forma negativa a segurança do paciente e a qualidade dos serviços de saúde. Somada a isso, prolongam o tempo de internação hospitalar e aumentam a necessidade de um nível mais alto de assistência, com consequente elevação dos custos para os pacientes e instituições de saúde, além de causar estresse nos sistemas de saúde (ANVISA, 2021). No Brasil, segundo o relatório dos estados sobre as Infecções relacionada à assistência à saúde da ANVISA, a *Klebsiella pneumoniae* foi a bactéria gram-negativa mais prevalente nas infecções primárias de corrente sanguínea nas UTI's de adultos, estando no topo da lista em 14 dos 24 estados analisados (dados do estado de São Paulo não estavam disponíveis), e nos outros 10 estados aparecia em segundo lugar. Em estados como Espírito Santo e Goiás o número de isolados registrados quadruplicou entre os anos de 2019-2021 (ANVISA, 2022).

2.4 Impacto das IRAS

Embora as evidências relacionadas ao ônus econômico das IRAS ainda sejam limitadas, principalmente nos países em desenvolvimento, os dados disponíveis nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa sugerem custos estimados em bilhões por ano. De acordo com diferentes estudos realizados pelo World Banking (2017), projeta-se que o problema da Multirresistência custe entre US\$ 300 bilhões a mais de US\$ 1 trilhão anualmente até 2050. Segundo o Centers for Disease Control and Prevention dos Estados Unidos da América (CDC/EUA), os custos médicos diretos das IRAS para hospitais, apenas nos EUA, variam de US \$ 35,7 a 45 bilhões anuais, enquanto o impacto econômico anual na Europa chega a € 7 bilhões. Em um estudo realizado no Brasil que estimou os custos de ocupação total e média por paciente com ou sem IRAS, concluiu-se que o custo diário do paciente com IRAS foi 55% superior ao de um paciente sem IRAS. Outro estudo feito pela Universidade de São Paulo no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, o custo direto por paciente infectado por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase tem estimativa conservadora de aproximadamente US\$ 4,100.00, dos quais 60% ocorrem durante a infecção (SANTOS e SECOLI, 2019).

Além dos custos hospitalares, as IRAS causam impacto também na rotina dos pacientes e no seu tempo de internação. Um estudo feito por Watanabe (2015) mostrou que de um total de 1318 pacientes, 215 (15%) adquiriram pelo menos uma infecção durante o período de internação. Em relação ao período de internação destes 215 pacientes, a média de permanência hospitalar foi de 30,3 dias (intervalo de 2-135 dias), sendo que 78,6% dos pacientes permaneceram internados por mais de 15 dias (WATANABE et al., 2015). Em contrapartida, o período médio de hospitalização para pacientes que não desenvolvem IRAS é de 3,7 dias (OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010), evidenciando o impacto negativo das IRAS no prolongamento da hospitalização. Essa escassez de dados brasileiros dificultam a noção do impacto das IRAS e o entendimento da necessidade da abordagem desse assunto em hospitais por todo país.

2.5 Controle das IRAS

Neste contexto, a estruturação e o fortalecimento de programas de prevenção e controle de IRAS em todos os níveis de gestão (federal, estadual/distrital e municipal) e em todos os serviços de saúde são essenciais impactam na redução da resistência microbiana (RM) e morbimortalidade dos pacientes (ANVISA, 2021).

A prevenção e o controle de infecção devem fazer parte da cultura institucional, para tanto, os seus profissionais devem estar conscientes da importância do tema e preparados desde a sua formação, seja no nível técnico ou na graduação, quanto as medidas de prevenção de IRAS preconizadas pelos órgãos regulamentadores, como por exemplo o uso de técnicas corretas de higiene das mãos e o uso adequado e correto de equipamentos de proteção individual (EPI). (ANVISA, 2021)

Diante disso, vale a pena reforçar a importância dos investimentos em programas educativos que sensibilizem os profissionais de saúde para sua prática assistencial, tendo como meta o foco nos processos de limpeza hospitalar do ambiente, cuidados com equipamentos. E, sobretudo a adoção de boas práticas por estes profissionais juntamente com ações amplas que perpassam pela adesão de medidas de prevenção específicas, uso racional de antimicrobianos, métodos de diagnósticos assertivos bem como vigilância microbiológica adequada. Além disso, a monitorização contínua da higienização das mãos seja entre os profissionais de saúde e também entre pacientes e pessoas que circulam no ambiente de assistência à saúde como forma potencial de se reduzir a transferência horizontal de patógenos entre profissional, paciente e ambiente (OLIVEIRA, DAMASCENO, 2012).

2.6 Fatores de risco associados à infecção por PR-CRKP

As infecções por *K. pneumoniae* são dependentes de uma porta de entrada, como procedimentos de intubação orotraqueal, traqueostomias, utilização de cateter venoso central e outros procedimentos considerados como invasivos (RIBEIRO *et al.*, 2015). Assim, a realização de procedimentos invasivos em pacientes internados em hospitais, leva ao aumento

de colonização e infecção por PR-CRKP, principalmente nas UTI's, onde os pacientes apresentam maiores fatores de riscos, porém, vale ressaltar que seu processo de colonização ocorre através do contato direto (RIBEIRO *et al.*, 2015).

A terapia antimicrobiana empírica inadequada de infecções graves causadas por PR-CRKP também tem sido associada a um aumento da morbidade e mortalidade. Para evitar o uso excessivo de antibióticos de amplo espectro, é importante uma seleção cuidadosa de pacientes que podem receber tratamento empírico cobrindo infecções KPC-KP (VASOO S., BARRETO J. N., TOSH P. K., 2015). Imunossupressão, histórico recente de tratamento com antimicrobianos e internações são alguns dos fatores de riscos mais importantes para o desenvolvimento de infecções emergentes de PR-CRKP. Além disso, as infecções por PR-CRKP foram associadas a viagens, imigrações e cuidados médicos recentes em áreas endêmicas, como EUA, Itália, Grécia, Turquia e Israel (BASSETI M. *et al.*, 2017; XU L., 2017).

2.7 Métodos de detecção de produção de carbapenemase e resistência às polimixinas.

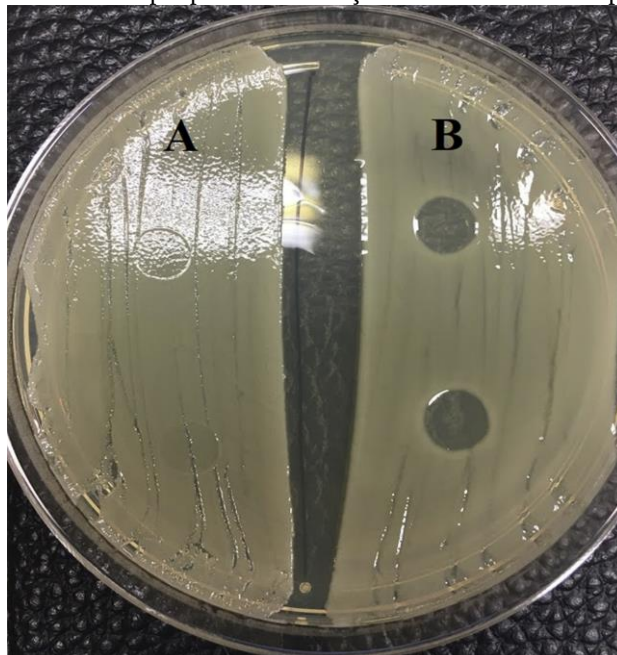
As polimixinas se tornaram antibióticos de grande importância no combate a infecções causadas por MDR devido à escassez de opções terapêuticas. Porém, a detecção de resistência às polimixinas é um grande desafio na rotina clínica dos laboratórios de microbiologia devido a sua natureza catiônica e sua aptidão de absorver superfícies plásticas, tornando métodos extensamente utilizados como difusão em disco ineficientes (HUMPHRIES, 2015; SIMAR *et al.*, 2017). Testes como: Colispot, Polimixina NP, Drop Test e a microdiluição em caldo (padrão ouro), são alguns testes disponíveis para monitorar o perfil de susceptibilidade às polimixinas nesses isolados clínicos.

2.7.1 Teste Colispot e Drop Test

O teste Colispot é um método fenotípico que busca determinar a suscetibilidade da bactéria às Polimixinas através da análise do diâmetro formado ao redor da gota da solução antimicrobiana com concentração de 8 µg/mL colocada na superfície do ágar (JOUY, 2017)

como exemplificado na Figura 04. Ele é caracterizado por ser um teste de rápida execução e de fácil interpretação. O Drop Test, por sua vez, tem basicamente o mesmo princípio, porém no teste Colispot o halo precisa ser medido para obter o resultado, diferente do Drop Test que não é necessária a medida e utiliza concentração inicial de colistina de 16 µg/mL. Dessa forma, a presença de qualquer halo no Drop Test indica sensibilidade. Além disso, o Colispot apresenta baixa sensibilidade (74%) se comparado a outros testes que geralmente tem >90% de sensibilidade, principalmente em isolados com baixos níveis de resistência às polimixinas (CONCEIÇÃO-NETO, 2020). No mesmo estudo, Conceição-Neto e colaboradores avaliaram o desempenho do Colispot para determinação de resistência às polimixinas e foi observado que a Concordância de Categoria (CA) - que é considerada a porcentagem de isolados que produzem o mesmo resultado categórico (suscetível, intermediário ou resistente) quando comparados com o método de referência - foi baixíssimo em MICs de 16, 8, 4µg/mL, tendo como resultado 53,8%, 45,4%, 7,7% respectivamente. O Drop Test apresenta concordância categórica entre 97,8 a 98,2% (CONCEIÇÃO-NETO, 2020).

Figura 04: Teste Colispot para determinação de suscetibilidade à polimixina.



Legenda: Em ‘A’, isolado resistente, caracterizado pela ausência do halo. Em ‘B’, isolado suscetível (halo de inibição de 7 mm). Aos 2 isolados de *K. pneumoniae* foram adicionadas duas gotas de solução de colistina (8 µg/mL) separadamente para comparação em meio Mueller Hinton com ajuste de suspensão a 0,5 na escala de McFarland.

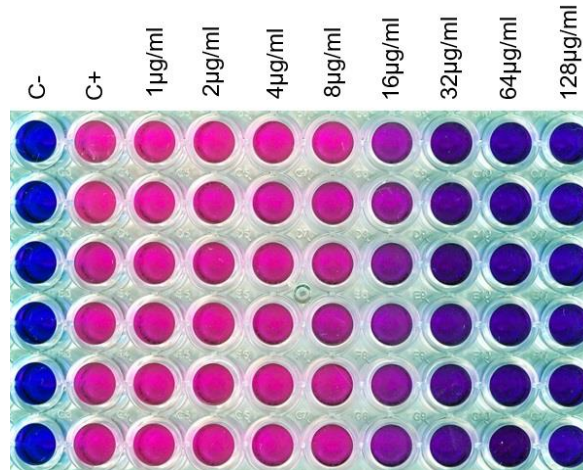
Fonte: Extraído de CONCEIÇÃO-NETO, (2020).

2.7.2 Microdiluição em caldo

O método se baseia na exposição do isolado a concentrações seriadas de antimicrobiano pré-estabelecida, possibilitando determinar o MIC e a partir desse disso, caracterizar a bactéria como resistente ou suscetível comparando o resultado com a tabela de pontos de corte para cada microrganismo e antibiótico. O teste só será válido se os poços das soluções usadas como controle seguirem os padrões pré-determinados, o primeiro poço, normalmente o controle negativo, deverá se manter sem turvação (estéril) e o segundo poço, o controle positivo, deverá apresentar turvação (referente ao crescimento da bactéria) (ANVISA, 2022). O padrão de interpretação da turvação é uma das formas visuais de diferenciação do resultado, podendo também ser utilizado o corante azul resazurina (redutível a resorufina que é um corante rosa) para evidenciar a mudança do meio. Qualquer alteração na tonalidade do azul, que é a cor inicial, representa o crescimento bacteriano, indicando resistência ao antibiótico (COELHO, 2021).

Atualmente, é o único método recomendado pelo EUCAST/BrCAST para a avaliação da sensibilidade às polimixinas (ANVISA, 2020), por isso é amplamente utilizado, até como método de validação e comparação de resultados em pesquisas de novos testes (MALLI *et al.*, 2018; DALMOLIN *et al.*, 2019). Porém, é conhecida a tendência das polimixinas de se aderirem aos plásticos das placas utilizadas e estudos mostram impacto significativo nos MICs obtidos com o uso deste material (ALBUR *et al.*, 2014; KARVANEN *et al.*, 2017), apesar de ter como alternativa o uso de placas de poliestireno (EUCAST, 2016), nem todos os laboratórios possuem este recurso em sua rotina diária, limitando seu uso a projetos de pesquisa. Além disso, a complexidade da técnica e a exigência de antimicrobianos em pó, os quais têm - em geral - custo elevado, são outras desvantagens da técnica (ANVISA, 2022).

Figura 05: Resultados representativos do teste de microdiluição em caldo.



Legenda: C- representa o controle negativo do teste (controle estéril onde não é inoculado a bactéria) e C+ representa o controle positivo (controle onde é inoculado a bactéria e precisa ter crescimento bacteriano (alteração da cor inicial (azul))). Em ambas as colunas foi adicionado o antimicrobiano. A partir da terceira coluna, o antimicrobiano está presente, variando a sua concentração.

Fonte: Extraído e adaptado de SCHAAF (2017).

2.7.3 Teste rápido Polimixina NP

Alguns testes fenotípicos alternativos foram desenvolvidos visando o uso na prática clínica com intuito de praticidade e rapidez a exemplo do Teste Rápido de Polimixina NP, criado por Nordmann *et al.* em 2016, que pode revelar resultados em menos de 2h. O método tem como princípio a análise dos resultados pela variação de cor da solução. Os isolados são considerados resistentes quando a cor da solução reveladora mudou de laranja/vermelho para amarelo, como observado na Figura 06, fornecendo resultados de 20 minutos a 4 horas após incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A mudança de cor da solução é causada pela formação de ácido na solução devido ao uso da glicose como substrato para a bactéria (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2020). A simplicidade para elaboração do teste é um dos seus pontos fortes, visando um novo mecanismo para a rotina laboratorial, pois é feito basicamente de duas soluções de simples confecção. Após sua criação, diversos estudos foram feitos comparando este teste com o de microdiluição em caldo, reconhecido como padrão ouro nestes casos e os resultados foram satisfatórios. Em bactérias que possuíam o gene *mcr*, o teste Polimixina NP foi capaz de detectar resistência em todos os isolados (JAYOL *et al.*, 2018; PORIEL *et al.*, 2018; MITTON *et al.*, 2019). Porém, em alguns relatos na literatura (CONCEIÇÃO-NETO O. C. *et al.*, 2020; POIREL

e NORDMANN, 2017), os resultados em casos de isolados com baixo nível de resistência a Polimixina foram considerados como erros graves, com CA insuficiente para aceitação (<90%), especialmente para isolados de *K. pneumoniae*, que caracteristicamente apresentam colônias mucóides em meio sólido (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2020), a quantificação tornou-se difícil e carente de precisão. Os níveis de sensibilidade e especificidade do teste, no geral, são aceitáveis, variando entre 90-100% de sensibilidade e 94-100% de especificidade (COCENIÇÃO-NETO *et al.*, (2020); SHOAIB *et al.*, 2020; YAINOY *et al.* (2018); MALLI *et al.*, (2019).

Figura 06: Resultados representativos de teste rápido Polimixina NP.



Legenda: A primeira coluna vertical representa os poços onde a Colistina foi adicionada a solução e a segunda onde a Colistina não está presente nas soluções. A primeira linha vertical foi usada como controle do teste (poço sem bactéria). A segunda linha vertical é referente aos poços onde foi inoculado uma cepa suscetível à colistina. A terceira linha vertical representa os poços onde foi inoculado uma cepa resistente à Colistina. A mudança de coloração do vermelho para amarelo indica crescimento bacteriano.

Fonte: Extraído e adaptado de PORIEL (2018).

2.8 Dificuldade de detecção de baixo nível de resistência às polimixinas

A reconhecida falta de recursos financeiros da maioria dos laboratórios de

microbiologia clínica justifica os métodos de diagnósticos pouco eficazes, atenuando a dificuldade enfrentada de reconhecer a real patogenicidade do microrganismo (TANIGUCHI et al., 2019; ASTOLFO et al., 2018). A escassez de dados referentes aos recursos e infraestrutura de hospitais e laboratórios de microbiologia tornam ainda mais abstrato o real cenário enfrentado pela saúde pública no Brasil e no mundo, tendo em vista que, se pudéssemos quantificar e enxergar o panorama geral, atitudes mais pontuais poderiam ser tomadas para minimizar este conflito.

Apesar disso, mesmo os métodos que requerem recursos maiores para serem realizados e tidos como padrão ouro para detecção de resistência às polimixinas, como a microdiluição em caldo, por vezes divergem de outros testes, que pode resultar uma interpretação imprecisa de cepas resistentes como suscetíveis, principalmente em casos de níveis baixos de resistência (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2020). A aparição destes baixos níveis de resistência pode ser caracterizada por uma heterorresistência do isolado. Este fenômeno de heterorresistência, observado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ocorre quando subpopulações de bactérias aparentemente isogênicas exibem uma gama de susceptibilidades a um determinado antibiótico, podendo ser intrínseca ou adquirida e podem ser evidenciadas pela presença de padrões *skipped wells* na microdiluição em caldo (EL-HALFAWAY, VALVANO, 2015; BIR et al., 2022). A heterorresistência intrínseca ocorre sem pré-exposição ao antibiótico, mas a heterorresistência também pode ser adquirida ou induzida após a exposição inicial aos antibióticos (EL-HALFAWAY, VALVANO, 2015). Os padrões *skipped wells* são caracterizados pela falta de crescimento em poços com concentrações mais baixas de antibiótico seguida de um poço, com uma concentração maior que a anterior, indicando crescimento bacteriano (TURLEJ-ROGACKA et al., 2018). Este fenômeno foi relatado amplamente na literatura (MATUSCHEK et al., 2018; ELIAS et al., 2021; BIR et al., 2022), porém a causa ainda não foi completamente elucidada. A hipótese mais difundida é de que esteja relacionado à aderência do antimicrobiano ao material plástico no qual placa é feita, porém, na prática, essa hipótese não se comprova, tendo em vista que se fosse este o motivo, teria que ocorrer com todas as espécies, fato que não acontece (CHEW et al., 2017; MATUSCHEK et al., 2018).

2.9 Principais mecanismos de resistência antimicrobiana encontrados em *K.pneumoniae*

Isolados de *K.pneumoniae* têm apresentado elevada resistência a uma série de antibióticos empregados na clínica. Muitos desses mecanismos de resistência têm sido adquiridos através de transferência horizontal de genes, conferindo altos níveis de resistência em relação aos antibióticos B-Lactâmicos e Quinolonas (SHEN *et al.*, 2023; RABELO *et al.*, 2023).

Até a década de 80, a utilização de cefalosporinas de 3ª geração apresentava elevada eficácia contra isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Em 1985, este cenário mudou com a descoberta das Beta-lactamases TEM-3, posteriormente denominadas de ESBL (Beta Lactamases de Espectro Estendido) (SOUGAKOFF *et al.*, 1988). Inicialmente descritas na França, a presença destes mecanismos de resistência só foi detectada no Brasil em 1994 (CASELLAS; BLANCO; PINTO, 1994; CHENG *et al.*, 2022). ESBLs são enzimas plasmidiais que apresentam capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta gerações, monobactâmicos, mas não apresentam atividade contra carbapenêmicos (KNOTHE *et al.*, 1983). Diversos trabalhos de revisão de resistência antimicrobiana em Enterobacterales têm demonstrado que a maioria das ESBLs detectadas são dos tipos TEM, SHV e CTX-M, onde a CTX-M2 foi o tipo mais prevalente. Inicialmente descrito em isolados exclusivamente hospitalares, esse mecanismo de resistência, a partir dos anos 2000, tem sido amplamente encontrado em amostras clínicas de pacientes da comunidade (RAOUF *et al.*, 2022; SALAZAR-VIZCAYA *et al.*, 2022).

As AmpC também são mecanismos bastante presentes em *K. pneumoniae*. Essas enzimas hidrolisam penicilinas, cefalosporinas até terceira geração (não hidrolisam cefalosporinas de quarta geração, a exemplo de cefepima) e hidrolisam cefamicinas (com exceção da enzima ACC-1, uma AmpC mediada por plasmídeo que não hidrolisa cefoxitina). Fenotipicamente são fracamente inibidas pelos bloqueadores de β -lactamases clássicos, a exemplo de ácido clavulânico, característica que as distingue das ESBLs (JAURIN; GRUNDSTRÖM, 1981). Isolados pertencentes ao grupo CESP/MYSPACE (*Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Hafnia alvei*) possuem genes cromossômicos induzíveis que codificam para AmpCs. *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.* e *P. mirabilis* podem adquirir genes plasmidiais que carregam o gene *ampC*, o

que confere as mesmas características observadas em mutantes cuja regulação gênica pode levar à hiperprodução dessas enzimas. Esses mecanismos, quando associados a bombas de efluxo e/ou perda de permeabilidade, podem levar a resistência a carbapenêmicos (MAHLEN *et al.*, 2003; DE ALMEIDA *et al.*, 2022).

A resistência mediada por AmpC plasmidial foi inicialmente identificada nos anos 80 (JAURIN; GRUNDSTRÖM, 1981). Categorizadas na classe C pela classificação molecular das β -lactamases, possuem várias linhagens que são provenientes de AmpCs cromossômicas, por exemplo, MIR e ACT de *Enterobacter spp.*; CMY, LAT e FCE de *Citrobacter spp.*; DHA, ACC e FOX de *Morganella morganii*, *Hafnia alveii* e *Aeromonas spp.* respectivamente (HALL; BARLOW, 2005; JACOBY, 2009).

Adicionalmente, alterações da permeabilidade da membrana celular, alteração de sítio de ação e a presença de bombas de efluxo também são mecanismos descritos em *K. pneumoniae* (CHEVALIER *et al.*, 2000; PADILLA *et al.*, 2010; KARAMI-ZARANDI *et al.*, 2023).

Devido a emergência das ESBLs, AmpCs e a versatilidade na combinação de diversos mecanismos de resistência antimicrobiana, os carbapenêmicos passaram a ser, a partir dos anos 90, a classe de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (LIVERMORE *et al.*, 2012). Entretanto, a pressão seletiva e a capacidade evolutiva desses isolados, dotou esses microrganismos de eficientes mecanismos de resistência a esta importante classe de antimicrobianos: as carbapenemases.

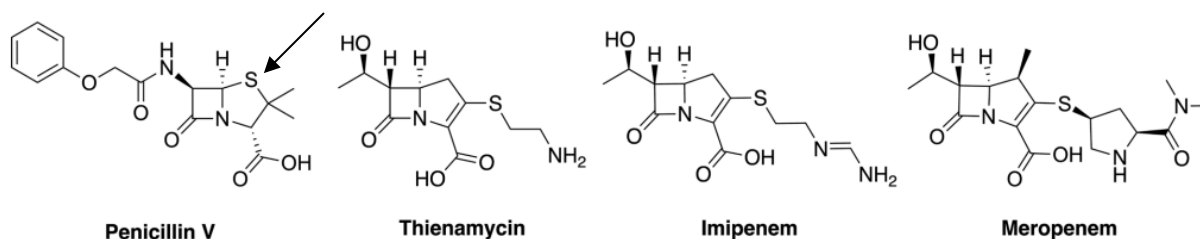
2.9.1 *Klebsiella pneumoniae* e a produção de carbapenemase

Principal classe de antimicrobianos empregada em casos de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos em pacientes hospitalizados, os carbapenêmicos foram inicialmente isolados em 1976 (KAHAN *et al.*, 1979). Apesar de mostrar significativa potência, o uso clínico foi limitado por sua instabilidade na água. Desde então, a otimização da química medicinal produziu um versátil número de carbapenêmicos: imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem, por exemplo (ARMSTRONG; FENN; HARDIE, 2021).

Carbapenêmicos são antibióticos Beta-lactâmicos. Como mostrado na Figura 07, em contraste com as penicilinas, o sistema de anel fundido 4:5 nesta classe é insaturado e não possui

anel de enxofre. Essa configuração fornece melhor resistência às Beta-lactamases (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

Figura 07. Estrutura química dos carbapenêmicos em comparação com a estrutura da penicilina V. A substituição do enxofre em um dos anéis (seta) confere maior resistência contra a atividade de Beta-lactamases.



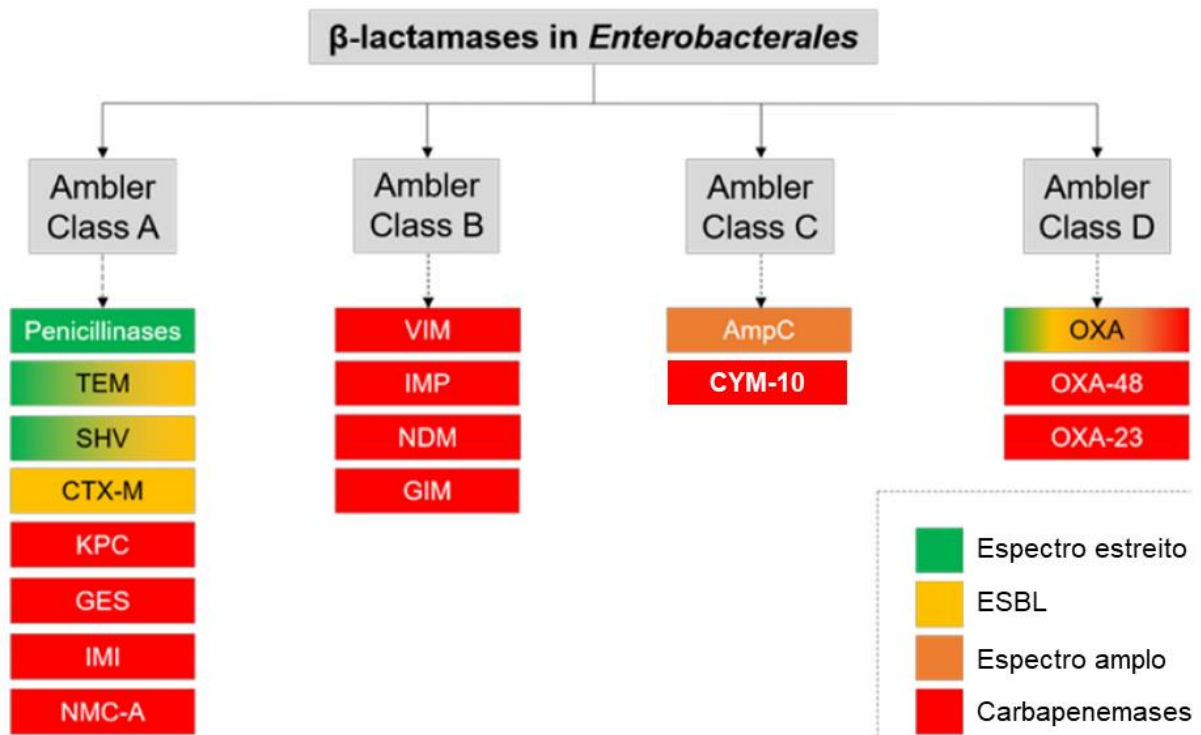
Fonte: Extraído e adaptado de ARMSTRONG; FENN; HARDIE (2021)

A resistência em bactérias Gram-negativas surge através de três principais mecanismos:

(i) O primeiro é a produção de β -lactamases (carbapenemases) que desativam as drogas antes que este exerça o seu efeito terapêutico hidrolisando o anel Beta-lactâmico. Classificadas em dois grandes grupos com base em seus modos de ação: serina-dependente (classe A e D de Ambler) e metal dependente (classe B de Ambler, também denominada metalo- β -lactamase), essas enzimas representam o mecanismo mais versátil e frequente de resistência aos carbapenêmicos. As enzimas de maior importância clínica pertencentes à Classe A são as KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e suas variantes - apesar de ser identificada inicialmente nesta espécie, possui ampla distribuição em outros isolados pertencentes às Enterobacterales) (GOMES, 2018). Na classe B, as variantes de NDM (New Delhi Metallo Beta-Lactamase), na classe C a CYM-10 e na classe D as variantes de OXA são as mais frequentes. Entretanto, diversas famílias integram essas diferentes classes (Figura 08), conferindo fenótipos de resistência igualmente preocupantes (NOSTER; THELEN; HAMPRECHT (2021). Apresentam ampla distribuição e os genes que as codificam podem estar presentes em plasmídeos e transposons, o que facilita a sua disseminação (ABOU-ASSY *et al.*, 2023). Uma preocupação particular é a aquisição de resistência múltipla mecanismos, como observado em *P. aeruginosa*, que diminui significativamente a eficácia do carbapenêmico (FANG *et al.*, 2023). (ii) superexpressão de bombas de efluxo efetivamente remove as drogas do ambiente celular, e (iii) resistência mediada por porina restringe a entrada no espaço periplasmático da célula bacteriana, que é o principal fator de resistência em *P. aeruginosa*

(BAŞARAN e ÖKSÜZ, 2023). Esses fatores reforçam a necessidade do uso racional de antimicrobianos.

Figura 08. Classificação de Ambler com as principais Beta-lactamases encontradas em Enterobacterales destacando as principais famílias de carbapenemases isoladas na prática clínica.



Fonte: Extraído e adaptado de NOSTER; THELEN; HAMPRECHT (2021)

A identificação cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC no Brasil iniciou-se em Recife, no ano de 2009, quando foram divulgados a presença das primeiras cepas de *K. pneumoniae* portadoras do gene blaKPC-2 que haviam sido isoladas em meados de 2006 em uma Unidade de Terapia Intensiva da capital (MONTEIRO *et al.*, 2009). A KPC-2 é descrita em estudos nacionais como a carbapenemase mais comum e endêmica no Brasil, sendo os tipos sequenciais ST11 e ST437 os principais identificados, pertencentes ao complexo clonal 258 (SAMPAIO e GALES, 2016; THOMAS *et al.*, 2022). Com a disseminação das carbapenemases na maioria dos países dos diferentes continentes e a indisponibilidades de novos antimicrobianos para uso clínico, as polimixinas passaram a ser amplamente utilizadas para tratar esses isolados. Entrava em cena a última linha de defesa contra a escalada da

multirresistência antimicrobiana. Entretanto, as ferramentas moleculares de resistência também evoluíram nesse sentido.

2.9.2 Mecanismos de resistência às polimixinas

Ao final do século 20, uma era de emergência de bactérias multirresistentes, antimicrobianos anteriormente negligenciados como a polimixina B e a colistina (polimixina E), as duas formas de polimixinas comercialmente disponíveis, ressurgiram nos últimos vinte anos como uma classe de antimicrobiano essencial, sendo atualmente uma das que possui maior atividade contra bacilos Gram-negativos multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, tendo seu uso feito com sucesso e frequência variáveis em diversas regiões do mundo (POGUE, *et. al*, 2016; ROBERTS, *et. al*, 2015; VARDAKAS e FALAGAS, 2016; XIA e JIANG, 2021; PENG *et al.*, 2023). Com isso, estes assumiram um papel importante na terapia antimicrobiana de infecções por KP-KPC, consideradas muitas vezes como intratáveis (TSUJI *et al.*, 2019).

Na verdade, quando o uso de Beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas é ineficaz, observa-se um aumento do uso da polimixina, que anteriormente era tido como um antibiótico de reserva, utilizado como última opção de tratamento devido a sua alta nefrotoxicidade, no tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Hoje, este antimicrobiano já é utilizado como tratamento de primeira linha em diversas situações, principalmente em serviços de saúde com orçamento mais escasso, evidenciando a falta de opções terapêuticas em função da multirresistência aos antimicrobianos outrora eficazes (DE CARVALHO., 2022; FASSEEH *et al.*, 2023).

Os problemas de toxicidade envolvendo as polimixinas ainda continuam um importante limitador do uso terapêutico, pois estudos clínicos recentes relatam que nefrotoxicidade associada ao uso de polimixinas pode ocorrer na ordem acima de 60% dos pacientes, quando administradas de maneira intravenosa; sendo a nefrotoxicidade o principal fator limitante da dose para seu uso clínico ótimo (RIGATTO *et al.*, 2015). Além disso, doses abaixo da dose ótima, podem promover a emergência de resistência às polimixinas (ROBERTS, *et. al*, 2015).

Isolada em 1940 a partir do *Bacillus polymyxa*, as polimixinas exercem efeito bactericida devido a interação com moléculas de LPS da membrana externa da bactéria Gram

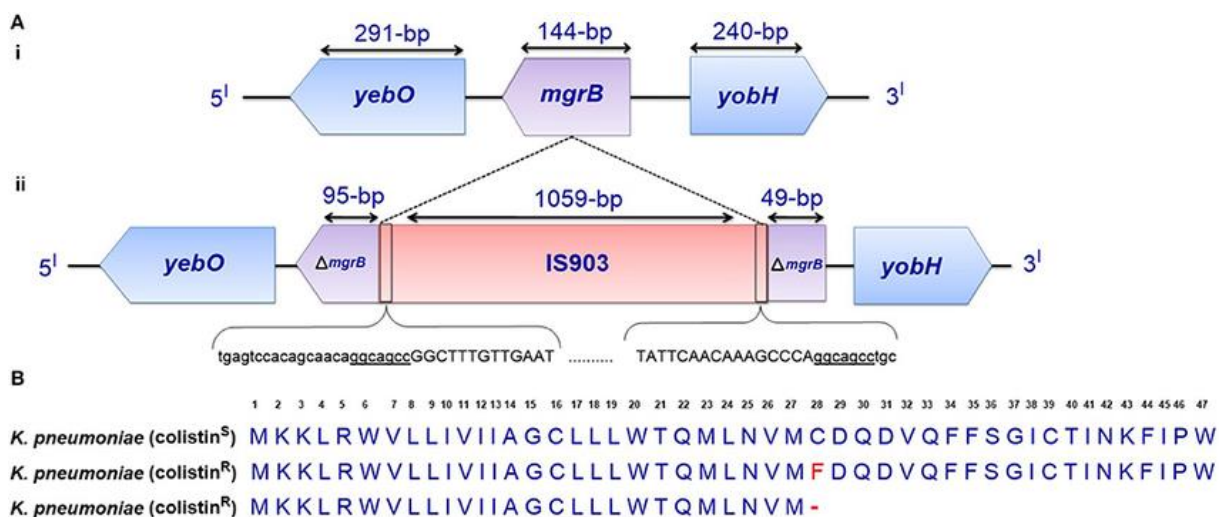
negativa levando a sua ruptura (STANSLY e SCHLOSSER., 1947). A carga positiva da polimixina liga-se a carga negativa da membrana externa e ocorre o deslocamento de cátions divalentes dos grupos fosfatos de lipídios A (LEUNG *et al.*, 2017). Sabendo disso, o mecanismo de ação das polimixinas se relaciona diretamente com a afinidade desses antimicrobianos com as cargas negativas do lipídio A, componente do LPS bacteriano, na membrana externa.

O primeiro relato de *K. pneumoniae* resistente à colistina (CoR) foi isolado em Atenas em 2004 (MIRIAGOU *et al.*, 2005). A maioria dos mecanismos de resistência contra as polimixinas giram em torno da modificação do lipídio A, sendo o mecanismo mais efetivo a substituição catiônica dos grupos de fosfato na molécula pela 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N). A segunda alteração mais efetiva é a adição de fosfoetanolamina (PEtN). Essas modificações diminuem a carga negativa na membrana externa bacteriana, o que diminui a afinidade dessa estrutura com as polimixinas (TRIMBLE *et al.*, 2016).

Outra maneira da bactéria adquirir resistência é por meio da inativação da pequena proteína reguladora MgrB. Ela é uma pequena proteína transmembrana produzida após a ativação do sistema de sinalização *PhoPQ* e atua como um regulador negativo neste sistema. Sem um MgrB funcional, o sistema de dois componentes *PhoPQ* é constitutivamente ativo, levando a um aumento nas modificações do lipídio A e subsequente resistência à colistina (LI *et al.*, 2023). Essa alteração se dá por uma adição de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (LAra4N) na porção do lipídeo A do LPS (SARA *et al.*, 2018) e é negativamente regulada pela proteína MgrB (WRIGHT *et al.*, 2015). A biossíntese de LAra4N é mediada por *PmrA/PmrB* (*PmrAB*) e *PhoP/PhoQ* (*PhoPQ*) que são dois componentes de sistemas de regulação (BARIN, 2013). *PhoQ* é uma quinase transmembrana e *PhoP* uma proteína reguladora que tem a capacidade de se autofosforilar e também, na presença de pH baixo e baixos níveis de Mg^{2+} ou Ca^{2+} , fosforilar o *PhoQ* (JAYOL *et al.*, 2015). Esta modificação limita a interação com as polimixinas e reduz a absorção do fármaco pela bactéria (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013), pois altera a composição da membrana e diminui a carga negativa da membrana externa de *K. pneumoniae*, (VELKOV *et al.*, 2013) causando diminuição da afinidade dessa membrana com as Polimixinas. Outro estudo, feito por Kim *et al.* (2014), mostrou que os sistemas *phoP/phoQ* e *pmrA/pmrB* são regulados positivamente em *K. pneumoniae* exposta a polimixinas, apontando que esse sistema está envolvido no mecanismo de resistência a este antimicrobiano. A ativação constitutiva do sistema *pmrAB* também pode ser causada por mutações missense em *pmrA* ou

pmrB, levando uma posterior regulação positiva de *pmrCAB* operon e *arnBCADTEF* operon, resultando na síntese e adição de PEtN e L-Ara4N, respectivamente, ao lipídio A. Outro mecanismo é a mutação/inativação do gene *mgrB* (Cannatelli *et al.*, 2013), que irá exercer feedback negativo no sistema *PhoPQ*, inibindo a quinase de *PhoQ* e/ou estimulando sua atividade de fosfatase, consequentemente suprimindo a fosforilação do *PhoP*, causando a repressão dos genes regulados pela proteína *PhoP* (LIPPA e GOULIAN, 2009). Essa inativação pode acontecer devido ao rompimento do gene *mgrB* em função de uma sequência de inserção que literalmente forma um produto truncado. (Figura 09). Esse mecanismo mediado por desregulação do gene *mgrB* está presente em até 54% dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas (DA SILVA, 2021).

Figura 09. Representação genética do regulador negativo do sistema de dois componentes (*PhoP/PhoQ*), *mgrB*.



Legenda: A- (i) *K. pneumoniae* com *mgrB* intacto (susceptível à colistina) e (ii) *K. pneumoniae* com *mgrB* truncado por uma sequência de inserção (resistente à colistina). (B) Alinhamento de *mgrB* não mutado de *K. pneumoniae* suscetível à colistina e *mgrB* mutado de uma cepa resistente à colistina com uma mutação missense e término prematuro de *mgrB*. Término prematuro (-).

Fonte: Extraído de OLAITAN; MORAND; ROLAIN (2014).

Estudos realizados com *Salmonella enterica* foram os primeiros a demonstrar o envolvimento de alterações no lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e diminuição da atividade das polimixinas (SARA *et al.*, 2018).

Quanto aos elementos genéticos móveis, destacam-se os genes *mcr* (*mobile colistin resistance*). Atualmente, um total de 10 variantes diferentes (ou seja, *mcr-1* a *mcr-10*) foram descritas (LING *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Inicialmente descrito na China em 2015,

durante um projeto de vigilância de rotina em *Escherichia coli* comensais de animais, descobriu-se que a cepa SPH45 deste isolado possuía a capacidade de transferir a resistência colistina para outras cepas. Isolada a partir de fezes de porcos, surgia assim, a descrição do primeiro mecanismo plasmidial de resistência às polimixinas mediada pelo gene *mcr-1* (LIU et al., 2016).

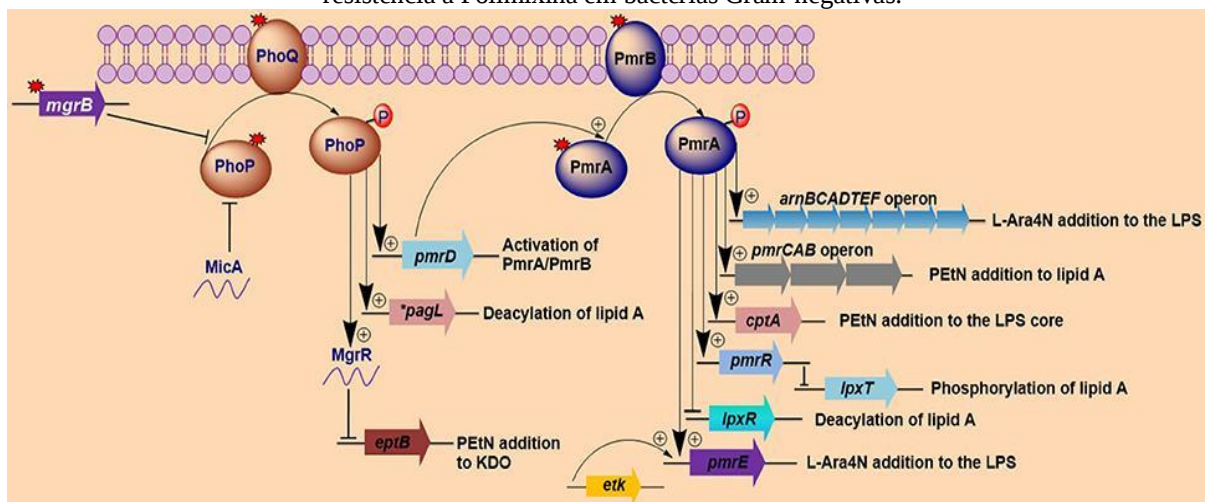
O *mcr* é um gene de resistência à colistina mobilizado através de plasmídeos. Ele codifica a enzima fosfatidiletanolamina transferase que transfere o resíduo de fosfatidiletanolamina para o lipídio A da membrana celular de bactérias Gram negativas, modificando o sítio de ação do lipídio A e consequentemente impossibilitando a ação da polimixina por não conseguir se ligar ao seu sítio de ação alvo (LIU et al., 2016). Após a identificação do *mcr-1*, ampla atenção científica levou ao reconhecimento de múltiplos *mcr-1* variantes e dez famílias de genes *mcr* adicionais. Esta última inclui: *mcr-2* em *E. coli* e *Salmonella spp.* de suínos, bovinos e frangos na Bélgica (SUN et al., 2017), *mcr-3* em *E. coli* humana e animal, *Proteus spp.* e *Aeromonas spp.* em países em Ásia, Europa e América do Sul (BELANEHE et al., 2018), *mcr-4* em sorovar *E. coli* e *Salmonella enterica Typhimurium* de suínos e humanos na Bélgica, Itália e Espanha (CARRETTO et al., 2018), *mcr-5* em aves e isolados de carne de aves de *S. enterica sorovar Paratyphi* (NGBEDE et al., 2020), *mcr-6* em *Moraxella sp.* isolados de porcos no Reino Unido, *mcr-7* em *K. pneumoniae* de galinhas na China, *mcr-8* em *K. pneumoniae* de humanos e porcos na China (LING et al., 2020), *mcr-9* em uma cepa de *Salmonella Typhimurium* isolada de um paciente humano no estado de Washington (EUA) e *mcr-10* em uma cepa clínica de *Enterobacter roggenkampii* isolado na China (GUAN et al., 2022). Vale ressaltar que a cepa de *S. Typhimurium* na qual o *mcr-9* foi originalmente detectado era fenotipicamente susceptível à colistina de acordo com EUCAST com um MIC de 2 µg/mL. A ocorrência de mais de um desses genes na mesma cepa foi relatada em *E. coli* e *Salmonella spp.* isolados de origem humana e animal na Europa e na China, como a presença simultânea de *mcr-1* e *mcr-3* e de *mcr-1* e *mcr-4* (BASTIDAS-CALDES, 2022).

O gene *mcr-2* compartilha a identidade de 76,7% com o gene *mcr-1*. Foi descrito em amostras de *Escherichia coli* resistentes a colistina originadas de amostras de suínos e bovinos que não continham o gene *mcr-1* em 2016 na Bélgica (XAVIER et al., 2016). Apesar de ocorrer em frequência menor do que o *mcr-1*, o gene *mcr-2* já foi encontrado em bactéria Gram-

negativas resistentes a colistina originadas de suínos e de alimentos (ABUOUN *et al.*, 2017; GARCIA-GRAELLS *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

O processo de ativação dos genes que têm a capacidade de modificar a estrutura do LPS, resultando na inativação do sítio de ação das Polimixinas, tem como princípio tanto o *mgrB* quanto o *MicA* (em *E. Coli*) que irão exercer feedback negativo no sistema regulatório *phoPQ*. As mutações em *mgrB* ou *phoP/phoQ* geralmente levam à indução constitutiva do sistema *phoPQ*. A ativação do sistema *phoPQ* ativa *pagL* (que desacula o lipídio A em *Salmonella*) e *pmrD* (que ativa *pmrA*) e reprime *eptB* através da ativação de *MgrR*, impedindo a modificação do ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulossônico (KDO) com fosfoetanolamina (PEtN). Além disso, o sistema regulador *phoPQ* pode ativar diretamente o operon *arnBCADTEF* em algumas bactérias, como *Klebsiella pneumoniae*. O sistema *pmrAB* é ativado via *pmrD* ou por mutações nos genes *pmrA/pmrb*. Uma vez induzido, o *pmrA* fosforilado ativa os genes *arnBCADTEF* e *pmrE*, que modificam coletivamente os LPSs com 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N). O lipídio A e o núcleo LPS são posteriormente modificados com PEtN pelo *pmrCAB* operon e *cptA*, respectivamente. Outros genes ativados por *pmrA* são *pmrR*, que reprime *lpxT* (que fosforila o lipídeo A) após ativação e o gene *lpxR* (que desacula o lipídeo A). Por fim, *etK* pode adicionalmente fosforilar o gene *pmrE* (OLAITAN, 2014), esse processo está ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Representação esquemática da ativação de genes modificadores de lipopolissacarídeos envolvidos na resistência à Polimixina em bactérias Gram-negativas.



Legenda: Ação do *mgrB* e do *MicA* no sistema regulatório *phoPQ*. A ativação do sistema *phoPQ* desencadeia uma série de ativações em *pagL*, *pmrD*, *pmrA* e *eptB* com envolvimento da *MgrR*. Além disso, o sistema regulador *phoPQ* pode ativar diretamente o operon *arnBCADTEF*. O sistema *pmrAB* é ativado via *pmrD* ou por mutações

nos genes *pmrA/pmrB*. O *pmrA* fosforilado ativa os genes *arnBCADTEF* e *pmrE*. O lipídio A e o núcleo LPS são posteriormente modificados com PEtN pelo *pmrCAB* operon e *cptA*, respectivamente. O *pmrR* reprime *lpxT* após ativação e também o gene *lpxR*. Por fim, *etK* pode fosforilar o gene *pmrE*. Os símbolos de estrela vermelha representam as mutações.

Fonte: Extraído de OLAITAN (2014)

As polimixinas são consideradas, em muitos casos, como a última linha de tratamento em relação aos isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase. O surgimento e a disseminação de patógenos com resistência a essas duas importantes classes de antimicrobianos continuam a ameaçar a capacidade de tratamento e colocam constantemente em debate se a ciência, de fato, encontra-se diante do fim da era de ouro dos antimicrobianos (BARTOLLETTI *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2023; GOMES *et al.*, 2023). Com a disseminação rápida e global de isolados Pan resistentes (também conhecidos como “*Superbugs*”), a incidência de infecções não tratáveis tem se tornado cada vez maior. Nesse sentido, o monitoramento epidemiológico representa uma importante ferramenta para que medidas de controle sejam adotadas e a disseminação desses isolados seja evitada (SIMS e KASPRZYK-HORDERN, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana às polimixinas em isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemase proveniente de amostra clínica de paciente assistido em um hospital terciário de Recife-PE.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana do isolado de *Klebsiella pneumoniae* selecionado para este estudo aos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica;
- b) Identificar as principais enzimas relacionadas ao fenótipo de resistência do isolado de *Klebsiella pneumoniae* selecionado;
- c) Avaliar a presença dos principais genes codificadores de carbapenemase no isolado selecionado;
- d) Avaliar a capacidade de transferência interespecífica dos mecanismos de resistência à polimixina presentes no isolado de *K. pneumoniae* selecionado.

4 METODOLOGIA

4.1 Isolado clínico

O isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* foi obtido a partir de amostra de urocultura de paciente assistido em um hospital terciário de Recife-PE em Janeiro de 2023.

A identificação das espécies bacterianas e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana foram primariamente determinados no laboratório de Microbiologia Clínica do próprio hospital, através de provas bioquímicas fenotípicas de rotina e por meio de metodologia automatizada, Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France).

O isolado clínico foi coletado da rotina do laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital e armazenado em meio LB suplementado com 15% de glicerol à temperatura de 80 °C negativos no Departamento de Microbiologia do IAM/FIOCRUZ. As subculturas foram posteriormente realizadas em meio de cultura LB (Luria-Bertani) e/ou Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas para seguimento das etapas subsequentes deste estudo.

4.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) para a polimixina B e meropenem foi avaliada por microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Para isto, o inóculo bacteriano foi preparado pela técnica de suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo ágar Müeller-Hinton (Himedia) em 1 mL de CA-MHB estéril até uma densidade OD 625nm de 0,08 – 0,13 UA, determinada em espectrofotômetro UV 1101 Biotech Photometer (WPA), correspondente a 0,5 da escala de McFarland ou $1-5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa suspensão foi subsequentemente diluída 1:1000 em CA-MHB em volume

suficiente para inoculação dos poços da placa 50 de microdiluição. Um volume de 50 µL desta última diluição foi inoculado simultaneamente com o auxílio de pipetador automático multicanal em cada poço da placa previamente confeccionada, de modo que, ao final dessa etapa, cada poço contivesse um volume final de 100 µL, contendo a concentração final desejada para cada antimicrobiano e uma densidade celular bacteriana de cerca de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. Para avaliar a possibilidade de interferência do plástico no resultado do ensaio de microdiluição em caldo, o experimento foi realizado em placa de 96 poços de Poliestireno não tratada (placa hidrofóbica) e tratada (placa hidrofílica). Os resultados foram posteriormente comparados.

Como controle positivo do crescimento bacteriano foram inoculados poços contendo CA-MHB livre de antimicrobianos e, como controle negativo de crescimento foram reservados poços contendo apenas CA-MHB, sem inoculação.

Após inoculação, as placas de microdiluição foram incubadas por 18-24 horas, a 35 ± 2 °C e após esse período, inspecionadas visualmente após adição de resazurina para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é considerada a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A resistência à colistina também foi avaliada por Drop Test e Polimixina NP. No primeiro teste, cerca de 10 µL de Colistina (16 µg/mL) foram adicionados ao meio ágar Muller Hinton previamente inoculado com o isolado clínico selecionado para este estudo (ajustado a uma densidade de 0,5 na escala nefelométrica de McFarland). A placa permaneceu em repouso a temperatura ambiente para secagem da gota de antibiótico. Em seguida, o experimento foi incubado a 37°C por 24h. No dia seguinte, procedeu-se com a leitura visual para verificar a formação ou não de zona de clareamento (sensibilidade).

O teste de Polimixina NP foi conduzido conforme protocolo estabelecido por Nordmann, Jayol e Poirel (2016). O isolado de *K.pneumoniae* foi ajustado em uma placa de 96 poços (poliestireno) a uma concentração de 10^8 CFU/mL em uma solução contendo glicose anidra a 1%, 0,005% de vermelho de fenol e 3,75 µg/mL de colistina. O volume final de reação foi de 150 µL. O experimento foi incubado por duas 2h a 37°C. Após esse período, a placa de 96 poços foi analisada para verificar a produção de ácido (coloração amarelada) pelo isolado avaliado (critério de resistência).

Os testes de sensibilidade a ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, meropenem, amikacina, gentamicina, ertapenem, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol foram determinados por metodologia automatizada em Vitek® 2 Compact (bioMérieux), seguindo o fluxo de rotina do laboratório de Microbiologia Clínica do hospital, utilizando-se os painéis de ID/AST.

4.3 Teste fenotípico de detecção enzimática das principais carbapenemases de interesse clínico

O teste fenotípico de detecção enzimática foi realizado a partir da utilização do NG - Test CARBA 5 (Laborclin), ao qual são imobilizados anticorpos monoclonais de ratos dirigidos contra KPC (K), OXA (O), VIM (V), IMP (I), e NDM (N) em zonas de teste de membrana de nitrocelulose designadas por K, O, V, I, e N.

O ensaio foi realizado a partir da aplicação de uma suspensão do inóculo do isolado-teste no poço do cassete. A amostra migra através do bloco conjugado e caso estejam presentes, as carbapenemases reagem com os anticorpos monoclonais anti-carbapenemases marcados. O complexo migra através da membrana de nitrocelulose via capilaridade e interage com os anticorpos monoclonais anti-carbapenemases correspondentes, imobilizados na membrana. A linha de controle C, é formada por estreptavidina marcada e anticorpos monoclonais que reagem com biotina-BSA e anticorpos policlonais de cabra e anti-rato, imobilizados na membrana. Caso a amostra seja positiva para uma ou para várias carbapenemases, irá aparecer uma linha vermelha na(s) zona(s) de teste e na zona controle da membrana. Caso contrário, apenas irá aparecer uma linha vermelha na zona do controle.

4.4 Detecção dos principais determinantes genéticos de resistência aos carbapenêmicos

Os testes para detecção dos principais genes de resistência aos carbapenêmicos foram realizados com o intuito de confirmar os testes fenotípicos de detecção enzimática das

principais carbapenemases de interesse clínico, bem como para avaliar a possível presença de genes que codificam demais betalactamases de interesse clínico não contempladas no teste fenotípico.

Para isto, a extração de DNA total deste isolado foi realizada através de kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), por procedimento realizado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado através do equipamento NanoDrop 2000C e estocado a -20°C, sendo posteriormente diluído para concentração de uso.

A pesquisa dos principais determinantes genéticos de resistência foi realizada por PCR, em reações individuais com volume final de 25 µL, contendo tampão para PCR Multiplex (Invitrogen, Mariland, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, Mariland, EUA), 1U *Platinum* Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Mariland, EUA), 2,5 mM de dNTP's (Invitrogen, Mariland, EUA), além das sequências iniciadoras dos genes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-F (5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3') e KPC-R (5'-TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC-3'); *New Delhi* metalobetalactamase NDM-F (5'-CTGAGCACCGCATTAGCC-3') e NDM-R (5'-GGGCCGTATGAGTGATTGC-3'); Brazilian *Klebsiella* carbapenemase BKC-F (5'-ACATAATCTCGCAACGGGCG-3') e BKC-R (5'-TCGCCGGTCTTGTTTCATCAC-3'); Imipenemase IMP-F (5'-GAATAGAATGGTAACTCTC-3') e IMP-R (5'-CCAAACCACTAGGTTATC-3'); São Paulo metalobetalactamase SPM-F (5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3') e SPM-R (5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'); e Verona imipenemase VIM-F (5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3') e VIM-R (5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'), a 10 mM cada.

As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems, Perkin Elmer, EUA) iniciando a partir de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de ciclos de 45 segundos a 94°C por 30 segundos, a 51°C por 2 minutos, e a 72°C por 90 segundos, repetidos 30 vezes, e finalizando por um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os possíveis produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, por 45 minutos a 120V e posteriormente visualizados sob luz UV em transiluminador.

Os *amplicons* visualizados em gel de agarose foram então excisados com o auxílio de um bisturi estéril e purificados utilizando o *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, sendo posteriormente submetidos ao sequenciamento de DNA por metodologia de Sanger. As sequências de nucleotídeos foram visualizadas e tratadas utilizando o *software* Chromas (Technelysium Pty Ltd) e alinhados com sequências disponíveis no NCBI utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), sendo visualizadas pelo BioEdit 7.2 (Informer Technologies, Inc.).

4.5 Avaliação da capacidade de transferência interespecífica dos mecanismos de resistência às polimixinas

A avaliação da capacidade de transferência dos genes de resistência foi realizada com o intuito de determinar se o microrganismo era detentor de mecanismos móveis de resistência. Com este intuito, o DNA plasmidial da *K. pneumoniae* foi preparado da seguinte maneira: foi centrifugado a 2400 RPM por 5 min a cultura de 2 ml overnight do isolado de *K. pneumoniae*, em seguida ressuspendido o sedimento em 200 µL da solução de 4 g/ml de lisozima Lizosima (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 - 4°C). Foi adicionado 400 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 M, 1% (p/v) SDS. Solução de estoque de 2 M NaOH e 10% (p/v) SDS e misturado 4-6x. Após isso, foi adicionado 200 µL de uma solução de NH₄-Ac (100 ml de acetato de amônio 8 M), misturado e incubado no gelo por 5 min sem agitar. Em seguida, centrifugado a 10400 RPM por 5 min e transferido o sobrenadante em novos tubos eppendorf. Logo após, é adicionado 0,6 ml de isopropanol para 1 ml de sobrenadante, misturado de 4-6X e mantido em temperatura ambiente por 10 min. Novamente centrifugado a 10400 RPM por 5 min e descartado o sobrenadante. O DNA plasmidial foi precipitado no eppendorf. Posteriormente, foi lavado o eppendorf com 400µL de etanol 70% e centrifugar a 10400 RPM por 3 min. Foi removido o sobrenadante e deixado o eppendorf secar para se livrar do etanol residual por 30 min. Por fim, foi ressuspendido o sedimento em 40µL de água MilliQ destilada estéril. A suspensão pode ser mantida a -20 C para uso posterior.

Para a preparação da *Escherichia coli* foi feita da seguinte maneira: Inoculado 1mL de LB com *E. coli*, colocado na incubadora de agitação a 37 ° C e 200 rpm e incubado por 12-16

horas. Em seguida, foi preparado a diluição desta cultura em LB(1:100, sem antibiótico), agitado e incubado a 37°C e 200 rpm por 3-4 horas ou até que a OD atinja 0,4. As culturas foram separadas em vários tubos Oakridge e colocadas no gelo por 20 minutos, em seguida foram centrifugadas a 4°C a 4000 rpm por 10 minutos. Foi descartado o sobrenadante e posteriormente ressuscitado com cloreto de cálcio 0,1M, a fim de neutralizar a repulsão eletrostática entre o DNA plasmidial e a membrana celular da bactéria, e incubado no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 4°C a 4000 rpm por 10 minutos, descartado o sobrenadante e combinado os pellets para ressuspender em cloreto de cálcio 0,1M. Foi utilizado glicerol 15% e armazenado em -80°C no congelador.

Com a finalidade de induzir a formação de poros na membrana plasmática da bactéria, foi aplicado um choque térmico, descongelando as células competentes no gelo, adicionando 1-5µl de plasmídeo para alíquota de célula de 50µL e incubar no gelo por 30 minutos. O choque térmico foi feito colocando em banho-maria a 42°C por exatamente 30 segundos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB ou SOC pré-aquecido e incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi agitado e incubado 37°C, a 200 rpm, por 1 hora para crescimento. Para finalizar, espalhe-se na placa as diluições 1:10 e 1:100 das culturas de crescimento em seletiva quente e/ou placas de triagem e incubados a 37°C por 12-16 horas.

4.6 Considerações éticas

O presente estudo está vinculado ao Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos em andamento com a participação do Departamento de Microbiologia do IAM/Fiocruz-PE e do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas (SCIH/HC/UFPE) para o estudo da epidemiologia local da resistência bacteriana entre amostras de espécies de importância clínica. Essa proposta foi apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM, com o título “Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos” sendo sua execução aprovada (número CAAE 45080915.0.0000.5190; parecer número: 1.190.837) (Anexo A).

A amostra foi coletada pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (Anexo B), não ocorrendo, durante a execução do presente estudo, contato dos participantes da pesquisa com o paciente, mesmo assim, foram respeitados todos os preceitos éticos determinados pela Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde.

5 RESULTADOS

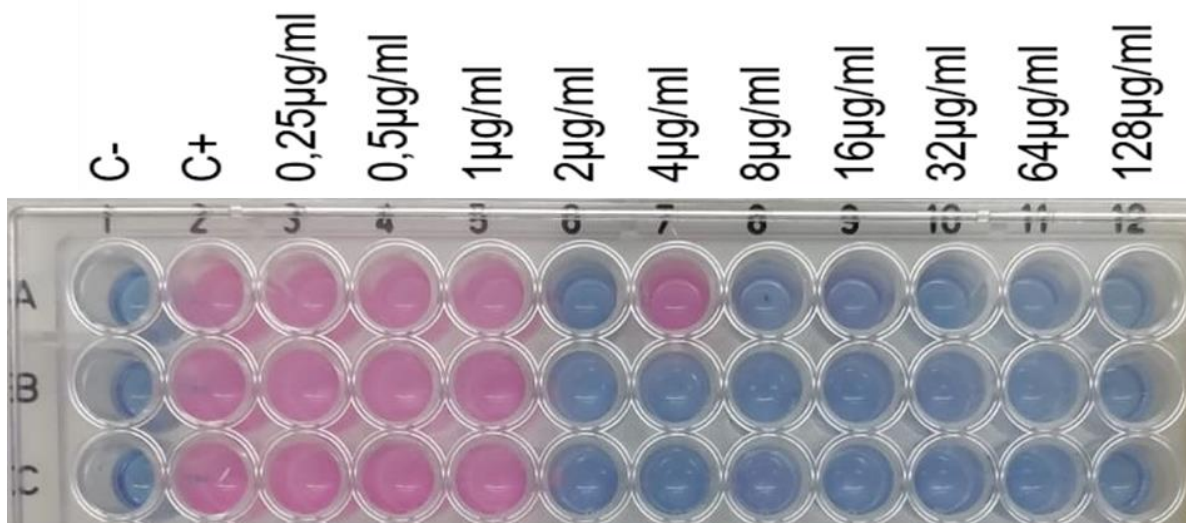
5.1 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana do isolado de *Klebsiella pneumoniae*

A avaliação do perfil de sensibilidade do isolado de *K. pneumoniae* deste estudo demonstrou elevada resistência à ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, meropenem, amicacina, gentamicina, ertapenem, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, conforme evidenciado na Tabela 1.

Na análise dos três testes fenotípicos para determinação de resistência às polimixinas, foi possível observar que todos foram capazes de detectar a resistência do isolado. No teste de microdiluição, o isolado apresentou resistência em com MIC variável entre 2 e 8 µg/mL, indicando resistência não-reprodutível de baixo nível, uma vez que esta variou entre faixas de sensibilidade (2) e resistência (8) à droga. Os ensaios realizados em placas tratadas (placas hidrofílicas) e não tratadas (hidrofóbicas) apresentaram os mesmos resultados, indicando que não houve interferência de uma possível interação entre o antibiótico e o plástico da placa utilizada nos ensaios.

É importante salientar que o teste também evidenciou padrões de *skipped wells*, ou seja, poços que não apresentam crescimento, enquanto que em poços com concentrações mais altas de antimicrobianos, o crescimento é observado (Figura 11, A5 e A7), caracterizando heterorresistência às polimixinas.

Figura 11. Teste de microdiluição em caldo realizado com diferentes concentrações de polimixina B.

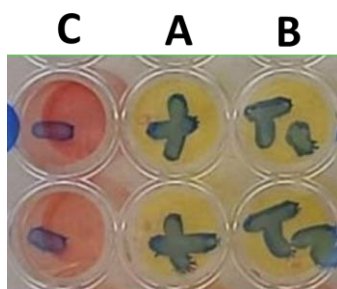


Legenda: Em azul, pode-se observar os poços sem crescimento bacteriano, indicando provável susceptibilidade à

Polimixina e, em rosa, os poços nos quais houve crescimento bacteriano, indicando provável resistência ao antimicrobiano testado.

Fonte: O autor.

Figura 12: Representação do resultado do teste rápido Polimixina NP.



Legenda: Em (C) - Controle negativo de crescimento (sem inóculo bacteriano. Em (A)- Controle positivo (inóculo bacteriano sem polimixina B). Em (B)- Teste de sensibilidade (inóculo bacteriano com Polimixina B). A acidificação em B indica que o isolado é resistente às polimixinas.

Fonte: O autor.

Tabela 1: Teste fenotípico de resistência aos antimicrobianos

	Concentração inibitória mínima (µg/mL)											
	APS	PIP	CRO	CTZ	FEP	MER	AMI	GEN	ERT	AZT	CIP	TRI
<i>K. pneumoniae</i>	≥32	≥128	≥64	≥64	≥64	≥32	≥32	≥16	≥1	≥64	≥4	≥32

Legenda: APS - ampicilina-sulbactam, PIP - piperacilina-tazobactam, CRO - ceftriaxona, CTZ - ceftazidima, FEP - cefepime, MER - meropenem, AMI - ampicilina, GEN - gentamicina, ERT - ertapenem, CIP - ciprofloxacina e TRI - trimetoprim-sulfametoxazol.

Fonte: O autor.

5.2 Identificação das principais enzimas relacionadas ao fenótipo de resistência

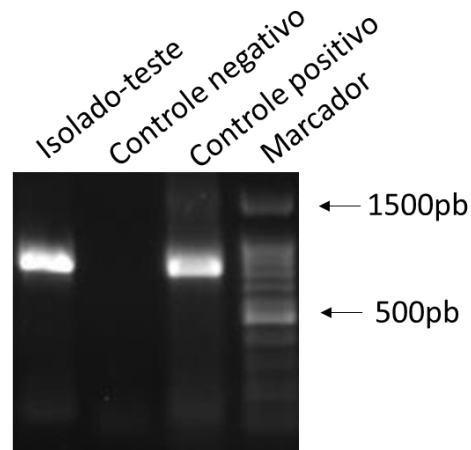
O NG - Test CARBA 5 evidenciou a produção da enzima KPC pelo isolado testado, apresentando resultado negativo para as demais enzimas investigadas, incluindo OXA (O), VIM (V), IMP (I) e NDM (N).

5.3 Detecção dos principais genes codificadores de carbapenemase

Dentre os genes de resistência pesquisados no isolado desse estudo, foi detectado apenas o gene blaKPC. Os demais genes para carbapenemases, incluindo os de metalo-betalactamase pesquisados, não foram encontrados pela técnica utilizada (Figura 13).

A análise do sequenciamento por metodologia de Sanger e alinhamento contra as sequências depositadas no NCBI revelou a presença da variante enzimática KPC-2 (Figura 14).

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose do produto obtido após PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores KPC-F e KPC-R.



Fonte: O autor.

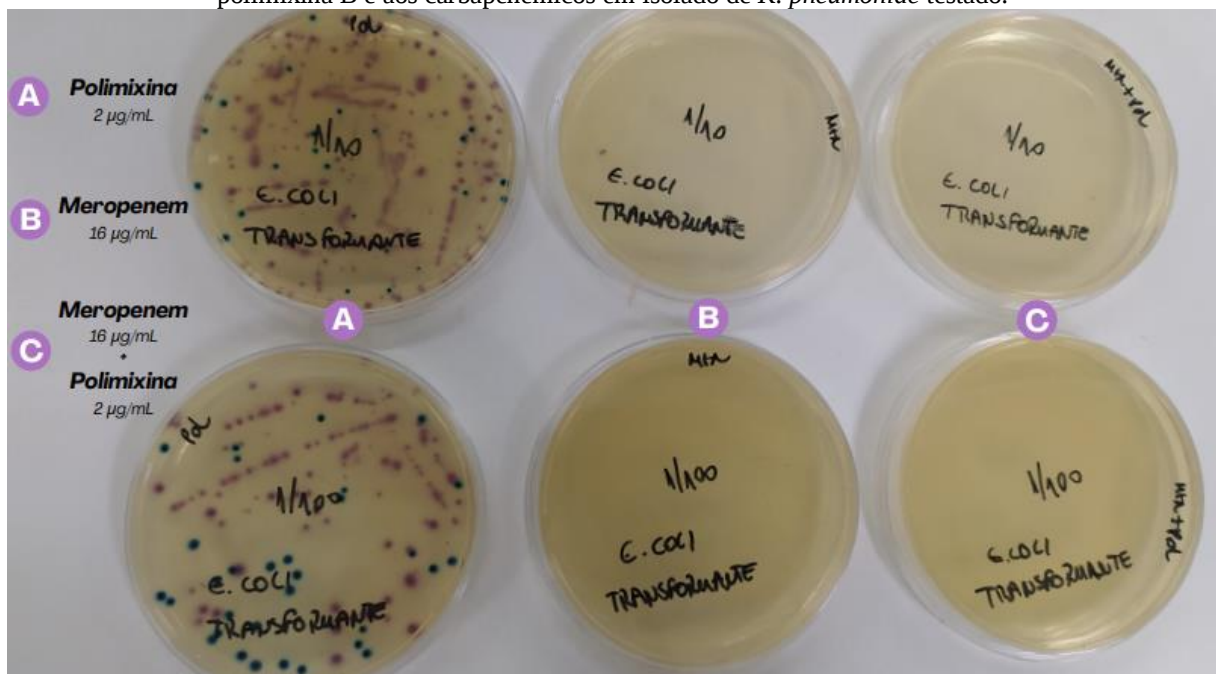
Figura 14: A - Eletroferograma gerado após sequenciamento de Sanger. Visualização pelo *software* Chromas. B - Alinhamento da sequência de nucleotídeos obtidos após sequenciamento por metodologia de Sanger com sequência de KPC-2. Visualização pelo *software* BioEdit.



5.4 Avaliação da capacidade de transferência interespecífica dos mecanismos de resistência à polimixina

Para avaliação de possíveis genes móveis do isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente à Polimixina, foi utilizada uma *E. coli* suscetível às polimixinas como o receptor apto. Após realização dos ensaios de transferência, foi visto que a *E. coli* receptora foi capaz de se desenvolver em meio embebido de polimixina B, caracterizando uma transferência bem sucedida dos genes de resistência provenientes da *K. pneumoniae*.

Figura 15: Ensaio de transferência para detecção da presença de elementos móveis relacionados à resistência à polimixina B e aos carbapenêmicos em isolado de *K. pneumoniae* testado.



Legenda: **A** - Placas de Chromagar contendo 2 µg/mL de polimixina B. **B** - Placas de Chromagar contendo 16 µg/mL de meropenem. **C** - Placas de Chromagar contendo a combinação de ambos os antimicrobianos indicados.

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Desde 2017 que a Organização Mundial da Saúde tem destacado as Enterobacterales produtoras de carbapenemase como prioridade I na investigação e desenvolvimento de novos antibióticos. Neste cenário, a utilização de polimixinas aumentou consideravelmente. Como consequência, resistências aos carbapenêmicos e polimixinas têm sido amplamente encontradas em diversos hospitais brasileiros (AIRES *et al*, 2017; COSTA-JÚNIOR *et al*, 2023).

Considerando a importância precoce desse preocupante perfil de resistência antimicrobiana e a dificuldade de realização do método de microdiluição em caldo, ainda bastante inacessível para a maioria dos laboratórios de microbiologia no Brasil, os métodos fenotípicos utilizados neste trabalho, apresentam-se como importantes alternativas para rastreio de resistência às polimixinas. Entretanto, variações consideráveis de sensibilidade e especificidade podem apresentar graves índices de erros frente à complexa regulação gênica encontrada em isolados clínicos de rotina.

Apesar dos métodos fenotípicos de análises da resistência antimicrobiana realizados neste estudo serem menos trabalhosos, baratos e rápidos e terem sido capazes de apontar resistência do isolado, eles se limitaram apenas a mostrar a sensibilidade ou resistência ao antimicrobiano. Diversos estudos relataram resultados satisfatórios em relação ao teste rápido Polimixina NP quando avaliados categoricamente em relação ao padrão ouro (teste de microdiluição em caldo), mostrando que pode ser um método de utilização na rotina do laboratório pois apresenta altas taxas de sensibilidade e especificidade em diversos cenários, como descrito SHOAIB e colegas (2020) que relataram 97,2% e 100% respectivamente, com isolados de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos e também por CONCEIÇÃO-NETO e colegas (2020) que relataram 90% e 94% respectivamente, em isolados de *Klebsiella* com baixos níveis de resistência. Após comparação com os resultados citados e também com o de YAINOY e colegas (2018) (100% e 95,9 %), a diminuição nos parâmetros avaliativos do teste (sensibilidade e especificidade) em isolados com baixos níveis de resistência, entrando em concordância com os resultados encontrados com o deste estudo, algo que pode resultar em uma falha na interpretação dos resultados que se mostram inconclusivos e duvidosos nestes casos. Esse cenário representa mais um desafio quando se trata de avaliar o perfil de sensibilidade às polimixinas.

Assim como o teste rápido Polimixina NP, a microdiluição em caldo também pode

apresentar variações em função dos baixos níveis de expressão de resistência do isolado. Conforme os resultados observados neste estudo, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para polimixina não foi reprodutível devido à presença de *skipped wells*, provavelmente causado pela heterorresistência do isolado, podendo confundir a interpretação e por conseguinte o diagnóstico após os resultados. Estudos anteriores também detectaram isolados heterorresistentes às polimixinas em *K. pneumoniae* com presença de *skipped wells* em ensaios de microdiluição em caldo, cujos resultados variaram entre 1 e 8 µg/mL (BARDET *et al.*, 2017; HALABY *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2022; CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2020; NORDMANN e POIREL, 2017). Estudos similares revelaram que os índices de resultados falso-susceptíveis às polimixinas a partir dos testes de microdiluição em caldo podem chegar a 32,5% em infecções invasivas. Índice bem acima dos valores aceitos pela FDA (RANJAN *et al.*, 2023). Já o trabalho realizado por Zhang *et al* demonstrou que a margem de erro em isolados PR-CRKP pode chegar a 61,6% em isolados portadores do gene *mcr-8* de resistência às Polimixinas (QI ZHANG *et al.*, 2023). Essas discrepâncias apresentam-se como um importante desafio, pois apontam a necessidade de novas ferramentas para verificar a confiabilidade dos testes empregados no diagnóstico microbiológico de rotina.

Convém destacar que o fenômeno de *skipped wells* pode acontecer devido a adesão da polimixina ao plástico (SHAFARI e ARDEBILI., 2019). Neste sentido, o presente estudo realizou o ensaio de microdiluição em caldo em placa tratada (hidrofílica) e em placa não tratada (hidrofóbica) para analisar esse tipo de interferência. Nas duas condições, houve presença de *skipped wells* com resultado indicando heterorresistência às polimixinas entre 2 e 8 µg/mL, demonstrando assim, que não houve interferência do material plástico utilizado. A placa tratada é constituída de Poliestireno modificado quimicamente para adquirir polaridade (caráter hidrofílico). A placa não tratada, por sua vez, é formada por Poliestireno de caráter hidrofóbico. As polimixinas são moléculas altamente hidrofóbicas, podendo ligar-se ao material plástico das placas não tratadas e produzirem falso resultados de sensibilidade (SHAFARI e ARDEBILI., 2019).

As técnicas de Colispor e Drop Test revelaram resultados indicando resistência às polimixinas do isolado selecionado para este estudo. Apesar de apresentarem variações importantes de sensibilidade e especificidade superiores e taxa de erros muito graves de 2,1%, acima do valor aceitável pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (1,5%), são indicadas pela ANVISA como métodos de triagem para detecção de fenótipos de resistência às polimixinas,

devendo suas análises serem combinadas com ensaios de microdiluição em caldo (ANVISA, 2020).

A caracterização do perfil de resistência às polimixinas da *K. pneumoniae* investigada ficou evidenciada pelo ensaio de transferência interespecífica. Ao adquirir resistência às polimixinas a partir da transfecção dos plasmídeos extraídos do isolado clínico, a *Escherichia coli* transformante evidenciou que o fenótipo de resistência, não detectado de maneira conclusiva pela microdiluição em caldo, está presente no isolado doador (cepa clínica) e é móvel. Estudos realizados na China ao avaliarem seis isolados portadores de elementos móveis de resistência às polimixinas (gene *mcr-1*) por sequenciamento de DNA de nova geração (NGS), observaram que mutações na região promotora do gene poderiam estar associadas a baixos níveis de expressão do fenótipo de resistência, resultando em CIMs entre 4 e 8 µg/mL (HUANG et al., 2018).

Aproximadamente 80% dos isolados de *K.pneumoniae* resistentes às polimixinas são produtores de carbapenemases. A principal causa do aumento dos níveis de resistência às polimixinas nos últimos anos pode ser creditada ao fato da adoção deste antimicrobiano como primeira linha de tratamento de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2022)

As taxas de incidência desses isolados PR-CRKP no Brasil acompanham a tendência global, crescendo a cada ano (BARTOLLETTI et al., 2016), principalmente associados à carbapenemase KPC-2, uma vez que esta é endêmica no país, reforçando a necessidade da criação de novos perfis de isolados críticos e monitoramento desses perfis em culturas de vigilância. Em concordância com achados deste estudo, Pereira e colaboradores (2013) identificou uma frequência de 15% de isolados *K.pneumoniae* produtora de KPC-2 e simultaneamente resistentes à polimixina B. Conceição-Neto e colaboradores (2022) detectou em 2016 uma frequência de 29,5% de PR-CRKP. Inicialmente avaliada a partir da utilização de teste imunocromatográfico (Test CARBA 5), a produção de carbapenemase foi efetivamente confirmada a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posterior sequenciamento de DNA. Os testes rápidos representam uma ótima ferramenta auxiliar para determinar mecanismos de resistência. Entretanto, não substituem efetivamente os testes fenotípicos de rotina, uma vez que, os testes rápidos, apesar de apresentarem elevada sensibilidade, possuem baixa especificidade. Na prática clínica, essas ferramentas conseguem avaliar somente as carbapenemases para as quais foi desenvolvido, não permitindo descartar a

ausência dessas enzimas nos isolados que foram avaliados inicialmente como negativos.

Neste contexto, a detecção de resistência à Polimixina em MICs baixas se mostra de grande importância, pois a disseminação da resistência por mecanismos móveis, principalmente plasmídeos, como o gene *mcr*, tem sido associada a bactérias que exibem baixos níveis de resistência e sua incidência tem sido amplamente relatada na literatura (EIAMPHUNGORN *et al.*, 2018; CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018). A incidência de *K. pneumoniae* com resistência simultânea às polimixinas e carbapenêmicos (CANNATELLI *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015) dificultam ainda mais as perspectivas de sucesso terapêutico, tendo em vista a falta de antimicrobianos eficazes.

Todo esse cenário resulta em altas taxas de mortalidade que estão cada vez mais crescentes, além de causarem impactos econômicos graças a utilização de medicamentos mais caros, e por vezes mais tóxicos (CORREA, 2022), devido à taxa de resistência alta aos antimicrobianos de primeira linha. Aliado a isso, a falta de dados a respeito das taxas de mortalidade, tempo de internamento, infraestrutura dos sistemas de saúde mascaram ainda mais um problema que necessita ser exposto e tratado com a relevância que tem.

Os métodos moleculares surgem então como uma necessidade cada vez mais imperiosa para investigação de vigilância de resistência, uma vez que permitem identificar e caracterizar os mecanismos de resistência com baixo nível de expressão e, por conseguinte, avaliar o grau de confiança e capacidade discriminatória dos testes empregados no diagnóstico microbiológico de rotina. Dessa maneira, a opção pela antibioticoterapia mais assertiva torna-se possível, evitando assim, falhas terapêuticas significativas onde o cenário já apresenta escassez de opções medicamentosas (BARTOLLETTI *et al.*, 2016).

7 CONCLUSÃO

O estudo mostrou que os testes fenotípicos utilizados apresentaram dificuldade de detectar resistência em níveis baixos, entrando em concordância com os relatos descritos na literatura. Eles se mostraram imprecisos, mostrando resultados irreprodutíveis e que não condizem com os achados quando eram comparados. A detecção do gene móvel de resistência obtido pelo ensaio de transferência garantiu que o gene de resistência estava presente no isolado, aumentando a necessidade da identificação genética para identificá-lo com mais precisão. A dúvida de como proceder, sem o auxílio de métodos precisos, em situações semelhantes a essa é um dos obstáculos enfrentados na prática clínica diária, evidenciando a clara necessidade de mais meios para enriquecer o arsenal de diagnósticos e combater as infecções causadas por MDR. Tanto pela ausência de novos antibióticos eficazes para diminuir a pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado das poucas opções restantes, quanto para maximizar a eficácia dos utilizados atualmente e até substituir os ineficazes. A fim de evitar um panorama ainda mais assustador, é notória a necessidade de estudos dos elementos genéticos juntamente com o engajamento em prol da comunidade hospitalar, tendo em vista a falta de recursos na rotina diária dos profissionais da saúde. Aliado a isso, o incentivo a estes profissionais, com treinamentos e informações a respeito da prevenção de IRAS também se mostra necessário, por ter como finalidade o enfrentamento do problema na raiz dele.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ASSY, Rawan Samy et al. Carbapenem Resistance Mechanisms, Carbapenemase Genes Dissemination, and Laboratory Detection Methods: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v. 12, n. 1, 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2020
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025.– Brasília. p.5-8. 2021
- AHMAD, Nayeem; JOJI, Ronni Mol; SHAHID, Mohammad. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.
- AIRES, Caio Augusto Martins et al. Emergence of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 392 in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00317-17, 2017.
- ALBUR, Mahableshwar et al. Colistin susceptibility testing: time for a review. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 5, p. 1432-1434, 2014.
- ANTONIADOU, Anastasia et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 786-790, 2007.
- ARMSTRONG, Tom; FENN, Samuel Jacob; HARDIE, Kim R. JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. **Journal of medical microbiology**, v. 70, n. 12, 2021.

ASTOLFO, Susi; KEHRIG, Ruth Terezinha; OLIVEIRA, Lúgia Regina de. Disponibilidade de recursos dos serviços ambulatoriais do Sistema Único de Saúde destinados a pessoas vivendo com HIV em Mato Grosso, 2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, 2018.

BARIN, Juliana et al. Hetero-and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, p. 1-5, 2013.

BARTOLLETI, Flávia et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849, 2016.

BASTIDAS-CALDES, Carlos et al. Worldwide Prevalence of mcr-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock—A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 659, 2022.

BATIKKH, H. et al. Clonal Spread of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and VIM Carbapenemases in Neonates at a Tunisian University Hospital. **Microbiology Drug Resistance**. V.23, n. 4, p. 468-472. Nov.2017.

BAŞARAN, Sena Nur; ÖKSÜZ, Lütfiye. The role of efflux pumps in antibiotic resistance of gram negative rods. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 5, p. 1-12, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 2.616 de 12 de maio de 1998. Brasília, 1998.

Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html>. Acesso em:

Acesso em: 03 de março de 2023.

BRASIL. Resolução 466/2012/CNS/MS/CONEP. Diário Oficial da União, Brasília, v. 12, p. 59, 2012.

BRYANT, Clare E. et al. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 8-14, 2010.

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

CANNATELLI, Antonio et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5696-5703, 2014.

CARRETTO, Edoardo et al. Detection of mcr-4 positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 2, p. 17-00821, 2018.

CASELLAS, Jose Maria; BLANCO, Manuel Guzman; PINTO, Maria Eugenia. The sleeping giant: antimicrobial resistance. **Infectious disease clinics of North America**, v. 8, n. 1, p. 29-45, 1994.

CATRY, Boudewijn et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. **International journal of antimicrobial agents**, v. 46, n. 3, p. 297-306, 2015.

CDC. Central Line-Associated Bloodstream Infections. 2022. <https://arpsp.cdc.gov/profile/nhsn/clabsi>.

CHANG, De et al. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. **Frontiers in Microbiology**, p. 3955, 2021.

CHENG, Qipeng et al. Unveiling the evolution routes of TEM-type extended-spectrum β -lactamases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, p. 106498, 2022.

CHEVALIER, Jacqueline et al. Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 274, n. 2, p. 496-499, 2000.

CHEW, K. L. et al. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. **J. Clin. Microbiol.** 2017, 55, 2609–2616.

CHUNG, Pooi Yin. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 20, p. fnw219, 2016.

COELHO, Vivian Caso. **Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de isolados de *Nocardia* spp. por microdiluição em caldo com o uso de resazurina e espectrofotometria.** 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C. et al. Difficulty in detecting low levels of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates: evaluation of Rapid Polymyxin NP test, Colispot Test and SuperPolymyxin medium. **New Microbes and New Infections**, v. 36, p. 100722, 2020.

CONCEIÇÃO-NETO, Orlando C. et al. Polymyxin resistance in clinical isolates of *K. pneumoniae* in Brazil: Update on molecular mechanisms, clonal dissemination and relationship with KPC-producing strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 1012, 2022.

CORREIA, Juliana Silva et al. Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 56, 2022.

COSTA, G. dos S., BORGES, D. C. S., PEREIRA, W. A. PLASMÍDEOS: definições, estudos atuais e sua influência na resistência bacteriana. **Scientia Generalis**, [S. l.], v. 1, n. S1, p. 4–4, 2020.

COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias et al. Gram-negative bacilli carrying mcr gene in Brazil: a pathogen on the rise. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-12, 2023.

COULTER, Calvin B. The biological identity of the Friedlander bacillus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 26, n. 6, p. 763-768, 1917.

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

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

DALMOLIN, Tanise Vendruscolo et al. Detection of Enterobacterales resistant to polymyxins using Rapid Polymyxins NP test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 425-428, 2019.

DE ALMEIDA, Keila de Cássia Ferreira et al. Carbapenem resistance in non-carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains: the role importance of OprD and AmpC. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e287111335164-e287111335164, 2022.

DE CARVALHO, Fabrício Rodrigues Torres et al. Antimicrobial Stewardship Programs: A Review of Strategies to Avoid Polymyxins and Carbapenems Misuse in Low Middle-Income Countries. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 378, 2022.

DE SOUSA, Ana Beatriz Alves; RAMALHO, Fernanda Lobato; CAMARGO, Beatriz. Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em indivíduos hospitalizados/Prevalence of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in hospitalized. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915-1932, 2020.

EIAMPHUNGORN, Warawan et al. Prevalence of the colistin resistance gene mcr-1 in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 15, p. 32-35, 2018.

EL-HALFAWY, Omar M.; VALVANO, Miguel A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 191-207, 2015.

FANG, Yinfei et al. An XDR *Pseudomonas aeruginosa* ST463 Strain with an IncP-2 Plasmid Containing a Novel Transposon Tn 6485f Encoding bla IMP-45 and bla AFM-1 and a Second Plasmid with Two Copies of bla KPC-2. **Microbiology Spectrum**, p. e04462-22, 2023.

FASSEEH, Ahmad et al. Cost-Effectiveness Analysis of Ceftazidime/Avibactam Versus Polymyxin E in The Treatment of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Literature Review. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 90, n. 2, p. 2775-2783, 2023.

FERNÁNDEZ, L. et al. Characterization of the Polimyxin B Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v.57, n.01, p.110-119, jan. 2013.

GEFFERS, Christine et al. No increase of device associated infections in German intensive care units during the start of the COVID-19 pandemic in 2020. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 11, n. 1, p. 67, 2022.

GLASS. Global antimicrobial resistance and use surveillance system report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.

GOULART, Taíse de Mello. Comparação entre Etest® e microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade à polimixina B em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC. 2017.

GOMES, Marisa Zenaide Ribeiro et al. Outbreak report of polymyxin-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing untreatable infections evidenced by synergy tests and bacterial genomes. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 6238, 2023.

GOMES, Ana Érika Inácio; Estudo do papel do regulador FimZ na expressão de fímbrias em *Klebsiella pneumoniae* e nos processos de adesão e invasão bacteriana. Tese (Doutorado) -

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, 2018.

GUAN, Jiayao et al. First report of the colistin resistance gene mcr-10.1 carried by IncpA1763-KPC plasmid pSL12517-mcr10. 1 in *Enterobacter cloacae* in Sierra Leone. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e01127-22, 2022.

HABIB, Amina et al. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacterales in the community of Rawalpindi, Pakistan. **Plos one**, v. 17, n. 7, p. e0270707, 2022.

HALL, Barry G.; BARLOW, Miriam. Revised Ambler classification of β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1050-1051, 2005.

HUANG, Bin et al. Promoter variation and gene expression of mcr-1-harboring plasmids in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a Chinese hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. e00018-18, 2018.

HUMPHRIES, Romney M. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now?. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n. 1, p. 22-27, 2015.

JACOBY, George A. AmpC β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JAURIN, Bengt; GRUNDSTRÖM, T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 8, p. 4897-4901, 1981.

JAYOL, Aurélie et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 92, n. 2, p. 90-94, 2018.

JAYOL, Aurélie et al. Modulation of mgrB gene expression as a source of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 46, n. 1, p. 108-110, 2015.

JOUY, Eric et al. Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of microbiological methods**, v. 132, p. 125-127, 2017.

KAHAN, J. S. et al. Thienamycin, a new β -lactam antibiotic I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. **The Journal of antibiotics**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 1979.

KARAMI-ZARANDI, Morteza et al. *Klebsiella pneumoniae*: an update on antibiotic resistance mechanisms. **Future Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 65-81, 2023.

KARVANEN, Matti et al. Colistin is extensively lost during standard in vitro experimental conditions. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. e00857-17, 2017.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

LAI, Chih-Cheng et al. Clinical characteristics of patients with bacteraemia due to the emergence of mcr-1-harboring Enterobacteriaceae in humans and pigs in Taiwan. **International journal of antimicrobial agents**, v. 52, n. 5, p. 651-657, 2018.

LEUNG, Lisa M. et al. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3035-3042, 2017.

LI, Ziyao et al. Genetic Diversity of Polymyxin-Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: a Multicenter Study in China. **Microbiology Spectrum**, p. e05231-22, 2023.

LIN, Wei-Hsuan et al. Molecular detection of respiratory pathogens in community-acquired pneumonia involving adults. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 55, n. 5, p. 829-837, 2022.

LING, Zhuoren et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087-3095, 2020.

LING, Zhuoren et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087-3095, 2020.

LIPPA, Andrew M.; GOULIAN, Mark. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. **PLoS genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000788, 2009.

LIU, Yi-Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LIVERMORE, David M. Fourteen years in resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 39, n. 4, p. 283-294, 2012.

LLOBET, Enrique et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 46, p. E6369-E6378, 2015.

MAHLEN, Steven D. et al. Analyses of ampC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 791-802, 2003.

MALLI, Ergina et al. Evaluation of rapid polymyxin NP test to detect colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in a tertiary Greek hospital. **Journal of microbiological methods**, v. 153, p. 35-39, 2018.

MALLI, Ergina et al. Implementation of the Rapid Polymyxin™ NP test directly to positive blood cultures bottles. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 4, p. 114889, 2019.

MIRIAGOU, V. et al. Panresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 810-811, 2005.

MITTON, B. et al. Evaluation of an in-house colistin NP test for use in resource-limited settings. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 10, p. e00501-19, 2019.

MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333, 2009.

MOUBARECK C. A., MOUFTAH S. F., PÁL T., et al.. Clonal emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST14 co-producing OXA-48-type and NDM carbapenemases with high rate of colistin resistance in Dubai, United Arab Emirates. **Int J Antimicrob Agents** 2018; 52:90–5.

NORDMANN, Patrice; JAYOL, Aurélie; POIREL, Laurent. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, 2016.

NOSTER, Janina; THELEN, Philipp; HAMPRECHT, Axel. Detection of multidrug-resistant Enterobacterales—from ESBLs to carbapenemases. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1140, 2021.

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

OLIVEIRA, Adriana Cristina; DAMASCENO, Quésia Souza. O papel do ambiente hospitalar na disseminação de bactérias resistentes. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 1, p. 28-31, 2012.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; KOVNER, Christine Tassone; SILVA, Rafael Souza da. Nosocomial infection in an intensive care unit in a Brazilian university hospital. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 18, p. 233-239, 2010.

OneHealthTrust. ResistanceMap: Antibiotic Resistance 2023.

<<https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>>. Data de acesso: 22/04/2023.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PADILLA, Emma et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 177-183, 2010.

PAPP-WALLACE, Krisztina M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PENG, Danyang et al. Efficacy and safety of colistin sulfate in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant organisms: a multicenter retrospective cohort study. 2023.

PIPERAKI, Evangelia-Theophano et al. Klebsiella pneumoniae: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

POGUE, J. M. et al. Are there any ways around the exposure-limiting nephrotoxicity of the polymyxins?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p.622-626, 2016.

POIREL, Laurent et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 90, n. 1, p. 7-10, 2018.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

POIREL, Laurent et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in Klebsiella pneumoniae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 75-80, 2015.

RABELO, Jessica Gama Diniz et al. AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL DE ALTA COMPLEXIDADE. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 4, n. 2, p. e422675-e422675, 2023.

RANJAN, Rahul et al. Evaluation of in-vitro colistin susceptibility and clinical profile of carbapenem resistant Enterobacteriaceae related invasive infections. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 41, p. 40-44, 2023.

RAOUF, Faez Erees Abdul et al. Extended-spectrum beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae* from Iraqi patients with community-acquired pneumonia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 68, p. 833-837, 2022.

RIBEIRO, Suzana Meira et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to β -lactam antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3906-3912, 2015.

RIGATTO, Maria Helena et al. Risk factors for acute kidney injury (AKI) in patients treated with polymyxin B and influence of AKI on mortality: a multicentre prospective cohort study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1552-1557, 2015.

ROBERTS K. D, et al. Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polimyxin B and Colistin: Last-line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria. **ACS Infect Dis.**, v. 1 n. 11, p. 568-575, 2015.

ROCHA, Rute Rodrigues. *Klebsiella pneumoniae* – Virulência e Resistência. Universidade de Coimbra, 2021.

RODRIGUES, Ana Claudia Souza et al. Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

SALAUDDIN, M. et al. Isolation of multi-drug resistant *Klebsiella* sp. from bovine mastitis samples in Rangpur, Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res* 2019; 6(3):362–365.

SALAZAR-VIZCAYA, Luisa et al. The impact of public health interventions on the future prevalence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: a population based mathematical modelling study. **BMC infectious diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2022.

SAMPAIO, Jorge Luiz Mello; GALES, Ana Cristina. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 31-37, 2016.

SANTOS, Wendel Mombaque dos; SECOLI, Silvia Regina. Impacto econômico do tratamento de pacientes infectados com *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Einstein (São Paulo)**, v. 17, 2019.

SARA, L. et al. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Plos One**. V13, n. 6, Jun. 2018.

SCHAAF, Kaitlyn et al. A high-throughput compatible assay to evaluate drug efficacy against macrophage passaged *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 121, 2017.

SHEN, Meijing et al. Antimicrobial resistance patterns, sequence types, virulence and carbapenemase genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care teaching hospital in Zunyi, China. **Infection and Drug Resistance**, p. 637-649, 2023.

SHERRY, Norelle; HOWDEN, Benjamin. Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam—epidemiology, laboratory detection and treatment implications. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 16, n. 4, p. 289-306, 2018.

SHOAIB, Muhammad et al. Evaluation of rapid polymyxin Nordmann Poirel test for detection of polymyxin resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 2195-2198, 2020.

SIMAR, Shelby et al. Colistin and polymyxin B minimal inhibitory concentrations determined by Etest found unreliable for Gram-negative bacilli. *Ochsner Journal*, v. 17, n. 3, p. 239-242, 2017.

SIMS, Natalie; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment international*, v. 139, p. 105689, 2020.

SOUGAKOFF, Wladimir et al. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 879-884, 1988.

STANSLY, P. G.; SCHLOSSER, ME526590. Studies on polymyxin: isolation and identification of *Bacillus polymyxa* and differentiation of polymyxin from certain known antibiotics. **Journal of bacteriology**, v. 54, n. 5, p. 549-556, 1947.

SUN, Jian et al. Deciphering MCR-2 colistin resistance. **MBio**, v. 8, n. 3, p. e00625-17, 2017.

TANIGUCHI, Leandro Utino et al. Disponibilidade de recursos para tratamento da sepse no Brasil: uma amostra aleatória de instituições brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, p. 193-201, 2019.

TAVARES, C. P. M. *Klebsiella pneumoniae* e fatores associados que contribuem para a resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

THOMAS, Genara Romero et al. Increased detection of carbapenemase-producing Enterobacterales bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 pandemic. 2022.

TRIMBLE, Michael J. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.

TSUJI, Brian T. et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins: endorsed by the American college of clinical pharmacy (ACCP), European society of clinical microbiology and infectious diseases (ESCMID), infectious diseases society of America (IDSA), international society for anti-infective pharmacology (ISAP), society of critical care medicine (SCCM), and society of infectious diseases pharmacists (SIDP). **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 39, n. 1, p. 10-39, 2019.

VARDAKAS, K. Z.; FALAGAS, M. E. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016.

VASOO S., BARRETO J. N., TOSH P. K. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. **Mayo Clin Proc.** 2015 Mar;90(3):395-403. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.12.002. PMID: 25744116.

VELKOV, Tony et al. Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Innate immunity**, v. 20, n. 4, p. 350-363, 2014.

WANG, Guoying et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020.

WANG, Chengcheng et al. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 508-516, 2020.

WATANABE, Érika Mitiyo et al. Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde em pacientes acometidos por trauma. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1Supl, p. 89-98, 2015.

WORLD BANKING. Drug-resistant infections a threat to our economic future; 2017. Disponível em: <www.worldbank.org> Acesso em 21 de abril de 2023.

WRIGHT, Meredith S. et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 536-543, 2015.

WYRES, Kelly L.; LAM, Margaret MC; HOLT, Kathryn E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020.

XIA, G. L.; JIANG, R. L. Efficacy and safety of polymyxin B in carbapenem-resistant gram-negative organisms infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, p. 1-9, 2021.

XU, Liangfei; SUN, Xiaoxi; MA, Xiaoling. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 16, p. 1-12, 2017.

YAINOY, Sakda et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test for detection of colistin susceptibility in Enterobacteriaceae isolated from Thai patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 102-106, 2018.

ZHANG, Qi et al. Evaluation of Commercial Products for Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for mcr-Positive and Negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. **Infection and Drug Resistance**, p. 1171-1181, 2023.

ANEXO A - Carta de aprovação do CEP



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ
Ministério da Saúde

Recife, 13 de abril de 2015.

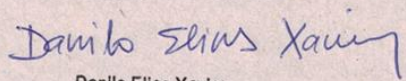
DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO

Declaro para devidos fins que os pesquisadores abaixo conhecem na íntegra e participam do projeto **"Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo Genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos."** executando as respectivas tarefas.

Autor: Danilo Elias Xavier – Pesquisador CPqAM/FIOCRUZ-PE

Identidade: 52.973.710-3 SSP/SP – SIAPE nº 2177208

Tarefa: Coordenação dos projetos de pesquisa

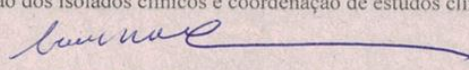
Assinatura: 

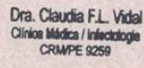

Danilo Elias Xavier
Pesquisador em Saúde Pública
Mat. SIAPE 2177208
CPqAM/Fiocruz

Co-autor: Claudia Fernanda de Lacerda Vidal- Chefe da CCIH-HC/UFPE

Identidade: SIAPE nº 1133607

Tarefa: Concessão dos isolados clínicos e coordenação de estudos clínicos

Assinatura: 


Dra. Claudia F.L. Vidal
Clínica Médica / Infectologia
CRMPE 9259

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n - Cx. Postal 7472 - Fone: 0XX81 3012590 - Fax: 0XX81 4531911 - CEP: 50670-420
Recife - PE - Brasil - <http://www.cpqam.fiocruz.br>

ANEXO B- Carta de anuência do Hospital das Clínicas da UFPE



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE
SERVIÇOS HOSPITALARES

EBS **2** **RH**

CARTA DE ANUENCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos o a pesquisador Danilo Elias Xavier (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães — FIOCRUZ-PE), a desenvolver o seu projeto de pesquisa "Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo Genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos", que está sob a sua coordenação, em parceria com Dra. Claudia Fernanda de Lacerda Vidal, do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco, cujo objetivo é a criação de um acervo bacteriológico, Banco de Microrganismos, constituído de isolados clínicos oriundo de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS) para implantação programa local de vigilância da resistência antimicrobiana entre espécies de importância clínica isoladas de IRAS.

A aceitação esta condicionada ao cumprimento do pesquisador aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados, exclusivamente para os fins da pesquisa.

Recife, 25 de maio de 2015

Prof.
M. B. Castro
Gerente de Ensino, Pesquisa
e Extensão - HC/UFPE
SUAP: 1245591

ProP Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Gerente de Ensino e Pesquisa
HC/UFPE

HC-UFPE Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Recife/PE
CEP: 50670-420 Tel: (81) 2126.3953 / 2126.3984 Fax: 3453.3675
e-mail: hcdiretoria@ufpe.br